



HAL
open science

Place des cellules dendritiques plasmocytoïdes dans l'immunité innée anti-tumorale, de leur activation par des ligands de TLR à leur fonctionnalité en contexte de mélanome

Jeremy Di Domizio

► **To cite this version:**

Jeremy Di Domizio. Place des cellules dendritiques plasmocytoïdes dans l'immunité innée anti-tumorale, de leur activation par des ligands de TLR à leur fonctionnalité en contexte de mélanome. Immunologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00439353

HAL Id: tel-00439353

<https://theses.hal.science/tel-00439353>

Submitted on 7 Dec 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Doctorat de l'Université de Grenoble
Spécialité Immunologie

**Place des cellules dendritiques plasmocytoïdes dans l'immunité
innée anti-tumorale,
de leur activation par des ligands de TLR à leur fonctionnalité en
contexte de mélanome**

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le 3 décembre 2009

Par **Jeremy DI DOMIZIO**

JURY

Rapporteurs

Dr. Bertrand DUBOIS (INSERM U851, IFR128 Biosciences, Lyon)

Dr. Vassili SOUMELIS (INSERM U832, Institut Curie, Paris)

Examineurs

Dr. Anne-Sophie BEIGNON (CNRS URA 3015, Institut Pasteur, Paris)

Pr. Emmanuel DROUET (UJF-EMBL-CNRS UMR 5233, Grenoble)

Dr. Joël PLUMAS (INSERM U823, EFS, Grenoble)

Directeur de Thèse

Dr. Laurence CHAPEROT (INSERM U823, EFS, Grenoble)

« **L'éternité, c'est long, surtout vers la fin** » Woody Allen

Une citation à laquelle j'ai souvent pensé pendant l'écriture de cette thèse...



Je tiens à remercier sincèrement les **Dr. Vassili Soumelis** et **Bertrand Dubois** pour avoir accepté avec enthousiasme de rapporter ma thèse, ainsi que les **Dr. Anne-Sophie Beignon** et **Joël Plumas** et le **Pr. Emmanuel Drouet** pour avoir voulu participer spontanément à son examen. Je remercie également mon directeur de thèse le **Dr. Laurence Chaperot** pour sa participation au jury.

La conduite de mon travail de thèse ainsi que toutes les activités que j'ai effectuées durant mon doctorat n'auraient pas pu avoir lieu sans l'aide de certaines personnes. J'exprime donc vivement ma reconnaissance :

Aux **Dr. Joël Plumas** et **Laurence Chaperot** qui m'ont recruté et accueilli dans leur laboratoire il y a 5 ans déjà pour mon premier stage de Master 1. Ils m'ont encadré activement, me permettant d'obtenir un excellent niveau à mon master et m'ayant permis de poursuivre en doctorat dans de très bonnes conditions. Je les remercie également pour m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreux congrès nationaux et internationaux qui m'ont formé à la communication de mon travail. En somme, je leur dois toute la maturité professionnelle que j'ai acquise ces dernières années. **Joël**, merci pour avoir cru en moi et pour m'avoir donné l'opportunité de me sentir responsable et actif au sein du service. **Laurence**, merci pour avoir eu confiance en moi, pour m'avoir laissé une indépendance dans la conduite de mes travaux, pour m'avoir parfait mes compétences scientifiques et pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer mon monitorat d'enseignement supérieur. Je suis fier d'avoir été ton premier thésard et espère t'avoir rendu la pareille.

Aux autres membres (anciens ou actuels) du laboratoire (**Ariane, Caroline, Dalil, David, Françoise, Jean-Paul, Jérémie, Julie** et **Juliette**) pour leur soutien technique et moral, qui ont nourri une ambiance conviviale et sereine au sein de l'équipe. **Caroline**, merci pour tes conseils pro et le partage de tes contacts internationaux pour ma recherche de post-doctorat. **David Crocket** pour ton aide logistique et tes discussions chocolatées. **Dalil**, merci de ton soutien moral depuis tant d'années, tes discussions (scientifiques...toujours !) et du partage de ton potentiel communication au sein de l'université. **Françoise** pour nos discussions et tes conseils souvent apportés pendant notre rituel *tea time*. **Jean-Paul** pour tes apports techniques et tes stratégies de récupération de gâteaux aux pauses café. **Jérémie** pour nos discussions et débats d'actualité (professionnels bien entendu !).

Julie, on a commencé ensemble, on a travaillé ensemble, on s'est supportés l'un l'autre pendant plusieurs années et on va terminer (presque) ensemble. Merci pour ton soutien, ton aide, ta collaboration et nos rires bien mérités ! Bonne chance pour la dernière ligne droite !

Juliette, tu m'as pris sous ton aile dès que je suis arrivé. On s'est compris tout de suite et on s'estentraidés sans hésiter. Merci de m'avoir soutenu (sur tous les plans), de m'avoir écouté

(beaucoup écouté !) et de m'avoir partagé ton amitié. J'ai grandi en partie grâce à toi. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour ton avenir, tu le mérites !

Aux étudiants que j'ai encadrés durant leur stage, **Bruno, Amine** et **Claire**. Je tiens à remercier particulièrement **Bruno** qui a eu le comportement de stagiaire que tout maître de stage rêverait d'avoir. Merci pour ta confiance et ton dévouement, je te prévois un bel avenir.

Au **Pr. Marie-Thérèse Leccia** qui m'a permis d'accéder aux prélèvements de patients porteurs de mélanome au sein du département de dermatologie qu'elle dirige au CHU de Grenoble. Je remercie par la même occasion **Dr. Dimitri Salameire** qui a participé activement aux analyses immunohistochimiques et qui a toujours été soucieux de nous procurer des échantillons frais de tumeurs pour différentes études.

Aux membres du laboratoire EDyP du CEA (**Maighread, Alexandra, Alain, Mathilde** et **Michel**) dirigé par le **Dr. Jérôme Garin. Maighread**, merci pour tes correspondances enrichissantes, ta motivation dans l'étude du phosphoprotéome et tes relectures de mon article. Je te souhaite de réussir dans ton nouveau projet professionnel. **Alex**, merci pour ta participation à l'analyse des échantillons en masse et ta bonne humeur lors de nos manip. **Alain**, merci pour tes détours cyclistes par l'EFS et ta motivation pour le projet.

Au **Pr. Emmanuel Drouet** qui m'a permis d'effectuer une partie de mon enseignement de monitorat en immunologie à la faculté de pharmacie. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez donnée dès mon entrée en fonction, pour m'avoir laissé choisir les thématiques que je voulais aborder et pour m'avoir fait participer activement à la dispense et au contrôle de l'unité. J'ai ainsi pu apprécier le fait d'enseigner, fonction à laquelle je me destinerai au final. Je remercie par la même occasion les **Pr. Alain Favier** et **Michel Sève** qui m'ont donné l'opportunité d'enseigner dans la composante de biochimie et biologie moléculaire. Je remercie les autres enseignants avec qui j'ai travaillé (**Isabelle, Christine** et **Jean**) ainsi que mes étudiants qui m'ont souvent fait de bons retours.

Au **Pr. François Boucher** qui a accepté d'être mon tuteur pour mon atelier projet de 3^{ème} année de monitorat. Il m'a aidé à mettre en place un parrainage d'une classe de 3^{ème} pour leur faire découvrir ce qu'est l'Université et la recherche. Je remercie par cette occasion le principal du Collège Saint-Paul (Saint-Paul sur Isère, 73), **M. Patrice Ghezzi**, et l'enseignante de SVT, **Mme Sylvie Darragon**, pour avoir participé à ce projet.

Aux personnes avec qui j'ai travaillé, discuté et appris. Elles n'ont pas forcément participé directement à mes travaux mais elles m'ont apporté des petits riens qui font un grand tout.

Merci à **Marie-Christine, Michel, Christine, Ghislaine, Richard, Frédérique, Agnès, Sylvie, Tania, Joëlle, Nicole, Amed, Nadège, Nathalie, Christophe, Olivier...** J'en oublie sûrement.

Ma vie personnelle a beaucoup compté pendant mon doctorat. On ne peut travailler bien que si l'on se sent bien. Je tiens donc à remercier chaleureusement :

Mes amis qui m'ont soutenu, m'ont fait décompresser, m'ont organisé des super soirées (ou plutôt qui ont participé à MES soirées ;-)) et m'ont demandé sans cesse : « c'est quand que tu finis ? ». Un grand merci à vous, en vrac et pas dans l'ordre de préférence : **mon ptit Amine, ma Steph, mon ptit Julien** (pour tes analyses socio-politico-psychologiques de la vie), **mi vecina Estelle** (pour nos soirées DVD et nos commérages de quartier), **mon ptit Mika** (pour ton regard critique du parc candélabrier), **Mimi, Pitoo** (pour les potins), **Frérot** (for our former TV series evenings), **Virg, Didou et Alex** (pour nos meilleures années de colocation, nos soirées d'anniversaire et nos restos atlantik moule !), **Brandon** (pour tes échantillons gratuits lol), **Jérôme, Frankreich, Romain, Yannick, Cédric, Audrey, Sam et JB** (pour toutes ces soirées time's up et autres), **July et Rémiche** (pour nos soirées parisiennes), **ma Biche** (pour tous ces cafés philosophiques qui me manquent tant), **Stefano, Kentin...**

Une dédicace particulière

- à **Steph**, on se supporte depuis près d'une décennie (et ouais ça passe...), on a étudié ensemble, on a vécu ensemble, on a rit et pleuré ensemble, on connaît tout l'un de l'autre. Merci de garder le sourire à chaque qu'on se voit, merci d'être toujours là. Tu me manqueras aussi beaucoup !
- à **Amine**, merci d'avoir toujours été là, je ne pense pas avoir besoin d'une partie « remerciements » dans ma thèse pour te dire combien ton amitié m'est chère, merci pour toutes ces vacances de folie, ces soirées de dernière minute, ces restos et ces bars où on a copiné avec la table d'à côté, tu me manqueras beaucoup quand je partirai !

Ma famille, qui m'a soutenu et cru en moi depuis tant d'années. Oui, Papa, Maman, j'ai fini mes études !

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| Liste des Tableaux | 10 |
| Liste des Figures | 11 |
| Liste des Figures | 11 |
| Abréviations | 13 |
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 16 |
| I. Origine et rôle des cellules dendritiques plasmocytoïdes humaines | 17 |
| A) Découverte des cellules dendritiques plasmocytoïdes | 17 |
| B) Caractérisation phénotypique des pDC | 18 |
| C) Ontogénie des pDC | 20 |
| 1. Différenciation des pDC | 20 |
| 1.1 Les facteurs de différenciation | 20 |
| 1.2 Arguments en faveur d'une origine lymphoïde des pDC | 21 |
| 1.3 Arguments en faveur d'une origine commune des mDC et pDC | 22 |
| 2. Localisation et migration des pDC dans l'organisme | 23 |
| D) Rôle physiologique des pDC | 26 |
| 1. Activation, maturation et différenciation des pDC | 26 |
| 2. La pDC, une cellule de l'immunité innée via l'IFN- α et TRAIL | 29 |
| 2.1 IFN et virus | 30 |
| 2.2 IFN, cellules NK et cellules NKT | 30 |
| 2.3 IFN et immunité adaptative | 31 |
| 2.4 IFN et mDC | 31 |
| 2.5 Les pDC, des cellules cytotoxiques | 32 |
| 3. Capture et présentation d'antigènes par les pDC | 33 |
| 3.1 Capture d'antigènes | 33 |
| 3.2 Cross-présentation d'antigènes et activation des lymphocytes T CD8 ⁺ | 34 |
| 4. Activation et induction de la polarisation des lymphocytes T CD4 ⁺ | 36 |
| 4.1 Les lymphocytes TH1 et TH2 | 37 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 4.2 | Les lymphocytes Treg..... | 37 |
| 4.3 | Les lymphocytes TH17 | 39 |
| 4.4 | Synthèse | 40 |
| II. | Les voies de signalisation impliquées dans l'activation des pDC | 42 |
| A) | Les voies de signalisation des Pattern Recognition Receptors..... | 42 |
| 1. | Les PRR cytoplasmiques..... | 42 |
| 2. | Les TLR | 44 |
| 2.1 | Nature et fonction des TLR7 et -9 | 45 |
| 2.2 | Trafic cellulaire des TLR7 et -9 et leur ligand..... | 47 |
| 2.3 | Signalisation induite par l'engagement des TLR7 et -9 | 48 |
| 2.4 | Signalisation différentielle induite par les ligands des TLR7 et -9 ... | 51 |
| 2.5 | Régulation de l'activation TLR des pDC | 53 |
| B) | Les voies de signalisation du récepteur de l'IFN de type I | 56 |
| 1. | La signalisation induite par les IFN- α/β | 57 |
| 2. | Le contrôle de la signalisation IFN..... | 61 |
| III. | Les pDC en pathologies..... | 64 |
| A) | Les pDC dans les infections virales..... | 64 |
| 1. | VRS | 64 |
| 2. | VIH | 65 |
| 3. | Les virus hépatiques..... | 67 |
| 3.1 | VHB | 67 |
| 3.2 | VHC..... | 67 |
| 3.3 | VHB et VHC..... | 68 |
| B) | Les pDC et les maladies auto-immunes | 69 |
| 1. | Le lupus érythémateux systémique..... | 69 |
| 2. | Le psoriasis..... | 71 |
| C) | Les pDC dans l'allergie | 73 |
| 1. | La rhinite allergique | 74 |
| 2. | L'asthme allergique | 74 |
| D) | Les pDC en contexte tumoral..... | 76 |
| 1. | Le cancer du sein | 76 |
| 2. | Le cancer de l'ovaire..... | 77 |

| | |
|--|------------|
| 3. Les cancers de la peau | 78 |
| IV. Les pDC en thérapeutique..... | 82 |
| A) Ciblage thérapeutique des pDC | 82 |
| 1. Les différents agonistes et antagonistes utilisés | 82 |
| 2. Utilisation des ligands de TLR7 et -9 dans les maladies infectieuses | 84 |
| 2.1 En tant qu'adjuvant en vaccination..... | 84 |
| 2.2 En tant que molécules thérapeutiques | 85 |
| 3. Utilisation des ligands de TLR9 en contexte allergique | 85 |
| 4. Utilisation des ligands de TLR7 et -9 dans le cancer..... | 86 |
| 5. Utilisation de ligands inhibiteurs des TLR7 et -9 dans le cadre de maladies auto-immunes | 89 |
| B) Immunothérapie du cancer à base de pDC | 90 |
| V. Elaboration d'une lignée de pDC : les cellules GEN2.2..... | 93 |
| RESULTATS..... | 94 |
| Objectif de l'étude | 95 |
| <u>Article 1. La stimulation du TLR7 dans les cellules dendritiques plasmocytoides conduit à l'expression rapide de gènes induits par l'IFN en absence d'IFN de type I.....</u> | 97 |
| A) Résumé :..... | 97 |
| B) Résultats complémentaires et discussion : | 109 |
| 1. Expression d'autres gènes induits par l'IFN après activation du TLR7 | 109 |
| 2. Hypothèse d'une boucle autocrine intracellulaire | 109 |
| 3. Hypothèse de l'implication des IFN de type III..... | 111 |
| <u>Article 2. A novel signalling pathway leading to IFN-stimulated genes expression is induced in TLR7- and TLR9-activated plasmacytoid dendritic cells.....</u> | 112 |
| A) Introduction | 112 |
| B) Matériels et méthodes..... | 112 |
| 1. Analyse du flux calcique par cytométrie en flux..... | 112 |
| 2. Cultures d'activation..... | 113 |
| C) Résultats..... | 113 |

| | |
|--|------------|
| 1. Les ligands de TLR7 et TLR9 induisent des productions différentes de cytokines..... | 113 |
| 2. La stimulation du TLR7 et du TLR9 des pDC induit l'expression de gènes induits par l'IFN..... | 115 |
| 3. L'expression des ISG par les pDC activées par des ligands de TLR7 et TLR9 est indépendante de l'IFN de type I et de facteurs extracellulaires..... | 117 |
| 4. La phosphorylation de STAT1 et l'expression des gènes ISG chez les pDC activées par des ligands de TLR7 et -9 dépendent de tyrosine kinases de type Pyk2 et JAK1 | 118 |
| 5. La phosphorylation de STAT1 après activation par des ligands de TLR7 et TLR9 est indépendante de la signalisation calcique | 120 |
| D) Discussion et perspectives..... | 122 |
| Article 3. Caractérisation des cellules dendritiques circulantes chez les patients porteurs de mélanome, rôle de CCR6 dans le recrutement des pDC à la tumeur | 124 |
| A) Introduction et objectifs..... | 124 |
| B) Matériels et méthodes..... | 124 |
| C) Résultats..... | 125 |
| D) Conclusion et perspectives..... | 125 |
| Annexe 1. Méthode d'analyse du phosphoprotéome des pDC activées par un ligand de TLR7 | 161 |
| A) Introduction et objectifs..... | 161 |
| B) Méthode | 161 |
| C) Résultats..... | 162 |
| D) Conclusion et Perspectives | 163 |
| Annexe 2. Les pDC et les maladies dermatologiques : focus sur leur rôle dans l'auto-immunité et les cancers | 185 |
| DISCUSSION | 194 |
| I. Les voies de signalisation des TLR7 et -9..... | 195 |
| II. Les pDC de patients porteurs de mélanome | 201 |
| REFERENCES | 204 |

Liste des Tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Immunophénotype des DC et monocytes humains circulants..... | 20 |
| Tableau 2. Expression des TLR par les différentes sous-populations de DC humaines et par les monocytes | 45 |
| Tableau 3. Exemples d'agonistes de TLR utilisés en immunothérapie..... | 83 |
| Tableau 4. Essais cliniques récents sur l'utilisation de ligands de TLR7 et -9 en immunothérapie anti-tumorale..... | 88 |

Liste des Figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Morphologie des pDC.. | 19 |
| Figure 2. Ontogénie des cellules dendritiques..... | 23 |
| Figure 3. Localisation et migration des pDC dans l'organisme. | 25 |
| Figure 4. Activation des pDC..... | 28 |
| Figure 5. Polarisation de l'immunité par les pDC..... | 40 |
| Figure 6. Squelette des ADN naturels et modifiés. | 47 |
| Figure 7. Voies de signalisation induites par la reconnaissance d'acides nucléiques par les pDC | 50 |
| Figure 8. Mécanismes de contrôle de la signalisation TLR par les PRR membranaires..... | 55 |
| Figure 9. Les voies de signalisation induites par l'IFN de type I. | 59 |
| Figure 10. Mécanismes de contrôle de la signalisation IFN..... | 62 |
| Figure 11. Implication des pDC dans des pathologies..... | 81 |
| Figure 12. Principe des stratégies thérapeutiques utilisant des agonistes et antagonistes des TLR7 et -9 | 90 |
| Figure R1. Les gènes induits par l'IFN sont exprimés par les cellules GEN2.2 activées par les deux types de ligands de TLR7 | 109 |
| Figure R2. L'expression des gènes induits par l'IFN après stimulation du TLR7 est indépendante d'une boucle autocrine de l'IFN de type I intracellulaire | 110 |
| Figure R3. Transcription de l'IL-28A par les cellules GEN2.2 activées | 111 |
| Figure R4. Cytokine and chemokine production by TLR7- and TLR9-activated GEN2.2 cells | 114 |
| Figure R5. IFN- α , TNF α and CXCL10 production by TLR7- and TLR9-activated blood pDCs..... | 115 |
| Figure R6. IFN- α and ISGs expression by TLR7- and TLR9-activated GEN2.2 cells | 116 |
| Figure R7. The expression of TRAIL and CXCL10 and the phosphorylation of STAT1 in TLR7- and TLR9-activated GEN2.2 cells are independent of type I IFN | 117 |

| | |
|--|-----|
| Figure R8. STAT1 phosphorylation in TLR7- and TLR9-activated GEN2.2 cells is dependent on Pyk2- and JAK1-like tyrosine kinases..... | 120 |
| Figure R9. The phosphorylation of STAT1 following TLR7- and TLR9 activation in GEN2.2 cells is independent of calcium signaling | 121 |
| Figure D1. Activation différentielle des voies de signalisation du TLR9 par les CpG de type A et B | 197 |
| Figure D2. Expression des ARNm codant pour des cytokines par les cellules GEN2.2 à T0..... | 198 |
| Figure D3. Schéma des voies de signalisation en aval des TLR7 et -9 dans les pDC | 200 |

Abréviations

A

Ac : anticorps
ADN : acide désoxyribonucléique
AP-1 : activator protein 1
APC : cellule présentatrice d'antigène
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATG5 : autophagy related 5 homolog

B

BCAP : B cell adaptor protein
BCC : basal cell carcinoma
BCR : B cell receptor
BDCA : blood dendritic cell antigen
BLNK : B cell linker
BST2 : bone marrow stromal cell antigen 2
BTK : Bruton's tyrosine kinase

C

CamKII : calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CARD : caspase recruitment domain
CBP : CREB-binding protein
CCL : CC chemokine ligand
CCR : CC chemokine receptor
CD : cluster de différenciation
CDP : common DC progenitor
CLP : common lymphoid progenitor
CLR : C-type lectin receptor
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMP : common myeloid progenitor
CpG : cytosine phospho guanine
CREB : cAMP-response element binding protein
CTL : cytotoxic T lymphocyte
CXCL : CXC chemokine ligand
CXCR : CXC chemokine receptor

D

DC : dendritic cell

DC-SIGN : dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin

E

4E-BP : eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein
ERK : extracellular signal-regulated kinase
ETS : erythroblast transformation specific

F

FcR : récepteur au fragment Fc des immunoglobulines
FCS : sérum de veau foetal
FITC : fluorescéine
FLT3L : FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
Flu : *influenza* virus
Foxp3 : forkhead box P3

G

GAS : IFN- γ -activated sequence
GFP : green fluorescent protein
GM-CSF : granulocyte macrophage – colony-stimulating factor

H

HEV : veinule post-capillaire à endothelium épais
HMGB1 : high-mobility group box 1
HSV : herpes simplex virus

I

IC : immune complex
ICAM : inter-cellular adhesion molecule
IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN : interféron
IFNAR : récepteur à l'IFN de type I
Ig : immunoglobuline

IKK α : I κ B kinase alpha
IL-x : interleukine-x
IL-xR : récepteur à l'interleukine-x
ILT7L : immunoglobulin-like transcript 7 ligand
IPC : IFN-producing cell
IPS1 : IFN β -promoter stimulator 1
IRAK : IL-1R-associated kinase
IRF : IFN-regulatory factor
IRS : immunoregulatory sequence
ISG : IFN-stimulated gene
ISGF3 : ISG factor 3
ISRE : IFN-stimulated response element
ISS : immunostimulatory sequence
ITAM : immunoreceptor-based tyrosine activation motif
I κ B : inhibitor of NF- κ B

J

JAK : Janus kinase

K

KIR : kinase inhibitory region

L

LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire
Lin : lineage
LNH : lymphome non-hodgkinien
LpDC : leukemic pDC
LPS : lipopolysaccharide
LRR : leucine rich repeat

M

MAPK : mitogen activated protein kinase
MDA5 : melanoma differentiation associated antigen 5
mDC : cellule dendritique myéloïde
mTOR : mammalian target of rapamycin
MyD88 : myeloid differentiation gene 88
MxA : myxovirus resistance 1

N

NF- κ B : nuclear factor κ B
NK : natural killer cell
NLR : NOD-like receptor
NOD : nucleotide oligomerization domain
NOD/scid : nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency
NSCLC : carcinome pulmonaire non à petites cellules

O

ODN : oligonucleotide
OMS : organisation mondiale de la santé

P

PAMP : pathogen associated molecular pattern
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique
PD : phospho-diester
pDC : cellule dendritique plasmocytoïde
PE : phycoérythrine
PI3K : phosphoinositide 3 kinase
PKC : phospholipase C
PKR : double-stranded RNA-dependent protein kinase
PS : phospho-thioate
PTK/Pyk : protéine tyrosine kinase

R

RE : réticulum endoplasmique
RIG-1 : retinoid-inducible gene
RLH : RIG-1-like helicase

S

SCC : squamous cell carcinoma
SDF-1 : stromal cell-derived factor 1
Ser : serine
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SLE : lupus érythémateux systémique
STAT : signal transducer and activator of transcription
SOCS : suppressor of cytokine signalling
SYK : spleen tyrosine kinase

T

TA : tumor antigen

TAM : TYRO3, AXL et MER

TAK-1 : TGF- β activated kinase 1

TBK1 : TANK-binding kinase 1

TCR : T cell receptor

TGF- β : transforming growth factor β

TH : lymphocyte T helper

TIL : tumor infiltrating lymphocyte

TIR : toll/IL-1R

TLR : toll-like receptor

TNF : tumor necrosis factor

TRAF : TNF-receptor associated factor

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

Treg : lymphocyte T régulateur

TREM : triggering receptor expressed by myeloid cells

Tyr : tyrosine

V

VEGF : vascular endothelium growth factor

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience acquise

VPH : virus du papillome humain

VRS : virus respiratoire syncytial

VSV : virus de la stomate vésiculaire

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Origine et rôle des cellules dendritiques plasmocytoïdes humaines

A) Découverte des cellules dendritiques plasmocytoïdes

Dans les années 80, une sous-population leucocytaire représentant **moins de 1 %** des cellules mononucléaires non-adhérentes du sang périphérique chez les donneurs sains a été décrite comme étant majoritairement responsable de la production *in vitro* d'**interféron (IFN) de type I** (i.e. IFN- α , - β , - ω) en réponse aux virus *Influenza* (Flu), de Sendai et de la maladie de Newcastle (Perussia et al. 1985). Ces cellules qui exprimaient le **HLA-DR**, molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, mais étaient **négatives pour tous les autres marqueurs** de lignées lymphocytaires et myélomonocytaires connus ont alors été appelées **cellules naturelles productrices d'IFN** (natural IFN-producing cells, IPC) (Fitzgerald-Bocarsly 1993).

De façon simultanée, des pathologistes décrivent la présence abondante de cellules formant des clusters dans les **zones T des ganglions lymphatiques** en contexte de lymphadénite non spécifique. Leur morphologie proche de celle des **plasmocytes** et leur expression de CD4 leur ont valu l'appellation de « **cellules T plasmocytoïdes, PTC** » (Vollenweider and Lennert 1983). Plus tard, une étude approfondie de leur phénotype par l'utilisation d'un large panel d'anticorps monoclonaux a permis de démontrer que ces cellules partageaient des **marqueurs avec la lignée monocyte-macrophage** comme l'expression de CD31, CD36, CD68 et la chaîne alpha du récepteur à l'IL-3 (IL-3R α , CD123), amenant à les renommer « **monocytes plasmocytoïdes** » mais leur rôle restait alors encore énigmatique.

C'est seulement à la fin des années 90 que plusieurs équipes de recherche ont démontré que ces cellules se différenciaient *in vitro*, en présence d'IL-3 et de CD40-ligand, en **cellules dendritiques (DC)** (Grouard et

al. 1997) et qu'elles étaient capables de produire de grandes quantités d'IFN de type I en réponse aux virus(Cella et al. 1999a; Siegal et al. 1999a). Les DC ont été définies selon 3 critères: ce sont des cellules présentatrices d'antigènes exprimant constitutivement des molécules CMH de classe II, elles sont capables de stimuler les lymphocytes T naïfs et elles présentent une morphologie dendritique(Steinman 1991). Ainsi, recoupant les données concernant les IPC et les PTC, ces cellules furent classifiées comme **une sous-population de DC**, capables de produire de l'IFN- α et de stimuler des lymphocytes T, sous le nom de **cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDC)**.

B) Caractérisation phénotypique des pDC

Observées au microscope optique, les pDC isolées du sang **ressemblent aux plasmocytes**. Elles sont légèrement plus petites que des monocytes mais sont plus grandes que des lymphocytes au repos. Contrairement aux monocytes qui présentent un noyau en fer à cheval et de nombreuses vésicules cytoplasmiques (**Figure 1.B**), les pDC ont **un noyau excentré** en forme de haricot et un cytoplasme basophile qui contient une zone golgienne claire (**Figure 1.A**). Au microscope électronique à balayage, les pDC présentent **une morphologie ronde et lisse** avec un diamètre compris entre 8 et 10 μm (**Figure 1.C**). En microscopie électronique à transmission, on observe que les pDC ont un noyau avec une hétérochromatine marginale et un cytoplasme contenant **un réticulum endoplasmique rugueux développé**, un petit appareil de Golgi et beaucoup de mitochondries (**Figure 1.D**).

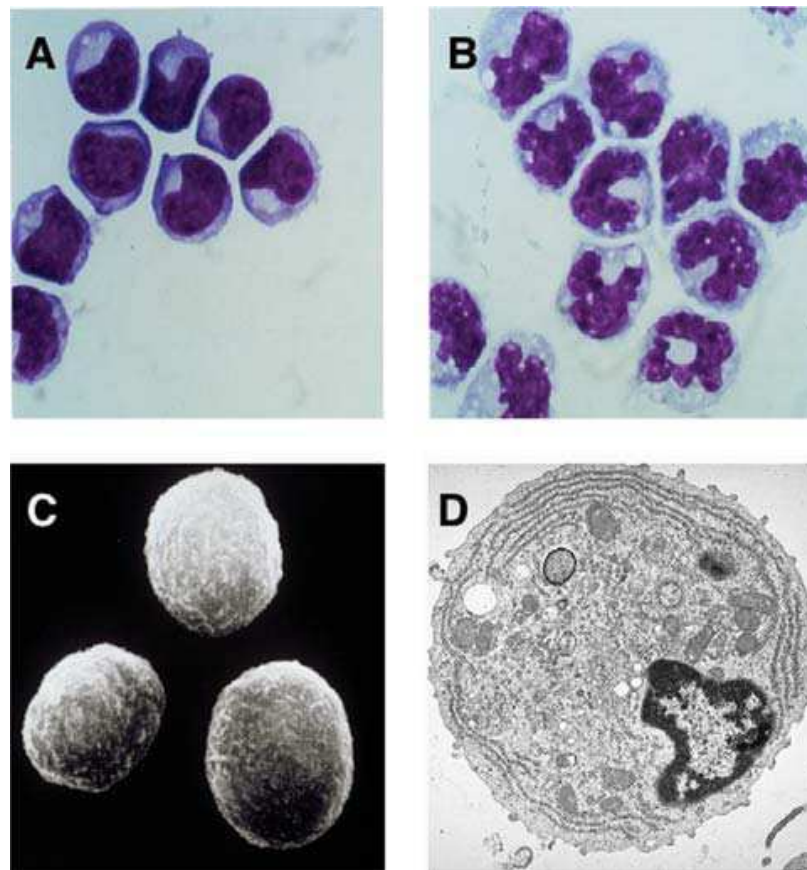


Figure 1. Morphologie des pDC. (A) pDC colorées au Giesma, X 400 ; (B) monocytes colorés au Giesma, X 400 ; (C) pDC observées par microscopie électronique à balayage, X 3000 ; (D) pDC observée par microscopie électronique à transmission, X 7000. Y-J Liu, Annu Rev Immunol, 2005.

Les DC humaines n'expriment **aucun marqueur spécifique de lignée** (lin) de tous les types cellulaires connus dans le système immunitaire, à savoir les immunoglobulines cytoplasmiques et de surface et le CD19 (lymphocytes B), le TCR et les complexes CD3 (lymphocytes T), le CD14 (monocytes), le CD16 et le CD56 (cellules NK). Les pDC se distinguent des cellules dendritiques myéloïdes (**mDC**) par **l'absence d'expression de CD11c**. Elles n'expriment **pas non plus de marqueurs myéloïdes** comme le CD13 ou le CD14 et l'expression du marqueur de progéniteur lymphoïde **CD10 est faible**, suggérant que les pDC appartiennent à **une lignée cellulaire indépendante** dans le système immunitaire. Comme les mDC circulantes, les pDC **n'expriment pas le CD1a**, marqueur associé à certaines DC périphériques.

En 2000, Dzionek *et al.* ont immunisé des souris avec des DC humaines Lin⁻ CD4⁺ purifiées par une méthode immunomagnétique. Ils ont ainsi pu générer un panel d'anticorps monoclonaux dirigé contre des antigènes

exprimés de façon spécifique par les DC humaines appelés **Blood Dendritic Cell Antigens** (BDCA)-1, BDCA-2, BDCA-3 et BDCA-4 (**Tableau 1**). L'expression des antigènes **BDCA-2 et BDCA-4** a été démontrée comme étant **restreinte aux pDC** à l'état immature (Dzionek et al. 2000). La protéine **BDCA-2** est une lectine de type C transmembranaire de type II qui joue **un rôle dans la capture d'antigène** et sa présentation (Dzionek et al. 2001). La protéine **BDCA-4**, elle, est la neuropiline-1 qui est un récepteur aux facteurs de guidance axonale exprimé par les neurones et **un récepteur au VEGF-A** (vascular endothelial growth factor-A) exprimé par les cellules endothéliales et tumorales, mais dont le rôle n'est pas élucidé pour les pDC (Dzionek et al. 2002).

Tableau 1. Immunophénotype simplifié des DC et monocytes humains circulants. +, ++, ± et - indiquent l'expression relative de chaque protéine évaluée par cytométrie en flux.

| Marqueur phénotypique | pDC | mDC | monocyte |
|-----------------------|-----|--------------|----------|
| CD1a | - | - | - |
| CD4 | ++ | + | + |
| CD11c | - | ++ | + |
| BDCA-1 (CD1c) | - | + | - |
| BDCA-2 | + | - | - |
| BDCA-3 | - | -/sous-pop + | - |
| BDCA-4 | + | - | - |
| CD116 (GM-CSFR) | + | ++ | ++ |
| CD123 | ++ | + | ± |
| HLA-DR | + | ++ | + |

D'après Dzionek, J Immunol, 2000

C) Ontogénie des pDC

1. Différenciation des pDC

1.1 Les facteurs de différenciation

La voie de différenciation hématopoïétique des pDC et les mécanismes moléculaires qui la régulent sont encore mal compris. Le **FLT3L** (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) est la première cytokine décrite comme

jouant **un rôle critique dans le développement des pDC**. En effet, la génération de pDC humaines est possible en cultivant des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ en présence de FLT3L(Blom et al. 2000) (Chen et al. 2004) ; et l'administration intraveineuse de cette cytokine à des volontaires sains permet d'**augmenter spécifiquement le pool circulant de pDC** (Pulendran et al. 2000). Par ailleurs, les souris transgéniques pour FLT3L présentent un nombre accru de pDC alors que celles KO pour cette cytokine ont un déficit dans le nombre de ces cellules en périphérie (Manfra et al. 2003). Enfin, la présence de précurseurs hématopoïétiques FLT3⁺ au niveau de la moelle osseuse et leur rôle potentiel de différenciation des pDC ont été démontrés *in vivo* dans un modèle murin(Karsunky et al. 2003) (Karsunky et al. 2005). D'autres facteurs régulant leur différenciation ont été décrits chez la souris parmi lesquels **STAT-3**, qui joue en aval de l'engagement de FLT3(Laouar et al. 2003), Ikaros(Allman et al. 2006), les IRF-4 (Interferon-regulatory factor-4) et IRF-8 (Tsuji-mura et al. 2003), Gfi-1 (growth factor-independent-1)(Rathinam et al. 2005) et XBP-1 (X-box binding protein-1)(Iwakoshi et al. 2007). Cependant seul le **facteur de transcription E2-2** à motif hélice-tour-hélice dont l'activité est promue par le **facteur Spi-B** de la famille des facteurs de transcription ETS (erythroblast transformation specific) a été démontré comme étant **spécifique de la différenciation des pDC humaines**(Schotte et al. 2004; Nagasawa et al. 2008).

1.2 Arguments en faveur d'une origine lymphoïde des pDC

Contrairement aux mDC dont l'origine myéloïde est bien définie et admise, **un doute persiste sur l'origine** et la nature du précurseur des pDC. La première hypothèse émise était que les pDC auraient **une origine lymphoïde**. En effet, l'analyse des marqueurs transitoires (ARNm) et permanents (réarrangements génomiques) des phases précoces du développement lymphoïde dans les DC ont montré la présence des transcrits codant pour le pT α (pre-T cell receptor α), $\lambda 5$ et Spi-B ainsi que d'un réarrangement D-J du gène de la chaîne lourde d'immunoglobuline dans les pDC et pas dans les mDC(Corcoran et al. 2003). D'autres travaux ont mis en évidence la présence

de transcrits associés à la lignée lymphoïde codant pour l'**ILT7** (immunoglobulin-like transcript 7), le **granzyme B** et le récepteur tyrosine kinase Eph-B1 (Rissoan et al. 2002). De plus, la surexpression du facteur de transcription dominant-négatif Id2 ou Id3 permet de bloquer le développement des pDC, des lymphocytes T et B et pas celui des mDC (Spits et al. 2000). Cependant de récentes données sont venues bouleverser cette hypothèse.

1.3 Arguments en faveur d'une origine commune des mDC et pDC

Plusieurs équipes de recherche ont démontré que des **pDC** peuvent être générées à partir à la fois des **progéniteurs myéloïdes communs** (CMP) ou des **progéniteurs lymphoïdes communs** (CLP) dans des modèles d'allogreffe murins (Shigematsu et al. 2004; Karsunky et al. 2005) mais que leurs caractéristiques fonctionnelles peuvent être différentes selon leur origine (Yang, G. X. et al. 2005). De plus, en utilisant un système de xénotransplantation, Ishikawa et al. ont pu étudier la différenciation de cellules souches et de progéniteurs hématopoïétiques humains *in vivo* (Ishikawa et al. 2005). Ils ont ainsi démontré que l'injection intraveineuse de **CMP** et **CLP** humains purifiés dans des souris nouveau-né NOD-scid (nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency)/IL2Rγ(null) permet dans les deux cas la **différenciation phénotypique de mDC et de pDC** (Ishikawa et al. 2007). Ils concluent alors que les DC humaines utilisent un **programme de différenciation unique** et flexible qui ne peut être catégorisé dans les voies myéloïdes et lymphoïdes classiques. Plus récemment, l'équipe de Shortman a découvert que la culture de moelle osseuse murine stimulée par FLT3L génère des précurseurs de DC aptes à se diviser appelés « **pro-DC** » et capables de **se différencier en toutes les sous-populations de DC** (Naik et al. 2007). Ils montrent que ces précurseurs générés *in vitro* ont des équivalents *in vivo* chez la souris avec les mêmes caractéristiques, mais ces « pro-DC » restent à être identifiés chez l'homme. Ces résultats supportent donc l'idée d'**une voie de différenciation hématopoïétique indépendante** et propre aux DC avec **un progéniteur de cellules dendritiques commun** (CDP) (**Figure 2**).

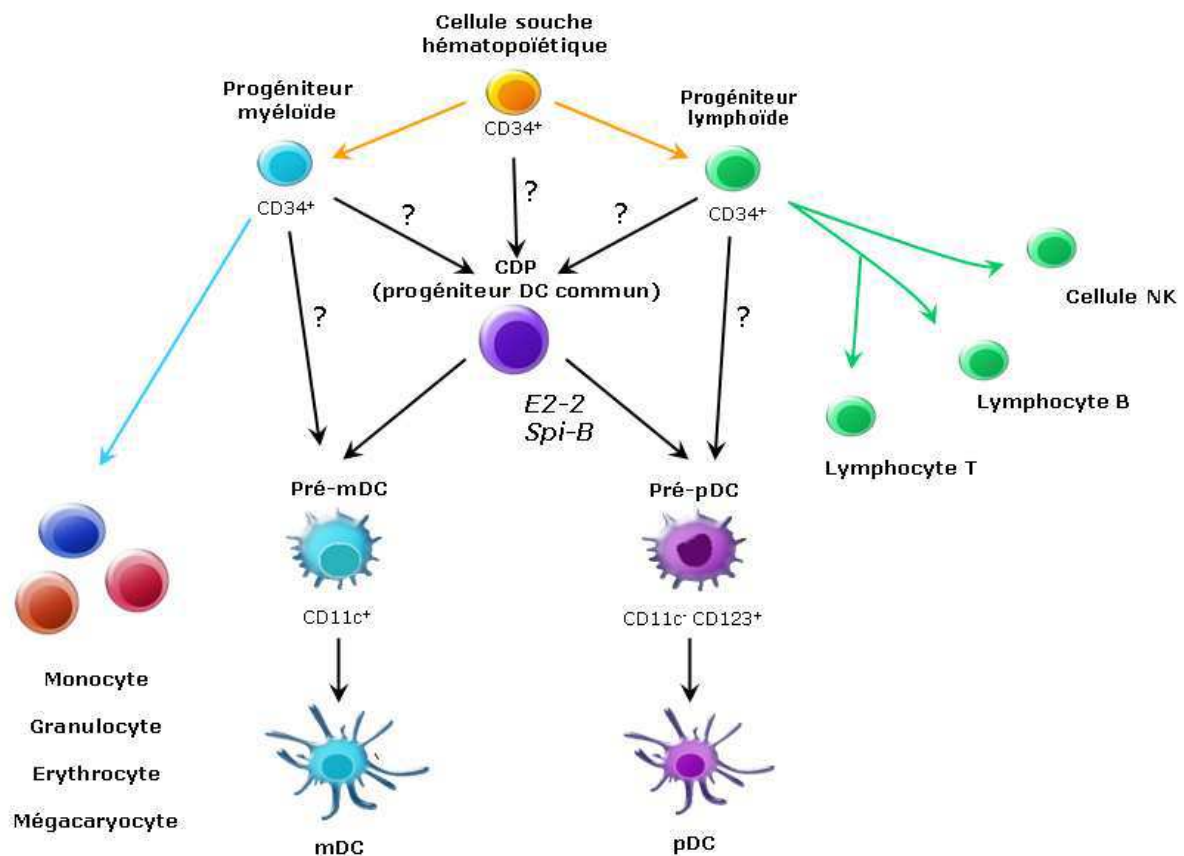


Figure 2. Ontogénie des cellules dendritiques (DC). Au cours de l'hématopoïèse, les DC myéloïdes CD11c⁺ et les DC plasmocytoïdes CD11c⁻CD123⁺ se différencient à partir d'un même progéniteur, le common DC progenitor (CDP). Sa caractéristique phénotypique et son origine restent à définir. Néanmoins, les facteurs de transcription Spi-B et E2-2 régulent sa différenciation en pDC.

Une des hypothèses non envisagée par les auteurs serait que les progéniteurs d'une lignée donnée injectés *in vivo* sont capables de se **dédifférencier** en cellules pluripotentes puis de se **redifférencier** en progéniteurs d'une autre lignée. Un tel mécanisme a déjà été observé *in vitro* avec des progéniteurs hématopoïétiques précoces de souris (Knaan-Shanzer et al. 2008). Ceci expliquerait alors la génération possible de pDC à partir de CMP et de CLP, et réduirait donc l'origine de ces cellules à la lignée lymphoïde.

2. Localisation et migration des pDC dans l'organisme

Chez l'adulte, les pDC sont produites continuellement dans la moelle osseuse et circulent dans le sang. A l'état basal elles sont présentes dans la rate, le thymus, **les ganglions lymphatiques, les organes lymphoïdes associés aux muqueuses**, le poumon (Masten et al. 2006) et le foie (Colonna et al.

2004) (**Figure 3**). Le taux de prolifération des pDC dans les organes lymphoïdes est très faible où moins de 0,3 % des pDC sont en cycle cellulaire. La durée de vie de ces cellules est courte, évaluée à 2 semaines chez la souris, et un remplacement continu par le sang est nécessaire pour maintenir le pool de pDC dans l'organisme à son niveau homéostatique (Merad and Manz 2009).

Contrairement aux mDC, le trafic physiologique des pDC **n'est pas clairement défini**. Il a été proposé que les pDC entrent dans les ganglions lymphatiques directement depuis le sang par **les veinules post-capillaires à endothélium épais** (HEV) et s'accumulent au niveau des **zones du paracortex** riches en lymphocytes T où on les retrouve (Cella et al. 1999a). En effet, les pDC expriment constitutivement le récepteur **CCR7** qui fixe les chimiokines CCL19 et CCL21 produites par les HEV et les cellules stromales du paracortex ainsi que **CD62L** et les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ qui jouent un rôle dans la transmigration au travers de l'endothélium (Penna et al. 2001; Diacovo et al. 2005). Cependant, l'expression de CCR7 est augmentée après activation des pDC et certaines études, par la mise au point d'une technique de microscopie intravitale chez la souris (Diacovo et al. 2005), montrent que les ganglions lymphatiques non inflammés permettent l'adhérence mais pas la transmigration des pDC alors qu'en contexte inflammatoire une importante migration des cellules a lieu à travers les HEV (Yoneyama et al. 2004). La migration constitutive ou induite par l'inflammation des pDC vers les ganglions lymphatiques est donc encore un sujet controversé.

Contrairement aux mDC, **les pDC ne migrent pas efficacement vers les tissus périphériques à l'état basal** mis à part vers le foie et l'intestin grêle où il a été montré que l'expression du récepteur CCR9, qui reconnaît la chimiokine CCL25, permet un adressage entérique des cellules (Wendland et al. 2007; Hadeiba et al. 2008). Cependant elles sont **présentes en grand nombre** en périphérie dans des **tissus inflammés** ou dans des **contextes pathologiques** (Woltman et al. 2007) comme certaines maladies inflammatoires de la peau (Vermi et al. 2005) et des **réactions allergiques** des voies respiratoires (Jahnsen et al. 2004). Leur expression des récepteurs CCR1,

CCR2 et CCR5 pour les chimiokines inflammatoires CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5 suggère une **migration des pDC** seulement en **contexte inflammatoire**. De plus il a été montré que la plupart des récepteurs à chimiokines exprimés par les pDC circulantes ne sont pas fonctionnels (Penna et al. 2001). D'autres études soutiennent aussi l'hypothèse d'une **migration induite par l'inflammation**. En effet, il a été montré que le récepteur CXCR3 n'est actif qu'après engagement du récepteur CXCR4 avec son ligand CXCL12 (Vanbervliet et al. 2003) et permet ainsi la migration des cellules vers les ganglions inflammés (Yoneyama et al. 2004) et les autres sites d'inflammation comme dans le contexte de l'arthrite chronique (Lande et al. 2004). Dans un autre modèle, il a été démontré que le récepteur **ChemR23** permet la migration des pDC vers la peau inflammée (Vermi et al. 2005) alors qu'elles y sont absentes en conditions physiologiques. Les pDC pourraient donc utiliser **plusieurs récepteurs à chimiokines** pour migrer vers les tissus en contexte pathologique.

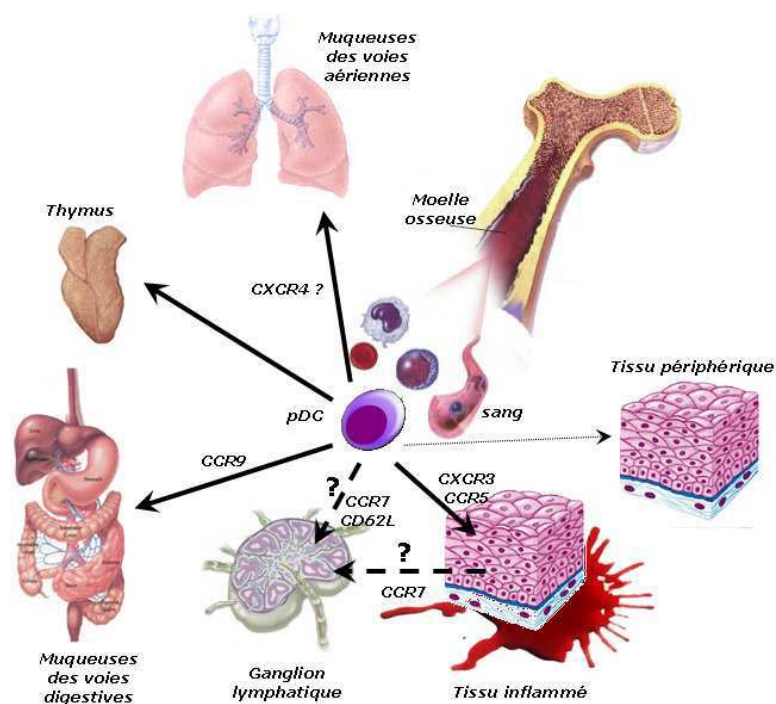


Figure 3. Localisation et migration des pDC dans l'organisme. Les pDC, qui sont générées au niveau de la moelle osseuse, circulent dans le sang. Elles sont présentes dans le thymus et les muqueuses des voies aériennes et digestives. Contrairement aux mDC, les pDC migrent peu vers les tissus périphériques en conditions physiologiques. En revanche, elles migrent activement vers les sites d'inflammation. Elles sont également retrouvées dans les ganglions lymphatiques mais il n'est pas encore compris si elles les atteignent à partir du sang ou à partir des tissus inflammés.

Il est connu que les mDC présentes dans les tissus, une fois activées, **augmentent l'expression du récepteur CCR7** et gagnent les ganglions lymphatiques par les vaisseaux lymphatiques afférents. Ce modèle prédit que les pDC qui ont migré vers les organes périphériques sont capables d'entrer dans les ganglions lymphatiques par **une voie différente** de celle de la transmigration des HEV. Cependant, une telle migration n'a **jamais été démontrée** expérimentalement chez l'homme. La présence de pDC dans la lymphe afférente a été recherchée et les résultats divergent selon les modèles analysés. En effet, Il a été retrouvé des **pDC circulantes** dans le **réseau lymphatique afférent** cutané **chez le mouton et le cochon nain**(Pascale et al. 2008). Au contraire, la lymphe afférente est **exempte de pDC** en conditions homéostatiques et inflammatoires **chez le rat**(Yrlid et al. 2006). Une autre hypothèse propose que les pDC activées en périphérie peuvent gagner les ganglions lymphatiques via **un retour à la circulation sanguine**. Il a été montré, dans un contexte d'allogreffe cardiaque chez la souris, que des pDC présentent des alloantigènes dérivés de l'allogreffe dans le contexte du CMH de classe II et que ces pDC sont présentes dans le sang et s'accumulent dans les ganglions lymphatiques par un mécanisme dépendant de CD62L(Ochando et al. 2006). Toutes ces données suggèrent que **les pDC ont un trafic migratoire propre** qui diffère de celui des mDC.

D) Rôle physiologique des pDC

1. Activation et différenciation des pDC

Les pDC sont capables de s'activer après reconnaissance de certains motifs microbiens appelés **PAMP** (Pathogen-associated molecular patterns) grâce à l'expression de senseurs particuliers conservés depuis la drosophile jusqu'à l'homme : **les Toll-Like receptors** (TLR). Chaque cellule immunitaire exprime une combinaison particulière de ces récepteurs et les pDC expriment préférentiellement **les TLR7 et -9** qui sont spécialisés dans la

reconnaissance du génome microbien(Jarrossay et al. 2001; Kadowaki et al. 2001). La nature et la fonction de ces récepteurs ainsi que la signalisation intracellulaire induite après leur engagement seront décrites plus tard.

Après activation, la pDC a la capacité de produire **rapidement des quantités massives d'IFN de type I**, ce qui en fait une cellule productrice d'IFN de type I professionnelle. La pDC activée peut en outre **se différencier** en cellule présentatrice d'antigènes avec une **forte capacité co-stimulatrice** en augmentant l'expression de molécules de co-stimulation et dont l'activité principale est la stimulation des lymphocytes T (**Figure 4.C**).

Durant la différenciation de la pDC une transformation morphologique radicale a lieu. Les pDC au repos sont **rondes et lisses (Figure 4.A.)** et acquièrent une **morphologie dendritique** typique après certaines conditions d'activation (**Figure 4.B.**) qui est étroitement associée aux fonctions effectrices spécialisées de ces cellules dans la stimulation des lymphocytes T(Grouard et al. 1997). Plus le nombre de dendrites augmente plus la surface de contact avec les lymphocytes T est importante, renforçant la synapse immunologique(Montoya et al. 2002). Cette morphologie a bien été décrite *in vitro*, en revanche **il n'y a pas eu d'observations publiées in situ**. Cela est dû en partie au fait que les deux marqueurs spécifiques des pDC, BDCA-2 et BDCA-4, ne sont pas utilisables dans ce contexte. En effet, l'expression de **BDCA-2 est diminuée après activation** des pDC et celle de **BDCA-4 est augmentée par les mDC activées**, perdant ainsi toute spécificité pour les pDC(Dzionek et al. 2001). Modifiant leur morphologie plasmocytoïde pour une morphologie dendritique après activation, certains auteurs proposèrent une nouvelle nomenclature pour distinguer les stades des pDC avant et après différenciation (Soumelis and Liu 2006). En effet, un des critères qui définissent ce qu'est une DC est la morphologie dendritique de la cellule. Les cellules à morphologie plasmocytoïde devraient donc être nommées « **plasmacytoid pre-dendritic cell** » et les cellules différenciées « **pDC-derived DC** ». Néanmoins, les chercheurs dans le domaine ne semblent pas avoir adhéré à cette idée et de nombreuses confusions persistent dans la littérature. Pour ma part, j'utiliserai le terme de pDC pour chacun des états en précisant si la

cellule est au repos, est activée avec une morphologie plasmocytoïde ou est différenciée en cellule co-stimulatrice à morphologie dendritique.

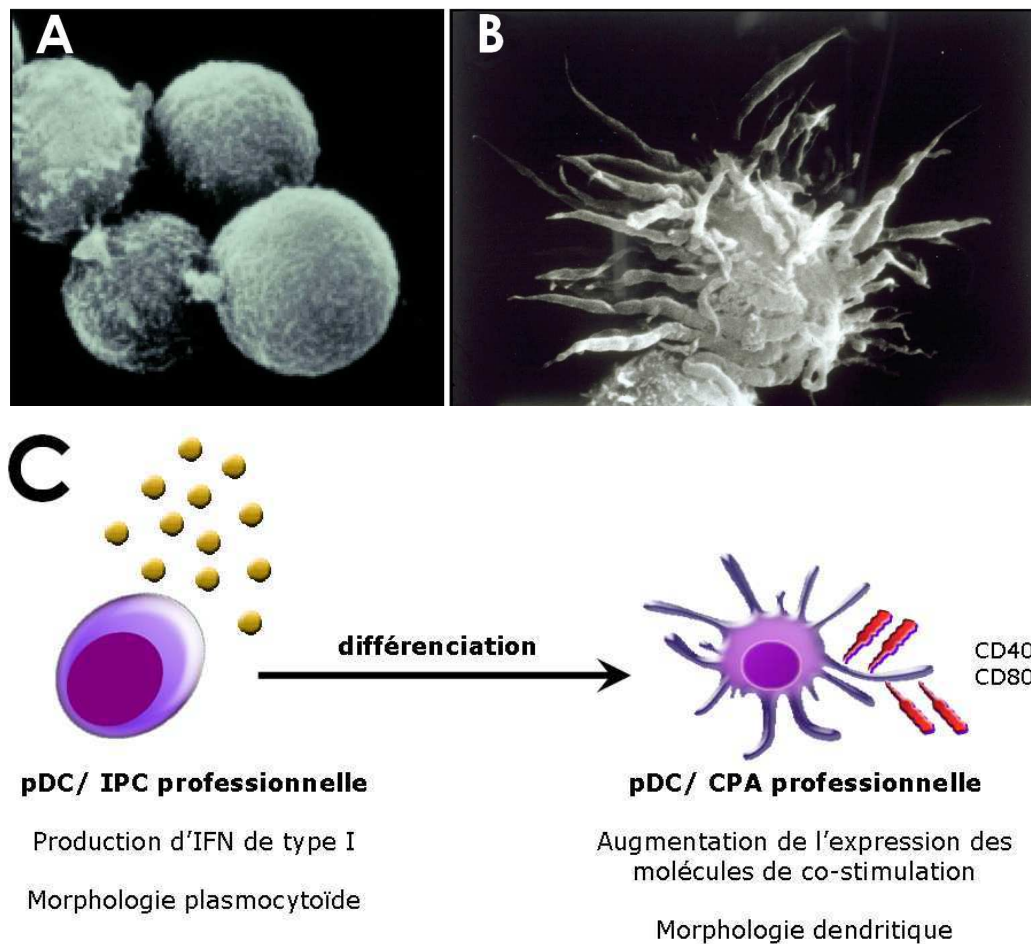


Figure 4. Activation des pDC. (A) pDC circulantes à forme sphérique ; (B) pDC activées par CD40L avec une morphologie type DC. Observations effectuées par microscopie électronique à balayage X 3000. D'après Grouard, et al. J Exp Med, 1997. (C) Les pDC issues du sang ont une morphologie plasmocytoïde et sont capables de produire rapidement de grandes quantités d'IFN de type I (IPC) après activation. Selon la nature du stimulus, elles peuvent en outre se différencier en cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles en augmentant l'expression des molécules de co-stimulation et en acquérant une morphologie dendritique.

L'activation des pDC entraîne une série d'événements moléculaires conduisant à la production d'IFN de type I et/ou à leur différenciation en pDC co-stimulatrice. Différents stimuli microbiens peuvent **induire ces deux types de réponse** comme le virus Herpes simplex, **le virus Influenza** ou encore les oligodeoxynucléotides (ODN) **CpG de type C** (Krug et al. 2001a; Rothenfusser et al. 2002). Cependant, les processus de production d'IFN de type I et de différenciation peuvent être dissociés. L'IL-3 par exemple, permet

d'induire la différenciation des pDC en cellules à morphologie dendritique sans entraîner une production d'IFN de type I (Siegal et al. 1999a). La plus remarquable dichotomie dans l'activation des pDC est celle observée avec certains ligands synthétiques de TLR9. En effet, les ODN **CpG de type B** induisent la **différenciation** des pDC, une production faible voire nulle d'IFN- α et permettent aux pDC de stimuler spécifiquement des lymphocytes T alors que les ODN **CpG de type A** induisent principalement la **production massive d'IFN de type I** et une faible expression des molécules de co-stimulation (Krug et al. 2001a; Jaehn et al. 2008). Une explication possible de ce phénomène sera donnée plus tard. On peut donc penser que **les pDC sont flexibles et adaptent leur mode d'activation** au stimulus qu'elles perçoivent (Iparraguirre et al. 2008).

2. La pDC, une cellule de l'immunité innée via l'IFN- α et TRAIL

Le système immunitaire semble avoir évolué pour avoir des cellules spécialisées dans la lutte contre les trois grands types de microbes que sont les **bactéries**, les **virus** et les **parasites**. Tandis que les monocytes/macrophages et les neutrophiles combattent principalement les bactéries par leur aptitude à phagocyter et à libérer des facteurs bactéricides, les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes sont dévoués à la lutte antiparasitaire. Les pDC, elles, ont la capacité de **contrôler l'infection virale**. Pour cela elles produisent de grandes quantités d'IFN de type I qui ont une action antivirale directe et contribuent à l'activation et au maintien de l'immunité adaptative mise en place contre le virus.

Après activation par un virus, les pDC produisent entre 1 et 2 U d'IFN par cellule ou entre 3 et 10 pg d'IFN par cellule en 24 h, ce qui est **100 à 1000 fois plus** que ce que produit n'importe quelle autre cellule immunitaire (Siegal et al. 1999a). Cette production massive n'est pas due à la présence de transcrits pré-existants pour les IFN de type I puisque leurs ARN messagers sont détectés seulement 4 h après stimulation (Ito et al. 2006). De plus, entre 6 et 12 h après activation, près de 60 % des transcrits produits par les pDC codent pour les **19 sous-types des IFN de type I** : l'IFN- α , - β , - λ , - ω et - τ dont la protéine produite la plus représentée est l'IFN- $\alpha 2$ (Ito et al. 2006).

2.1 IFN et virus

Les IFN de type I produits *in vivo* ont des activités antivirales directes et indirectes en activant à la fois des voies de signalisation intracellulaire dans les cellules infectées et en activant certaines cellules du système immunitaire. Ces IFN inhibent plus d'une étape du cycle de vie des virus : la pénétration du virus dans sa cellule cible et sa décapsidation, la transcription des ARN viraux, la synthèse des protéines virales, la réplication du génome viral et l'assemblage et la libération des virions. La production des protéines induites par l'IFN qui interfèrent avec la réplication virale sera détaillée plus tard.

2.2 IFN, cellules NK et cellules NKT

Les IFN relargués par les pDC **favorisent l'activité cytotoxique** des cellules natural killer (NK) tout en protégeant les cellules non-infectées de la lyse médiée par les cellules NK en leur induisant une augmentation des molécules CMH de classe I (Trinchieri et al. 1978). En contexte d'infection virale, l'activité NK est même **totalelement dépendante de la présence des pDC** (Dalod et al. 2003). En outre, les pDC activées produisent des chimiokines capables d'**attirer spécifiquement les cellules NK** et les lymphocytes T activés (Megjugorac et al. 2004). La coopération des cellules NK avec les pDC permet ainsi une élimination virale précoce.

Il a également été montré, chez la souris, que **les pDC activent les cellules NKT** par la production d'IFN de type I et l'**interaction OX40-OX40L** (Diana et al. 2009). Ces cellules apparentées aux lymphocytes T présentent des glycolipides exogènes et du soi restreints par la molécule CD1d et sont capables d'inhiber l'activation des lymphocytes T CD8 (Bochtler et al. 2008). Une étude a montré, dans des souris infectées par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), que les cellules NKT activées par les pDC permettent ainsi de **diminuer l'immunité adaptative** dans le foie et le pancréas afin de prévenir leur destruction (Diana et al. 2009).

2.3 IFN et immunité adaptative

Concernant l'activation des cellules de l'immunité adaptative par l'IFN produit par les pDC, il a été montré *in vitro* que la déplétion en pDC de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) infectées par Flu abolit la production d'anticorps IgG polyclonaux spécifiques du virus (Jego et al. 2003). Ce sont les **IFN de type I et l'IL-6** produits par les pDC activées qui sont, dans ce modèle, responsables de la **différenciation des lymphocytes B** spécifiques du virus en **plasmocytes** produisant préférentiellement des IgG plutôt que des IgM et ce de façon indépendante de la présence de lymphocytes TH (Poeck et al. 2004). Les IFN relargués par les pDC peuvent également **affecter les lymphocytes T** en induisant leur expression précoce du marqueur d'activation CD69, en augmentant leur durée de vie et en favorisant leur **différenciation en lymphocytes TH1** avec une induction de la production d'IFN- γ (Agnello et al. 2003). De plus, l'activité des pDC a tendance à induire et **maintenir les lymphocytes T mémoires** (Marrack et al. 1999).

2.4 IFN et mDC

Enfin, plusieurs études suggèrent qu'il existe également un cross-talk entre les pDC activées et les mDC. En effet, l'exposition de mDC à de l'IFN de type I à des stades précoces de leur différenciation permet d'**accélérer leur différenciation terminale** (Luft et al. 1998). Les mêmes expériences effectuées sur des monocytes ont mis en évidence leur différenciation en DC avec une capacité à présenter des antigènes (Paquette et al. 1998; Santini et al. 2000). De plus, il a été montré *in vitro* qu'en réponse à une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) les pDC produisent de l'**IFN de type I et du TNF α** et que cette activation **entraîne la maturation des mDC** environnantes (Fonteneau et al. 2004). Par ailleurs, chez la souris, les mDC qui n'expriment pas de récepteurs à l'IFN de type I sont incapables de maturer en réponse à une infection par des virus à ARN (Dalod et al. 2003; Honda et al. 2003). Les pDC activées sont aussi capables de moduler l'immunité adaptative mise en place par les mDC. La présence d'**IFN de type I inhibe la production d'IL-12** par les mDC (Heystek et al. 2003) et **induit la production**

d'IL-10 par les lymphocytes T CD4⁺et CD8⁺ activés et les monocytes(Aman et al. 1996; Curreli et al. 2002).

2.5 Les pDC, des cellules cytotoxiques

Grâce à l'utilisation d'une **lignée de pDC** (qui sera décrite plus tard), notre laboratoire a pu mettre en évidence que la stimulation **des pDC GEN2.2** par Flu ou par des ligands synthétiques de TLR7 et -9 induit leur expression de la molécule **TNF-related apoptosis-inducing ligand** (TRAIL). Elles acquièrent alors une **activité cytotoxique** envers les **cellules infectées et tumorales** qui expriment le récepteur à TRAIL(Chaperot, L. et al. 2006). Des études *in vivo* chez l'homme appuient ces résultats. L'une montre que l'application d'**imiquimod**, un ligand synthétique de TLR7, sur des **carcinomes basocellulaires** (BCC) induit une inflammation locale et leur **régression complète** et que cette activité anti-tumorale est associée à la présence de pDC produisant de l'**IFN-α et exprimant TRAIL**(Stary et al. 2007). D'autres montrent que les pDC induisent l'apoptose de lymphocytes T CD4⁺ de patients séropositifs pour VIH(Hardy et al. 2007; Stary et al. 2009). Par ailleurs, il a été montré qu'en plus de TRAIL les pDC **expriment du granzyme B**, une molécule effectrice des CTL et des cellules NK(Rissoan et al. 2002; Matsui et al. 2009). Cette production participe à l'**inhibition du développement de cellules tumorales**(Matsui et al. 2009). Cependant les pDC n'expriment pas de perforine, ce qui suggère que ces cellules utilisent soit une autre protéine de substitution pour permettre au granzyme B d'atteindre la cellule cible, soit que leur production de granzyme B a une autre fonction biologique que l'activité cytotoxique. Les pDC joueraient donc un rôle important au sein de l'immunité innée, participant à la **clairance rapide des cellules infectées et tumorales** sensibles à l'apoptose induite par TRAIL.

Toutes ces données suggèrent que les pDC sont dévouées à participer à l'**immunité innée antivirale** malgré une récente étude qui montre que les pDC peuvent maturer lors d'une infection bactérienne grâce à la coopération avec les mDC(Piccioli et al. 2009).

3. Capture et présentation d'antigènes par les pDC

3.1 Capture et présentation d'antigènes

Les pDC ont une faible capacité à prendre en charge des antigènes exogènes et à les apprêter. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'**elles n'expriment pas les récepteurs scavengers classiques des DC** : la dectine-1, le récepteur au mannose et DC-SIGN(Meyer-Wentrup et al. 2008; Lui et al. 2009). Certaines études suggèrent que les pDC ne sont **capables de capturer des antigènes exogènes** que **lorsqu'ils sont opsonisés par des immunoglobulines** (Ig) grâce à l'expression de récepteurs au fragment Fc des Ig comme **CD32**(Bave et al. 2003; Bjorck et al. 2008; Parcina et al. 2008). Cependant, il a été montré que, contrairement aux mDC, les pDC ne capturent pas des cellules opsonisées(Lui et al. 2009). Ceci suggère que la capacité de capture des pDC dépend également de la taille des antigènes. Par ailleurs, leur capacité à prendre en charge des complexes immuns est perdue après activation par des ligands de TLR9 de type CpG B et C alors qu'elle reste intacte après stimulation par des CpG A(Benitez-Ribas et al. 2008). Ces derniers résultats suggèrent que les pDC qui se différencient en DC présentent les antigènes capturés avant activation alors que les pDC productrices d'IFN de type I peuvent prendre en charge des antigènes supplémentaires. Par ailleurs, les pDC présentent les antigènes de façon **moins efficace que les mDC** en terme de phagocytose, d'apprêtement et de chargement des peptides sur les molécules CMH de classe II(Grouard et al. 1997; Lui et al. 2009). La voie de présentation antigénique restreinte par les molécules CMH de classe II semble d'ailleurs active seulement pendant la différenciation des pDC activée(Sadaka et al. 2009). De plus, il a été montré chez la souris que les pDC totalement différenciées expriment moins de molécules CMH et de molécules de co-stimulation que les mDC(Asselin-Paturel et al. 2001; Dalod et al. 2003).

3.2 Cross-présentation d'antigènes et activation des lymphocytes T CD8⁺

Le rôle des pDC humaines dans l'induction de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques par présentation directe d'antigènes endogènes a été peu étudié. Néanmoins, en accord avec leur activité antivirale, il a été montré que les pDC sont en fait **capables de stimuler la prolifération de lymphocytes T CD8⁺ mémoires spécifiques d'antigènes viraux** comme Flu (Fonteneau et al. 2003b). Dans un modèle murin, il a été en outre montré que les pDC dans un état activé peuvent induire des CTL fonctionnels spécifiques d'antigènes endogènes mais pas exogènes dans des contextes viraux et tumoraux (Salio et al. 2004; Schlecht et al. 2004).

La **cross-présentation** est un mécanisme crucial permettant l'activation de lymphocytes T CD8⁺ naïfs spécifiques d'antigènes exogènes, élicitant ainsi des réponses immunes protectrices à base de CTL à l'encontre de tumeurs (Huang et al. 1994) ou de pathogènes n'infectant pas directement les cellules présentatrices d'antigènes (Sigal et al. 1999). La cross-présentation a également été décrite comme étant centrale dans le maintien de la tolérance périphérique à l'encontre des antigènes du soi (Kurts et al. 1997). Ce mécanisme consiste en **l'apprêtement et la présentation d'antigènes exogènes par les molécules CMH de classe I**. Cela concerne différentes formes d'antigènes : solubles, particulaires ou associés à des cellules. Ce processus diffère de la voie classique où les molécules CMH de classe I présentent des antigènes issus de protéines synthétisées de façon endogène. La cross-présentation a lieu après transport de l'antigène depuis l'endosome vers le cytoplasme via la protéine SEC61 et après digestion par le protéasome. Les peptides ainsi formés sont transportés dans le reticulum endoplasmique (RE) via les protéines TAP. D'autres mécanismes alternatifs ont été décrits, comme le chargement des molécules CMH de classe I directement dans les phagosomes contenant les antigènes endocytés ou le transport des antigènes exogènes vers le RE (Rock and Shen 2005).

Plusieurs études effectuées chez la souris ont montré que les pDC n'étaient **pas ou peu capables de cross-présenter** des antigènes exogènes (Schlecht et al. 2004; Sapoznikov et al. 2007). Cependant, dans certaines conditions cette

activité a été mise en évidence : en ciblant les pDC avec l'antigène, en les mettant en présence d'une grande fréquence de lymphocytes T spécifiques ou en les activant préalablement avec des ODN CpG(Zhang et al. 2006). Néanmoins, la capacité des pDC à cross-présenter *in vivo* n'est pas établie. Shnurr *et al.* ont démontré que des complexes immuns comprenant des antigènes exogènes dérivés de mélanome couplés à des immunoglobulines sont efficacement présentés à des CTL spécifiques par les mDC primaires humaines mais pas par les pDC(Schnurr et al. 2005). De plus, une étude a démontré dans un modèle murin que les pDC orchestrent la mise en place de l'immunité anti-tumorale en activant les cellules NK et les mDC, et que **la cross-présentation d'antigènes tumoraux est médiée par les mDC**(Liu et al. 2008). Cependant en 2007, Hoeffel *et al.* ont apporté la preuve que les pDC humaines sont capables de **cross-présenter des peptides dérivés de VIH** couplés à un lipopeptide ainsi que dérivés de cellules infectées en apoptose(Hoeffel et al. 2007). Ce mécanisme est **médié par BDCA-2** qui prend en charge les antigènes. De façon surprenante, dans ce protocole expérimental les pDC cross-présentent l'antigène aussi bien que les mDC. Cette cross-présentation est augmentée par l'infection par Flu suggérant un **rôle possible de l'IFN de type I**. Elle est dépendante de l'activité du protéasome, ce qui signifie que les antigènes sont transportés passivement ou activement vers le cytosol. Plus récemment, notre laboratoire a démontré que les pDC non stimulées sont capables de cross-présenter des antigènes issus de la capture de cellules infectées par Flu(Lui et al. 2009). La voie précise de cross-présentation utilisée par les pDC reste donc à être définie.

En somme, la capacité de cross-présentation d'antigènes par les pDC me semble être **réduite au contexte d'infection virale**. L'absence de facteurs activateurs et/ou de production d'IFN de type I en contexte tumoral pourrait alors expliquer l'incapacité de ces cellules à cross-présenter des antigènes tumoraux.

4. Activation et induction de la polarisation des lymphocytes T CD4⁺

Contrairement à ce qui a pu être parfois publié (peut-être à cause de contaminations cellulaires par des mDC), les pDC humaines ne produisent que **très peu d'IL-12p70** (Ito et al. 2006). Elles produisent des quantités modérées **d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α** , et ne produisent pas ou peu d'IL-1 α , d'IL-1 β , d'IL-3, d'IL-10, d'IL-15, d'IL-18, d'IFN- γ , de lymphotoxine- α ou de GM-CSF au niveau protéique après activation virale. De plus, **au repos** les pDC ont un faible niveau d'expression de CD86 et **n'expriment pas les autres molécules de co-stimulation** CD80, CD83 et CD40. Ceci ne leur permet pas de stimuler la prolifération de lymphocytes T naïfs ni d'induire la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes effecteurs T Helper (TH) (Grouard et al. 1997; Krug et al. 2003). Les pDC fraîchement isolées du sang induisent même parfois **l'anergie des lymphocytes T CD4⁺** de façon antigène-spécifique (Kuwana 2002).

En revanche, une fois activées elles augmentent l'expression des molécules CMH de classe II et l'apprêtement d'antigènes, up-régulent leur expression des molécules de co-stimulation et produisent différentes cytokines pro-inflammatoires ce qui les rend très flexibles dans la mise en place des réponses immunes par **l'induction de différentes polarisations des lymphocytes T CD4⁺** (Grouard et al. 1997; Liu et al. 2001) (**Figure 5**). Les pDC activées peuvent non seulement induire efficacement la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ déjà activés (Krug et al. 2003) mais ont également montré leur **capacité à stimuler des lymphocytes T CD4⁺ naïfs** *in vivo* dans un modèle d'infection par VIH (Fonteneau et al. 2004). Cependant leur capacité à activer des lymphocytes T naïfs semble restreinte à certains organes, les ganglions lymphatiques ayant été démontrés comme le terrain le plus favorable (Sapoznikov et al. 2007). Le signal d'activation reçu par les pDC a un impact direct sur l'environnement dans lequel sera présenté l'antigène, conduisant alors à des **profils distincts de différenciation** des lymphocytes T naïfs.

4.1 Les lymphocytes TH1 et TH2

Les pDC activées par Flu peuvent conduire la réponse immune vers une **polarisation TH1** en induisant la **production d'IFN- γ** par les lymphocytes T (Cella et al. 2000) ou TH1-like en induisant des lymphocytes T producteurs d'IFN- γ et d'IL-10(Kadowaki et al. 2000). Il a été suggéré que cette polarisation **dépend de l'IFN de type I** produit par les pDC et est **indépendante de l'IL-12**(Kadowaki et al. 2000). Ces résultats soulignent la présence de deux systèmes capables d'induire une polarisation TH1 chez l'homme : les mDC activées par des bactéries et leur production d'IL-12 et les pDC activées par des virus et leur production d'IFN de type I. Dans une étude, les pDC activées par CD40L pré-incubées avec de l'IL-3 sont également capables d'induire des lymphocytes TH1(Cella et al. 2000). Cependant une étude antérieure aurait montré que les pDC activées par **CD40L et IL-3** induisent une modeste **polarisation TH2** de lymphocytes T allogéniques et ce de façon indépendante de l'IL-4(Rissoan et al. 1999). De plus, une autre étude montre que les pDC activées par CD40L et IL-3 qui expriment à leur surface la molécule de **co-stimulation OX40L** et produisent peu d'IFN de type I induisent préférentiellement les lymphocytes T à produire les **cytokines TH2 : IL-4, IL-5 et IL-13**, par un mécanisme dépendant de OX40L(Ito et al. 2004). Les mêmes auteurs proposent que **l'IFN de type I** produit par les pDC après activation virale **masque l'effet induit par OX40L** et permet ainsi de développer des lymphocytes TH1. Etant donné que plusieurs de ces études montrent une production d'IL-12 par les pDC incubées avec de l'IL-3 qui est utilisé pour maintenir leur viabilité(Cella et al. 2000; Krug et al. 2001b), l'on peut se demander si les résultats discordants obtenus à propos de la polarisation TH2 ne sont pas dus à une **contamination cellulaire dans l'isolement des pDC**.

4.2 Les lymphocytes Treg

Les lymphocytes T régulateurs (**Treg**) CD4⁺CD25⁺ expriment le facteur répresseur transcriptionnel Forkhead box P3 (**Foxp3**), produisent souvent de **l'IL-10 et/ou du TGF- β** et sont capables de supprimer à la fois les réponses

immunes TH1 et TH2. Deux sous-populations principales de Treg existent : 1) les **Treg naturels** qui se développent dans le **thymus** et sont spécifiques d'**antigènes du soi** et 2) les **Treg induits** qui proviennent de la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en **périphérie** et sont spécifiques d'**antigènes de l'environnement** présentés par des DC produisant de l'IL-10 et/ou du TGF- β (Workman et al. 2009). De plus, on peut distinguer les lymphocytes Treg induits TH3 et Tr1 qui produisent soit du TGF- β soit de l'IL-10 respectivement (Cottrez and Groux 2004; Bacchetta et al. 2005). Une étude a montré que les **pDC activées** par différentes classes d'ODN CpG peuvent **induire aussi des lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺** produisant de l'IL-10, du TGF- β , de l'IFN- γ , de l'IL-6 mais pas ou peu d'IL-2 et d'IL-4 (Moseman et al. 2004). Néanmoins aucune production d'IL-10 ou de TGF- β par les pDC activées par ces ODN CpG n'a pu être détectée (Moseman et al. 2004). Ces résultats, ainsi que ceux obtenus par d'autres équipes, indiquent que les pDC sont des DC avec une **capacité naturelle** pour l'induction de la tolérance immune mais selon un **mécanisme différent** de celui connu utilisé par les mDC (Gilliet and Liu 2002; Kuwana 2002). Ce n'est que récemment qu'une équipe a démontré que les pDC humaines convertissent des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Treg grâce à l'expression intracellulaire de l'enzyme **indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)**, un enzyme qui catabolise la **dégradation du tryptophane** (Chen et al. 2008). La déprivation du milieu en cet acide aminé essentiel et la formation du métabolite intermédiaire kynurenine sont à la base du **développement des lymphocytes Treg** (Mellor and Munn 2004). Dans un autre modèle, l'activation des pDC par VIH induit leur expression d'IDO et engendre subséquemment la suppression de l'immunité, caractéristique de cette infection (Boasso et al. 2007; Manches et al. 2008). Il avait été précédemment démontré chez la souris que l'induction de l'expression d'IDO dans les pDC est dépendante à la fois de l'engagement de ses molécules de co-stimulation par CTLA-4 Ig, CD200-Ig et CD28-Ig et de la présence de cytokines comme l'IFN- γ et l'IFN de type I (Fallarino et al. 2005). Les mécanismes qui régissent l'expression d'IDO chez les pDC humaines restent néanmoins à être explorés. Par ailleurs, il a été montré dans un modèle murin

que les **pDC des muqueuses digestives** sont capables de **supprimer les réponses T CD4⁺ et CD8⁺** de façon antigène spécifique (Goubier et al. 2008). Cette suppression participe à la mise en place de la tolérance orale envers des antigènes exogènes. Ce processus n'est cependant pas dû directement à l'induction de lymphocytes Treg mais à une délétion spécifique des effecteurs par les pDC (Dubois et al. 2009). Le mécanisme de délétion utilisé par les pDC reste à être déterminé.

4.3 Les lymphocytes TH17

Récemment plusieurs études ont établi que les DC produisant de l'IL-1 β , de l'IL-6, de l'IL-23, du TNF- α et/ou du TGF- β induisent la différenciation d'une nouvelle population de lymphocytes TH CD4⁺ sécrétant de **l'IL-17A** nommés **TH17** (Acosta-Rodriguez et al. 2007a; Acosta-Rodriguez et al. 2007b; Wilson et al. 2007; Korn et al. 2009). Ces lymphocytes TH17 produisent également de **l'IL-17F, de l'IL-22 et de l'IL-26** et expriment le facteur de transcription **ROR γ t**. Les lymphocytes TH17 contribuent à la défense de l'organisme contre les pathogènes infectieux extracellulaires mais causent également des **pathologies auto-immunes** (Langrish et al. 2005; Annunziato et al. 2007; Korn et al. 2009). Savoir si une telle polarisation des lymphocytes peut être induite par les pDC reste à être étudié. Une équipe a cependant montré que les pDC activées par un ligand synthétique de TLR7 induisent la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes TH produisant séquentiellement de l'IL-10, de l'IFN- γ et de l'IL-17A (Lombardi et al. 2009). Plus récemment, une nouvelle sous-population de lymphocytes **TH cutanés mémoires** produisant de **l'IL-22 mais pas d'IL-17** ni d'IFN- γ a été décrite. La différenciation de ces cellules à partir de lymphocytes T CD4⁺ naïfs a été démontrée comme étant **médiée par les pDC** de façon dépendante de l'IL-6 et du TNF α (Duhén et al. 2009). Ces cellules seront peut-être nommées **lymphocytes TH22** s'il est démontré qu'ils constituent une sous-population de lymphocytes TH à part entière.

4.4 Synthèse

Toutes ces données suggèrent que les pDC ont une grande flexibilité dans l'induction de tous les profils de polarisation des lymphocytes T CD4⁺ connus (**Figure 5**). Il reste désormais à élucider les mécanismes responsables de la polarisation des lymphocytes TH par les pDC qui semblent être différents de ceux mis en jeu par les mDC. Très récemment, une étude a apporté la preuve de l'existence de **deux sous-types de pDC** en se basant sur l'expression forte ou faible de **CD2** (Matsui et al. 2009). Les deux sous-types de pDC ont la même capacité à produire de l'IFN de type I en réponse à Flu. En revanche, les **pDC CD2^{high}** expriment plus de molécules de co-stimulation, produisent de **l'IL-12p40** et sont plus efficaces dans l'induction de la prolifération de lymphocytes T naïfs allogéniques. Ce travail soulève donc la question de savoir si les **différents profils fonctionnels** observés décrits ci-dessus peuvent être dûs à l'activité de **différents sous-types de pDC**.

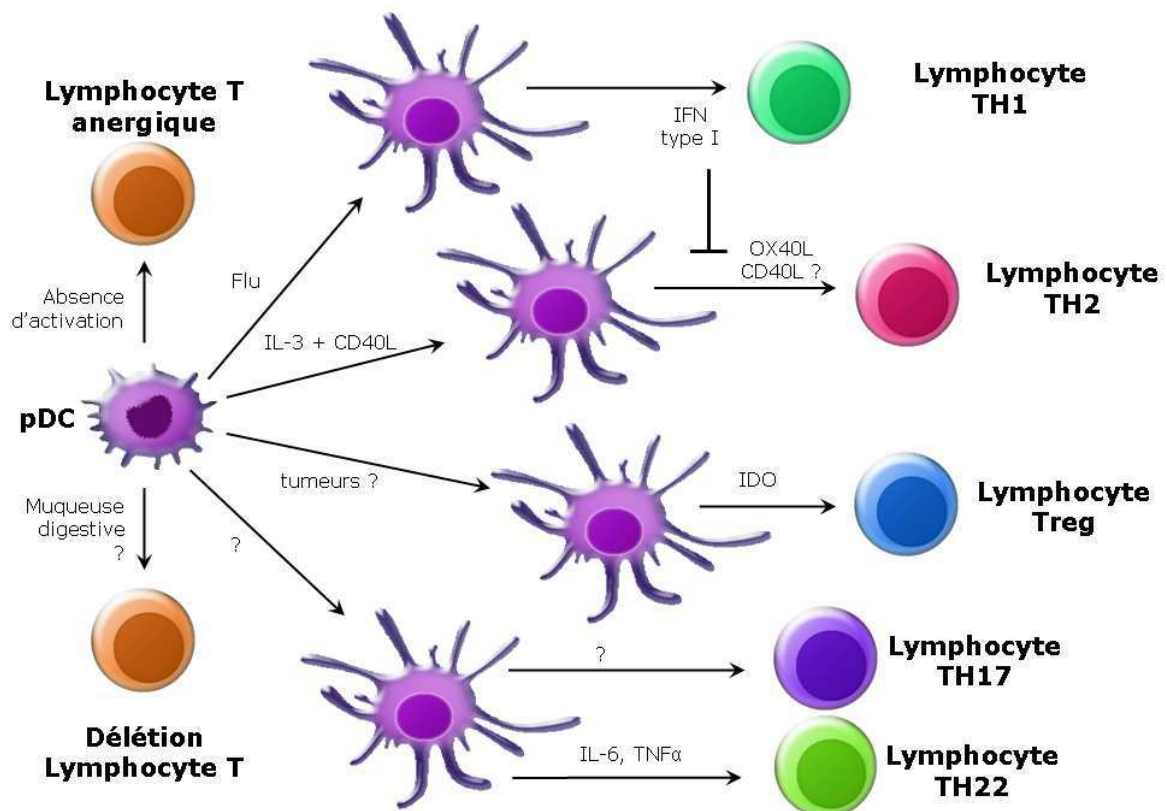


Figure 5. Polarisation de l'immunité par les pDC. Les pDC ont une grande plasticité dans l'induction de la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Au repos elles induisent l'anergie des lymphocytes T mais une fois activées elles les conduisent vers une différenciation en lymphocytes T Helper (TH) ou Treg. Selon les cytokines ou

facteurs que les pDC expriment, la polarisation des lymphocytes TH est différente. La production d'IFN de type I conduit à une polarisation TH1 et inhibe la polarisation TH2 qui, elle, nécessite l'engagement d'OX40L et de CD40L. La présence de l'enzymeIDO dans la pDC va favoriser la génération de lymphocytes Treg. Le mode d'induction des lymphocytes TH17 n'est pas connu mais celui des lymphocytes TH produisant uniquement de l'IL-22 (TH22) est dépendant de l'IL-6 et du TNF α .

Compte-tenu de toutes les données présentées dans cette partie et comme nous le verrons plus tard dans ce manuscrit, les pDC ont un **rôle important** à jouer dans la **lutte antivirale** au niveau des tissus les plus exposés à une infection. C'est pourquoi elles sont présentes de façon physiologique dans les **muqueuses des voies aériennes et digestives**. Par ailleurs, leur capacité à entrer de façon constitutive dans les **ganglions lymphatiques**, vitrine du danger potentiel présent en périphérie, pourrait leur permettre **d'acquérir la capacité de migrer** vers les autres tissus en cas d'infection. Là, certaines pDC auraient **une action antivirale locale** en produisant de **l'IFN de type I** tandis que d'autres matureraient en **APC** pour mettre en place une **immunité adaptative** au niveau des organes lymphoïdes secondaires.

Un **trafic différent** de ces cellules pourrait être suivi dans un **contexte autoimmun ou tumoral**.

II. Les voies de signalisation impliquées dans l'activation des pDC

A) Les voies de signalisation des Pattern Recognition Receptors

Les pDC s'activent au contact des différents stimuli microbiens regroupés sous le nom de **PAMP** (Pathogen associated molecular patterns). Les senseurs cellulaires capables de reconnaître ces motifs du non-soi sont appelés **Pattern-Recognition Receptors** ou **PRR**. Ces PRR sont localisés à la surface cellulaire et dans les endosomes (ex : **les TLR**, Toll-Like receptors) pour reconnaître les **pathogènes extracellulaires** ou dans le cytoplasme (ex : **RIG-1**, retinoic-acid inducible gene 1) pour détecter les **pathogènes intracellulaires**. Je vais décrire ci-après les voies de signalisation induites après engagement des différents PRR exprimés par les pDC afin de comprendre le mode d'activation de ces cellules.

1. Les PRR cytoplasmiques

L'observation que presque toutes les cellules nucléées peuvent produire des IFN de type I après infection virale ou en réponse à de l'ARN double brin dans le cytoplasme, même en l'absence de TLR endosomaux et de leurs adaptateurs, suggère qu'il existe **un système senseur indépendant** qui détecte les **acides nucléiques dans le cytosol**. En effet, 3 gènes ont été identifiés chez l'homme : **RIG-I** (Yoneyama and Fujita 2007), **MDA5** et **LGP2** (Stetson and Medzhitov 2006). Ce groupe de protéines est appelé **RLH** pour **RIG-I-like helicases**. Les RLH sont des ARN hélicases à boîte DEXD/H et RIG-I et MDA5 contiennent également un domaine de recrutement de caspase (CARD) en N-terminal. Ces récepteurs, via leur domaine hélicase en

C-terminal, **fixent l'ARN double brin** poly(rI :rC), poly(rA :rU)(Yoneyama et al. 2005) et, dans le cas de RIG-I, l'ARN 5'-triphosphate(Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006) qui sont **présents dans les génomes viraux** ou dans les intermédiaires de réplication. Par leur domaine **CARD**, les RLH interagissent avec un adaptateur central, **l'IPS1**(Kawai et al. 2005), qui assemble un complexe signalétique contenant **TRAF3, TBK1 et IKKε**, et active **IRF3** pour induire la **production d'IFN de type I**(Kawai and Akira 2006). Même si ce système permet aux cellules de répondre aux infections virales, il a été démontré avec des souris déficientes pour RIG-I que les **pDC** produisent de l'IFN de type I de façon **indépendante des RLH**(Kato et al. 2005). Le système RLH des pDC est néanmoins fonctionnel comme le démontre une récente étude(Kumagai et al. 2009). Ceci peut expliquer les résultats obtenus par certaines équipes qui ont montré que les pDC activées par différents virus à ARN pouvaient produire de l'IFN de type I de façon indépendante du TLR7(Hornung et al. 2004; Barchet et al. 2005). L'activation du TLR7 ou -9 et la boucle autocrine positive de l'IFN de type I produit que nous développerons après contournent donc le besoin des pDC en un système cytosolique de détection de la réplication virale et leur permettent ainsi de s'activer avant d'être infectées(Kumagai et al. 2009).

D'autres composants intracellulaires de détection des acides nucléiques sont capables d'induire une réponse pro-inflammatoire. C'est le cas des récepteurs **NLR (NOD-like receptors)** qui, en réponse à l'ARN double brin, sont capables de recruter un complexe protéique **activant la caspase-1** et conduisant à la **maturation de l'IL-1β**(Kanneganti et al. 2007). Ils constituent ce qu'on appelle **l'inflammasome**(Petrilli et al. 2007). Cependant, **aucune donnée n'a mis en évidence la formation d'inflammasome dans la pDC**. Par ailleurs la **PKR**, qui est induite par l'IFN, permet la reconnaissance d'ARN 5' triphosphate double brin avec de courtes boucles. Néanmoins certaines études ont démontré que les pDC répondent à l'infection virale de façon **indépendante de la PKR**(Hornung et al. 2004; Barchet et al. 2005).

En somme, les pDC qui sont spécialisées dans la reconnaissance et la réponse aux virus semblent **utiliser préférentiellement le système TLR** pour leur activation.

2. Les TLR

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I de la famille du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) qui possèdent un **domaine N-terminal** extracellulaire riche en répétitions leucine (**LRR**) pour la **fixation du ligand**, un seul domaine transmembranaire et un **domaine C-terminal intracellulaire de signalisation**. Le domaine C-terminal est homologue au domaine intracellulaire de l'IL-1R et est donc référencé comme domaine Toll/IL-1R (**TIR**). Les TLR sont exprimés à la surface cellulaire et dans des compartiments subcellulaires comme l'endosome. Les TLR sont exprimés largement dans beaucoup de types cellulaires incluant les cellules endothéliales et épithéliales mais l'on retrouve souvent qu'un seul type de TLR par type cellulaire. En revanche les cellules hématopoïétiques expriment les **10 TLR différents** qui ont été identifiés chez l'homme (13 chez la souris)(Beutler 2004). De façon intéressante, les différentes sous-populations de DC expriment des sets différents de TLR. Ainsi, contrairement aux **mDC** qui expriment principalement les **TLR1, -2, -3, -4, -5, -6 et -8**, les **pDC** expriment de façon prédominante les **TLR7 et -9 (Tableau 2)**. En accord avec ces profils d'expression, les **mDC et monocytes** sont capables de **reconnaître les produits bactériens** : peptidoglycane (ligand de TLR2), acide lipotéichoïque (TLR2) et lipopolysaccharide (LPS, TLR4), alors que les **pDC** s'activent en présence de **l'ADN (TLR9)** et **l'ARN simple brin (TLR7)** des **génomés viraux**(Jarrossay et al. 2001; Kadowaki et al. 2001). Même si l'expression du TLR3 par les mDC leur permet de reconnaître l'ADN double brin viral(Matsumoto et al. 2003), il semblerait que les DC se soient spécialisées au cours de l'évolution dans la reconnaissance d'un type de pathogène : les mDC reconnaissant les bactéries et les pDC répondant aux virus.

Tableau 2. Expression des TLR par les différentes sous-populations de DC humaines et par les monocytes. +, ++, ± et – indiquent l'expression relative de l'ARNm de chaque TLR.

| | pDC | mDC | monocyte |
|-------|-----|-----|----------|
| TLR1 | ± | + | ++ |
| TLR2 | - | + | ++ |
| TLR3 | - | ++ | - |
| TLR4 | - | + | ++ |
| TLR5 | - | + | + |
| TLR6 | + | + | + |
| TLR7 | ++ | - | - |
| TLR8 | - | ++ | ++ |
| TLR9 | ++ | - | - |
| TLR10 | ± | + | - |

D'après Liu, Ann Rev Immunol, 2005.

2.1 Nature et fonction des TLR7 et -9

Tout comme le TLR3, les **TLR7 et -9** ont une expression intracellulaire et sont localisés au niveau du reticulum endoplasmique et des **endosomes/lysosomes** où ils sont chargés de la reconnaissance des composants génomiques microbiens (Ito et al. 2002).

Le **TLR7** reconnaît les **ARN simple brin riches en uridine et/ou guanosine** dérivés des virus à ARN comme Flu, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou le virus de la maladie de Newcastle (NDV) (Heil et al. 2003; Diebold et al. 2004; Lund et al. 2004). Le TLR7 reconnaît également une classe de composants antiviraux synthétiques comme les **imidazoquinolines** et la loxoribine (Hemmi et al. 2002), ainsi que le composant azoquinoline R848 (Jurk et al. 2002). Ces composants synthétiques sont structurellement apparentés aux acides nucléiques de type guanosines. De façon intéressante, **l'ARN de mammifère** qui contient beaucoup de **nucléosides modifiés** (méthylation, isomérisation, thiolation...) a une capacité stimulatrice du TLR7 significativement plus faible que l'ARN microbien (Kariko et al. 2005), car l'hôte

mammifère utilise, en plus de la **compartmentalisation du TLR7** dans les endosomes, la **modification de nucléosides** comme un moyen de **distinguer l'ARN endogène de celui dérivé de pathogènes**.

Le **TLR9**, lui, reconnaît **l'ADN bactérien** contenant des dinucléotides **CpG non méthylés** dans un contexte de bases particulier (GTCGTT) appelés **motifs CpG** (Hemmi et al. 2000). Cependant, il a été démontré que le TLR9 exprimé par la pDC reconnaît aussi les motifs CpG des ADN viraux comme les virus de l'Herpes simplex 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) (Takeshita et al. 2001; Lund et al. 2003; Krug et al. 2004). Récemment le paradigme de la **reconnaissance du motif CpG** par le TLR9 a été **contesté**. En effet, la plupart des études sur la biologie du TLR9 ont été effectuées en utilisant des ODN synthétiques conçus à partir d'un squelette phospho-thioate (**PS**) 2' deoxyribose alors que les ADN naturels ont un squelette phospho-diester (**PD**) 2' deoxyribose (**Figure 6**). Une étude montre que la dépendance de l'activation TLR9 au motif CpG est **restreinte au squelette PS** des ODN synthétiques (Haas et al. 2008). En effet, le squelette PS sans bases azotées agit comme un **antagoniste** du TLR9 mais devient un **puissant stimulateur** lorsqu'il porte des **motifs CpG**. Par ailleurs, le squelette PD de l'ADN naturel peut se fixer au TLR9 **quelle que soit la séquence en bases azotées** mais avec une faible avidité. Le squelette sucré de l'ADN est donc un **élément déterminant** dans sa reconnaissance par le TLR9. Néanmoins la discrimination faite par les pDC entre les ADN naturels issus du soi ou de pathogènes repose sur le motif CpG (Wagner 2008; Coch et al. 2009). En effet, de façon similaire à l'activité du TLR7, la **faible fréquence de motifs CpG** et le fort taux de méthylation de l'ADN de mammifère préviennent sa reconnaissance par le TLR9 dans des circonstances physiologiques. De plus, la **localisation endosomale du TLR9** est critique dans la **discrimination entre l'ADN du soi et du non-soi** puisque, contrairement à l'ADN microbien, l'ADN de l'hôte ne transite pas par les compartiments endosomaux en conditions normales (Barton et al. 2006).

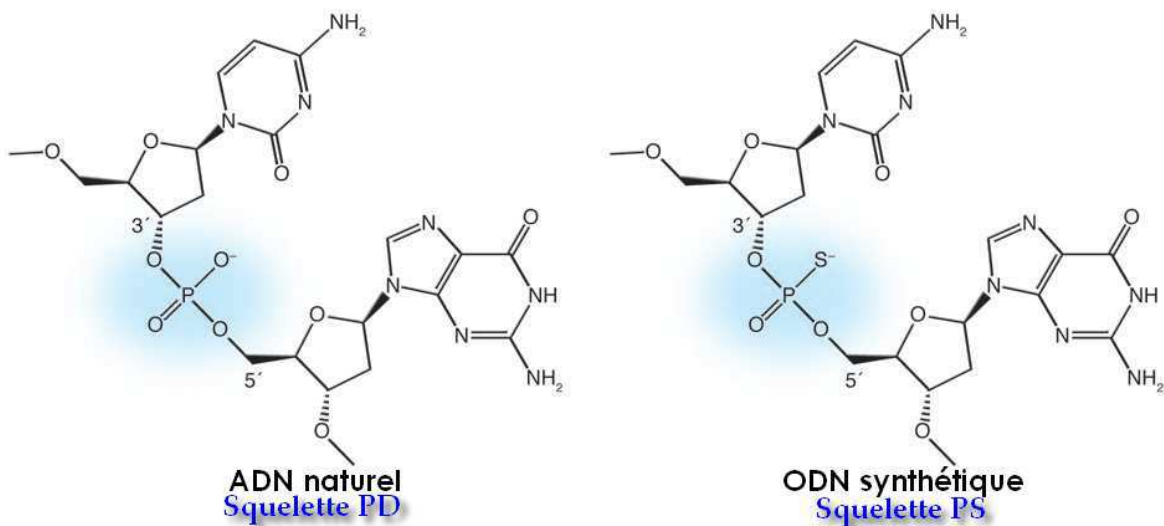


Figure 6. Squelette des ADN naturels et modifiés. Les ODN à squelette phosphothioate (PS) diffèrent des ODN naturels à squelette phosphodiester (PD) seulement au niveau de la substitution d'un atome d'oxygène par un atome de soufre. Ce changement augmente la stabilité des ODN *in vivo*, leur demi-vie passant de quelques minutes à quelques jours. D'après Krieg. AM, J Clin Invest, 2007.

2.2 Trafic cellulaire des TLR7 et -9 et leur ligand

En absence de PAMP, le **TLR9** réside dans le réticulum endoplasmique (RE) des pDC au repos et il n'est **dirigé vers le compartiment endosomal** qu'après **exposition à un agoniste** (Latz et al. 2004). Le transport des TLR7 et -9 vers les endosomes et leur activation subséquente requiert la protéine transmembranaire **UNC93B1** qui est localisée au niveau du RE et interagit spécifiquement avec les TLR3, -7 et -9 (Tabeta et al. 2006; Brinkmann et al. 2007; Kim et al. 2008). UNC93B1 est néanmoins plus affiné pour le TLR9 que pour le TLR7 (Fukui et al. 2009) et les patients déficients pour cette protéine présentent une altération de la production d'IFN de type I en contexte d'infection par HSV-1 (Casrouge et al. 2006). La protéine chaperonne **gp96** peut également interagir avec ces TLR et semble jouer un rôle dans leur fonction (Yang et al. 2007). Il reste désormais à déterminer comment ces protéines chaperonnes peuvent **détecter la présence d'acides nucléiques** pour **initier le transport des TLR** vers les endosomes.

Par ailleurs, la façon dont les différents ligands sont acheminés vers les endosomes pour leur reconnaissance par les TLR7 et -9 est mal comprise. En effet, contrairement aux mDC, les **pDC** n'ont pas ou **peu d'activité phagocytaire** (Dalgaard et al. 2005; Lui et al. 2009) et n'expriment pas les

récepteurs scavengers classiques des DC. Plusieurs études ont montré que l'activation des pDC par des virus à ARN ou ADN est **altérée en présence de chloroquine**, un inhibiteur de l'acidification endosomale(Lund et al. 2003; Lund et al. 2004; Barchet et al. 2005), suggérant que la **dégradation de la capsid virale** est primordiale pour l'accès des TLR à leur ligand. Néanmoins, s'il est probable que **les virus induisent activement leur endocytose** par la cellule se retrouvant alors dans des compartiments endosomaux/lysosomaux acides, le **trafic cellulaire** emprunté par les **ligands synthétiques** pour atteindre ces endosomes **reste à définir**. Récemment une étude chez la souris a démontré que l'**autophagie**, un processus cellulaire autonome permettant le recyclage de produits cataboliques et la dégradation homéostatique des organelles par la **formation de vésicules intracellulaires (autophagosomes)**, joue un rôle dans le transfert des ARN viraux vers les endosomes pour leur reconnaissance par le TLR7(Lee et al. 2007). Cependant les pDC murines déficientes pour l'expression de la protéine associée à l'autophagie **ATG5** (autophagy-related protein 5) gardent la capacité de produire de l'IL-12p40 en réponse à des agonistes de TLR9, suggérant qu'il existe **plusieurs voies de trafic** pour les **ligands de TLR endosomaux** chez la pDC(Reis e Sousa 2007).

2.3 Signalisation induite par l'engagement des TLR7 et -9

Il a été montré que la **fixation d'un ligand** sur le TLR9 induit un **changement conformationnel** du domaine signalétique intracytoplasmique conduisant au **recrutement de molécules adaptatrices**(Latz et al. 2007). Cette modification allostérique n'a pas été pour le moment démontrée pour le TLR7. Cependant, après engagement d'un ligand, les TLR7 et 9 activés s'associent avec une protéine adaptatrice appelée **MyD88** via l'interaction avec son domaine TIR(Akira and Takeda 2004). MyD88 est une molécule adaptatrice clé qui va permettre le recrutement d'un complexe multiprotéique transducteur de signal composé de **IRAK-4**(Yang, K. et al. 2005), **TRAF-6**(Hacker et al. 2006) et **IRF-7**(Kawai et al. 2004) (**Figure 7**). Des études récentes suggèrent que la **BTK** serait également un facteur constituant ce complexe(Jefferies et al. 2003; Sochorova et al. 2007). IRF7 est activé par ubiquitylation par l'activité

ubiquitine E3 ligase de TRAF6 et par phosphorylation par IRAK4(Kawai et al. 2004). Le facteur **IRF7 activé** interagit avec **TRAF3**(Honda et al. 2004), **IKK α** (Hoshino et al. 2006), **IRAK1**(Uematsu et al. 2005), **l'osteopontine** (Shinohara et al. 2006) et probablement la **PI3K**(Guiducci et al. 2008). Ces protéines participent à sa **translocation dans le noyau** par un mécanisme inconnu où il joue un rôle central dans **l'initiation de la transcription des gènes codant pour l'IFN de type I**(Honda et al. 2005b). Par ailleurs, la voie PI3K-Akt initie la formation du complexe protéique **mTORC1** composé de mTOR et des protéines Raptor et LST8. La voie PI3K-mTOR serait à l'origine de l'activation de **S6K**, une kinase participant à la formation du complexe MyD88 avec le TLR9(Cao et al. 2008). En somme, **PI3K et mTOR** sont des facteurs clés dans l'induction de la **translocation d'IRF7** et donc la **transcription des gènes codant pour l'IFN de type I** et participent à l'initiation d'une **boucle d'amplification** en facilitant l'activation de MyD88(Costa-Mattioli and Sonenberg 2008).

De façon simultanée, **TAK-1** est ubiquitinylée par TRAF6(Deng et al. 2000) au niveau du complexe transducteur de signal. TAK1 active alors la voie de signalisation de **NF- κ B** en phosphorylant le complexe IKK composé de **IKK- α , IKK- β et IKK- γ** . Ce complexe activé phosphoryle à son tour I κ B qui est ensuite ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. L'hétérodimère **p50-p65** de la voie canonique NF- κ B est alors libéré et **transloque dans le noyau**(Akira and Takeda 2004). TAK1 active également la voie de signalisation des **MAPK**(Wang et al. 2001) dont la **p38MAPK** conduisant à la phosphorylation de facteurs de transcription nucléaires comme **AP1**(Akira and Takeda 2004). Les voies **NF- κ B et MAPK** induisent toutes les deux la **transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines et les molécules de co-stimulation**(Osawa et al. 2006).

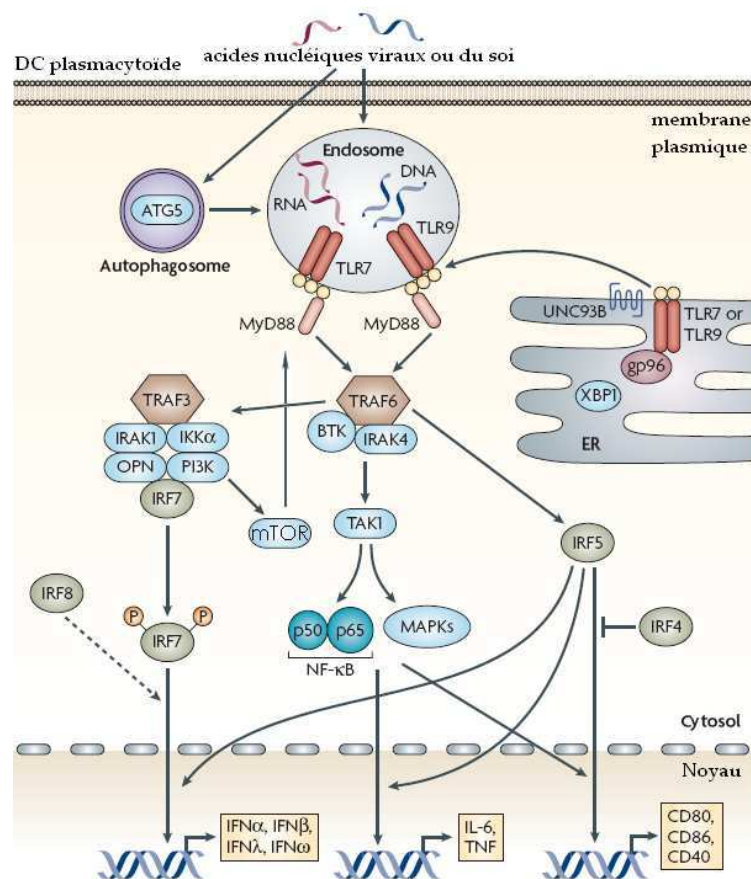


Figure 7. Voies de signalisation induites par la reconnaissance d'acides nucléiques par les pDC. Les pDC au repos expriment de façon prédominante les TLR7 et -9 qui sont localisés au niveau du RE en association avec les protéines UNC93B1 et gp96. Après exposition à des acides nucléiques viraux, les TLR7 et -9 sont dirigés vers les endosomes afin de pouvoir reconnaître leurs ligands ARN ou ADN. Les autophagosomes, formés constitutivement dans les pDC via ATG5, participent probablement au transfert des agonistes vers les TLR endosomaux. Le changement conformationnel des TLR induit par la fixation des ligands permet l'activation de MyD88 et son association ultérieure avec TRAF6, BTK et IRAK4. Ce complexe protéique active IRF7, TAK1, NF- κ B et IRF5 conduisant à l'activation de différentes voies de signalisation en aval. Le facteur IRF7 qui est activé par le complexe protéique composé de TRAF3, IRAK1, IKK α , de l'osteopontine et de la PI3K, est transloqué dans le noyau pour initier la transcription des IFN de type I (comme l'IFN- α , - β , - λ et - ω). PI3K active également la voie mTOR qui participe à cette translocation mais dont le mécanisme n'est pas connu et facilite la formation du complexe TLR/MyD88. L'IRF8, même s'il n'est pas impliqué dans la production initiale de l'IFN de type I, permet d'augmenter cette production par un mécanisme de rétrocontrôle positif. TAK1 induit l'activation de NF- κ B et des MAPK et, comme IRF5, conduit à la production des cytokines pro-inflammatoires et l'expression des molécules de co-stimulation. L'IRF4 inhibe la fonction d'IRF5 par compétition directe. Adapté de Gilliet *et al.*, Nat Rev Immunol, 2008.

Dans la plupart des cellules, la production d'IFN- α dépend de **l'engagement du récepteur à l'IFN de type I (IFNAR)** par l'IFN- β , qui permet **l'induction de l'expression d'IRF7** (Taniguchi and Takaoka 2002). Cependant

les pDC expriment **constitutivement IRF4, IRF7 et IRF8** (Ito et al. 2006). Le taux élevé d'IRF7 endogène leur permet alors de produire rapidement de l'IFN de type I en réponse à un stimulus et ce de façon indépendante d'une présensibilisation médiée par l'engagement de l'IFNAR (Barchet et al. 2002). L'observation faite chez la souris que les pDC expriment de faibles taux des répresseurs transcriptionnels 4E-BP, qui sont responsables de la régulation de la traduction d'IRF7, pourrait expliquer l'expression constitutive d'IRF7 dans ces cellules (Colina et al. 2008). Il a été montré chez la souris qu'en plus de l'IRF7, l'**IRF5** interagit directement avec MyD88 et permet la **transcription des gènes des IFN de type I** et des **cytokines pro-inflammatoires** après activation des TLR (Yanai et al. 2007). Enfin, le facteur **IRF4**, qui est en **compétition avec IRF5** mais pas avec IRF7 pour s'associer à MyD88, **régule la production de cytokines** induite par la stimulation TLR (Takaoka et al. 2005). Les voies de signalisation induites après stimulation des TLR7 et -9 sont résumées dans la figure 7.

2.4 Signalisation différentielle induite par les ligands des TLR7 et -9

Les oligonucléotides synthétiques riches en CpG sont des **séquences immunostimulatrices** (immunostimulatory sequences, **ISS**) qui engagent le TLR9. Les ODN-ISS sont le plus souvent synthétisés avec un squelette phosphothioate pour leur conférer une résistance aux nucléases et augmenter leur demi-vie. Il existe **trois différentes classes** d'ODN-ISS, **les CpG A, B et C**. Ils diffèrent à la fois en terme de séquence et en terme d'activité biologique. En effet, les **CpG B simple brin** induisent peu de production d'IFN- α par les pDC et une **différenciation importante** avec l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation, à l'opposé, les **CpG multimériques de classe A** sont **d'excellents inducteurs d'IFN- α** par les pDC bien qu'ils stimulent peu leur différenciation (Kerkmann et al. 2003). De plus, les CpG B activent fortement les lymphocytes B en leur induisant une prolifération, l'augmentation de molécules de co-stimulation et la production d'IL-6, alors que les CpG A ont une activité stimulatrice limitée sur ces cellules (Kerkmann et al. 2005). Les **CpG double brin de classe C** combinent les propriétés des CpG de classe A et B,

étant de **forts inducteurs d'IFN- α** et de **différenciation des pDC** et de forts activateurs des lymphocytes B (Hartmann, G. et al. 2003). **L'activation différentielle** des pDC après engagement du TLR9 par ces ODN-ISS est due à la **structure tridimensionnelle** et à la **localisation subcellulaire** des ODN CpG. En effet, il a été montré que les **CpG de classe A** multimériques forment des agrégats et sont localisés au niveau des **endosomes précoces** alors que les **CpG B** monomériques sont transportés vers les **endosomes tardifs** et les compartiments lysosomaux. Ainsi, après fixation au TLR9, ils induisent sans doute l'activation de facteurs signalétiques différents conduisant aux différents phénotypes décrits ci-dessus (Honda et al. 2005a; Guiducci et al. 2006).

Concernant l'engagement du TLR7, aucune réelle démonstration n'a été effectuée pour mettre en avant l'existence d'une signalisation différentielle possible. Néanmoins plusieurs études ont fait état de **différents phénotypes** possibles après **activation de pDC par des ligands de TLR7** (Berghofer et al. 2007; Birmachu et al. 2007). Une étude utilisant des cellules HEK transfectées avec le TLR7 a d'ailleurs montré que la quantité minimale de ligand nécessaire pour l'induction de la production d'IFN de type I est plus importante que celle requise pour la production d'IL-8 (Wang, J. P. et al. 2006). De plus cette étude démontre que la **structure tridimensionnelle** du génome viral **importe pour l'activation du TLR7** des pDC. En effet, le virus Flu à ARN négatif d'une taille totale de 2 kb induit davantage de production d'IFN de type I que le virus de la Dengue à ARN positif d'une taille de 11 kb. Par ailleurs, une autre équipe a observé que les **agonistes synthétiques de TLR7** permettent d'induire une **plus forte production d'IFN de type I** par des PBMC lorsqu'ils sont **complexés avec le lipide cationique DOTAP** (Heil et al. 2004). Enfin, une étude a montré que les ligands naturels et synthétiques de TLR7 inhibent la production d'IFN de type I par les pDC activées par les CpG A et C (Berghofer et al. 2007). Néanmoins, ces ligands n'interfèrent pas dans l'activation des pDC induite par les CpG B. Il reste à déterminer si les ligands de TLR7 constituent des antagonistes de TLR9 ou si les TLR7 et -9 engagés entrent en compétition pour le recrutement des molécules adaptatrices.

Toutes ces données suggèrent que **les ligands** peuvent **se fixer sur les TLR7 et -9** à des **endroits différents** dans le système endosomo-lysosomal, conduisant à des **cascades de signalisation différentes** en aval.

2.5 Régulation de l'activation TLR des pDC

Au vu de la capacité des IFN de type I à activer les systèmes immunitaires innés et adaptatifs, **la réponse IFN doit être contrôlée** pour éviter une réponse immune aberrante qui pourrait endommager les organes de l'hôte comme dans le psoriasis, une maladie auto-immune. Pour cela, les pDC expriment une panoplie de **récepteurs de surface** avec leur propre voie de signalisation capable de **moduler la production cytokinique (Figure 8)**.

BDCA2, un récepteur lectine de type C (CLR), a été le premier récepteur démontré comme pouvant, après engagement, **supprimer la capacité** des pDC à **produire de l'IFN de type I** en réponse à des ligands de TLR (Dzionek et al. 2001). Il a été montré qu'un autre récepteur spécifique des pDC humaines, l'**ILT7**, dont le **ligand BST2** a été récemment identifié (Cao et al. 2009), est capable **d'inhiber la production d'IFN de type I** et des cytokines pro-inflammatoires par les pDC activées par des agonistes de TLR7 et -9 (Cao et al. 2006). **BDCA2 et ILT7** s'associent tous les deux avec **FcεR1γ** et induisent une voie de signalisation via un motif **ITAM** (Cao et al. 2007). L'engagement d'IgE sur son récepteur engendre également une diminution de la production d'IFN de type I induite par l'activation CpG des pDC humaines (Novak et al. 2004; Schroeder et al. 2005).

D'autres récepteurs qui signalisent via des motifs ITAM ont été montrés comme ayant un effet inhibiteur similaire. La fixation d'IgG sur le récepteur **FcγRIIA (CD32)** diminue la production d'IFN-α par les pDC activées (Bave et al. 2003; Green et al. 2004). Le cross-linking de NKp44, un récepteur associé à la protéine adaptatrice à motif ITAM DAP12, inhibe la production d'IFN induit par les ODN CpG (Fuchs et al. 2005). Chez la souris, le cross-linking de Siglec H, un autre récepteur associé à DAP12 exprimé par les pDC murines, réduit la production d'IFN de type I *in vitro* et *in vivo* (Blasius et al. 2006). Il a été démontré que ces récepteurs induisent dans la pDC l'activation d'une **voie**

de signalisation similaire à celle utilisée par le BCR des lymphocytes B (Cao et al. 2007). En effet, l'engagement de ces récepteurs membranaires active les protéines tyrosine kinases de la famille **SRC** comme **LYN** et **SYK** et deux adaptateurs signalétiques spécifiques des lymphocytes B : **BLNK** et **BCAP** (Cao et al. 2007; Rock et al. 2007). De plus, il a été démontré que le recrutement de SYK induit l'activation d'un complexe composé de **BLNK, BTK et de PLC γ 2** conduisant à une mobilisation importante du **calcium intracellulaire**. Il a déjà été montré qu'un **flux calcique tonique** peut **inhiber la signalisation TLR** par l'induction d'une activation continue de la serine phosphatase calcineurine. La calcineurine activée interagirait avec MyD88, empêchant son association avec les TLR. Par ailleurs, PDC-TREM, un récepteur membranaire récemment découvert spécifiquement exprimé par les pDC qui se lie à la plexine A1, est activé par fixation de son ligand endogène la sémaphorine 6D pour induire l'activation médiée par DAP12 de la PI3K et de ERK1 et -2 (Watarai et al. 2008). Ceci conduit à une augmentation de la production d'IFN- α (Watarai et al. 2008). D'après Ivashkiv *et al.*, une mobilisation tonique de calcium est engendrée par des récepteurs de faible avidité (Ivashkiv 2008). Au contraire, les récepteurs à motif ITAM de haute avidité induisent un **flux calcique transitoire** et activent **fortement les voies NF- κ B et MAPK** (Ivashkiv 2008). Cette signalisation agit en **synergie avec celle induite par l'engagement TLR** et permet alors une production de cytokines (Ivashkiv 2009). Les différents effets des récepteurs associés à la signalisation DAP12 sur la capacité sécrétrice d'IFN de type I des pDC requièrent donc davantage d'investigation. La régulation de l'activation TLR des pDC par l'engagement des récepteurs de surface est résumée sur la figure 8.

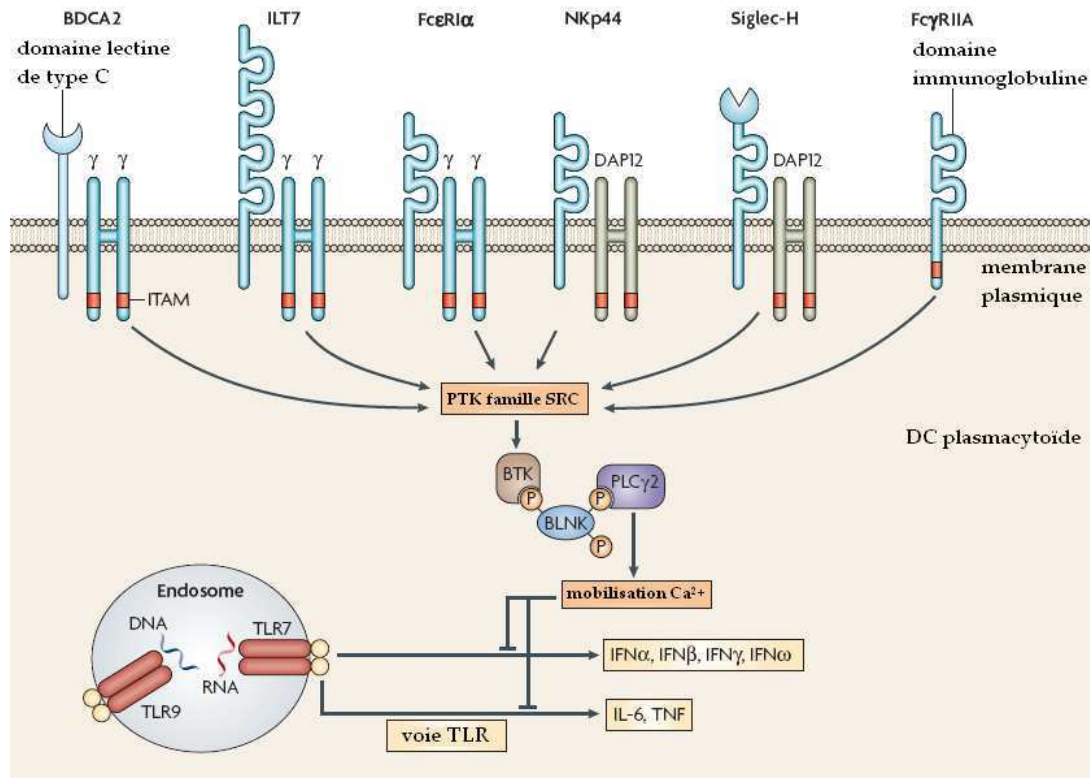


Figure 8. Mécanismes de contrôle de la signalisation TLR par les PRR membranaires.

Trois récepteurs de surface des pDC humaines, BDCA2, ILT7 et FcεRIα s'associent avec la chaîne γ de FcεRI qui contient un motif ITAM. Les récepteurs humains NKp44 et murins Siglec-H se fixent à une autre protéine adaptatrice contenant un motif ITAM, DAP12. Ces complexes de récepteurs ou les récepteurs avec un motif ITAM intrinsèque tels que FcγRIIA signalisent via ITAM en activant une voie de signalisation similaire à celle du BCR impliquant des protéines tyrosines kinases (PTK) de la famille SRC comme SYK. Ces kinases activent un complexe protéique formé de BLNK, BTK et la PLCγ2 qui induit une mobilisation calcique cytosolique. La voie de signalisation en aval du calcium n'est pas bien connue mais interfère avec la signalisation des TLR7 et-9 conduisant à l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I. *Adapté de Gilliet et al., Nat Rev Immunol, 2008.*

Dernièrement, il a été montré que les récepteurs P2Y, des récepteurs couplés à une protéine G, stimulés par des nucléotides tels que l'ATP, l'ADP et le glucose-UDP diminuent la sécrétion d'IFN-α par les pDC humaines activées par Flu et CpG A (Shin et al. 2008). L'utilisation d'anticorps dirigés contre **BDCA-4** semble également **inhiber la production d'IFN-α** induite par stimulation virale des pDC mais de façon moins importante que ce qui a été observé avec des anticorps anti-BDCA-2 (Grage-Griebenow et al. 2007). Par ailleurs, une étude récente démontre que les pDC expriment le CLR **DCIR** et que son engagement par des anticorps induit la **diminution de la production d'IFN de type I** sans altérer la production de cytokines pro-inflammatoires et

l'expression de molécules de co-stimulation après activation des cellules par un ligand TLR9 (Meyer-Wentrup et al. 2008). Au contraire, l'engagement par cross-linking des protéines **CD300a et -c**, exprimées par différentes populations hématopoïétiques dont les pDC, induit une **diminution de la production de TNF α** et une augmentation de la production d'IFN- α par les pDC humaines activées par des ODN CpG (Ju et al. 2008). Ces dernières études suggèrent donc que l'engagement de **récepteurs membranaires** entraîne l'activation de différentes voies **régulant positivement ou négativement** la signalisation induite par la **stimulation TLR des pDC**. De plus, il semblerait que certains de ces récepteurs favorisent la maturation de la pDC avec une production de cytokines pro-inflammatoires au détriment d'une activation conduisant à la production d'IFN de type I. Ceci rappelle les dichotomies observées, précédemment décrites, dans l'activation des pDC. Plusieurs études étayent cette thèse en démontrant que l'engagement des CLR comme BDCA2 et DCIR par des anticorps couplés à des antigènes permet l'endocytose de l'antigène, son apprêtement et sa présentation et entraîne en parallèle l'inhibition de la production d'IFN de type I, favorisant ainsi la stimulation spécifique de lymphocytes T CD4⁺ par les pDC (Jaehn et al. 2008; Meyer-Wentrup et al. 2008).

B) Les voies de signalisation du récepteur de l'IFN de type

I

Les **IFN de type I** appartiennent à la classe II des cytokines à hélices α qui incluent les IFN de type II (IFN- γ), les IFN- λ , l'IL-10 et différents homologues d'IL-10 (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26) (Pestka et al. 2004). Les IFN de type I constituent une famille cytokinique de plusieurs membres (IFN- α , - β , - ϵ , - κ , - ω , - δ et - τ) dont les IFN- δ et - τ ne sont pas retrouvés chez l'homme, l'IFN- ϵ est produit par le placenta et l'IFN- κ est exprimé par les kératinocytes (Kotenko and Langer 2004). D'un point de vue immunologique, **les IFN- α et - β** sont donc les **principaux sous-types d'intérêt**. L'IFN- β est représenté par un seul

membre alors qu'il existe une vingtaine de gènes IFN- α dont 13 codent pour des polypeptides fonctionnels. Récemment des **IFN de type III** ont été décrits, nommés **IFN- λ 1, - λ 2 et - λ 3** ou IL-28A, IL-28B et IL-29 respectivement (Kotenko et al. 2003). Même s'ils sont fonctionnellement similaires aux IFN de type I, les IFN- λ n'utilisent pas le récepteur à l'IFN- α (IFNAR) mais un récepteur hétérodimérique composé de la sous-unité R1 qui fixe le ligand (IL-28R) et la sous-unité R2 (IL-10R2) commune aux récepteurs de l'IL-10, l'IL-22 et l'IL-26 (Kotenko et al. 2003; Sheppard et al. 2003). Ce récepteur est exprimé par peu de cellules, suggérant que les IFN de type III ont une action ciblée sur quelques sous-populations cellulaires (Zhou et al. 2007; Ank et al. 2008). Même si les pDC sont capables de produire de l'IFN- λ après stimulation par Flu ou des agonistes des TLR7 et -9, la fonction des IFN de type III reste à être étudiée (Coccia et al. 2004) et les voies de signalisation qu'ils induisent semblent proches de celles induites par les IFN de type I (Bonjardim et al. 2009). Je vais donc décrire ci-après les voies de signalisation induites par les IFN- α et - β chez la pDC.

1. La signalisation induite par les IFN- α/β

L'IFN- α et l'IFN- β partagent le même récepteur hétérodimérique exprimé de façon ubiquitaire, composé des sous-unités **IFNAR1** et **IFNAR2**. Plusieurs données suggèrent que la sous-unité IFNAR2 est la chaîne qui fixe le ligand mais les deux chaînes sont requises pour la transduction du signal (Stark et al. 1998). La fixation des IFN- α/β sur ces récepteurs de haute affinité ($K_d = 10^{-9} - 10^{-11}$) entraîne la dimérisation du récepteur et l'auto- et transphosphorylation des deux protéines tyrosines kinases de la famille Janus associées au récepteur : **Tyk2 sur IFNAR1 et JAK1 sur IFNAR2** (Stark et al. 1998) (**Figure 9**). La phosphorylation des Janus kinases résulte en la phosphorylation d'une tyrosine du domaine intracellulaire d'IFNAR1 et permet de **recruter STAT2** via son domaine SH2. STAT2 est alors phosphorylé et sert de plateforme pour le **recrutement et la phosphorylation de STAT1** sur son résidu tyrosine à la position 701 (**Tyr701**) (Darnell 1997). L'acétyltransférase CBP/p300 est ensuite recrutée en se fixant sur deux résidus phospho-serines (aa364 et aa384) de l'IFNAR2 et acétyle la chaîne du récepteur sur la lysine 399 (Tang et al. 2007). Cette

acétylation crée un site d'amarrage pour **IRF9** qui s'associe également au récepteur permettant la formation du complexe hétérotrimérique **ISGF3**(Stark et al. 1998; Tang et al. 2007). IRF9, STAT1 et STAT2 sont ensuite **acétylés** et le complexe est **transloqué dans le noyau** où il se fixe sur des séquences consensus régulatrices appelées **ISRE** en amont des **gènes induits par l'IFN** dont il initie la transcription. Une autre voie peut être induite par les IFN de type I avec formation d'un **homodimère de STAT1** qui stimule la transcription des gènes contenant des **séquences GAS**(Platanias and Fish 1999). La signalisation induite par l'IFN de type I induit également une phosphorylation de STAT1 sur le résidu sérine en position 727 (**Ser727**) de son domaine C-terminal. Cette phosphorylation n'est pas nécessaire pour la translocation du complexe ou pour sa fixation sur les ISRE mais est essentielle pour son **activité transcriptionnelle**(Wen et al. 1995). Une étude sur des cellules murines a montré que la **PKC- δ** est capable d'entraîner une telle phosphorylation(Uddin et al. 2002). Des études faites dans d'autres modèles cellulaires montrent que la phosphorylation Ser727 de STAT1 est **médiée par la CamKII**(Nair et al. 2002) ou encore la **PI3K**(Nguyen et al. 2001). La manière dont STAT1 est complètement activé semble donc dépendre du type cellulaire. Une fois dans le noyau, les protéines STAT interagissent avec des protéines co-activatrices qui jouent un rôle dans la régulation de la transcription comme BRG1(Huang et al. 2002). De plus, il a été montré que l'activité histone-déacétylase (HDAC) est requise pour la transcription des gènes dépendants de l'IFN(Chang et al. 2004), HDAC1 s'associant avec STAT1 et STAT2(Nusinzon and Horvath 2003).

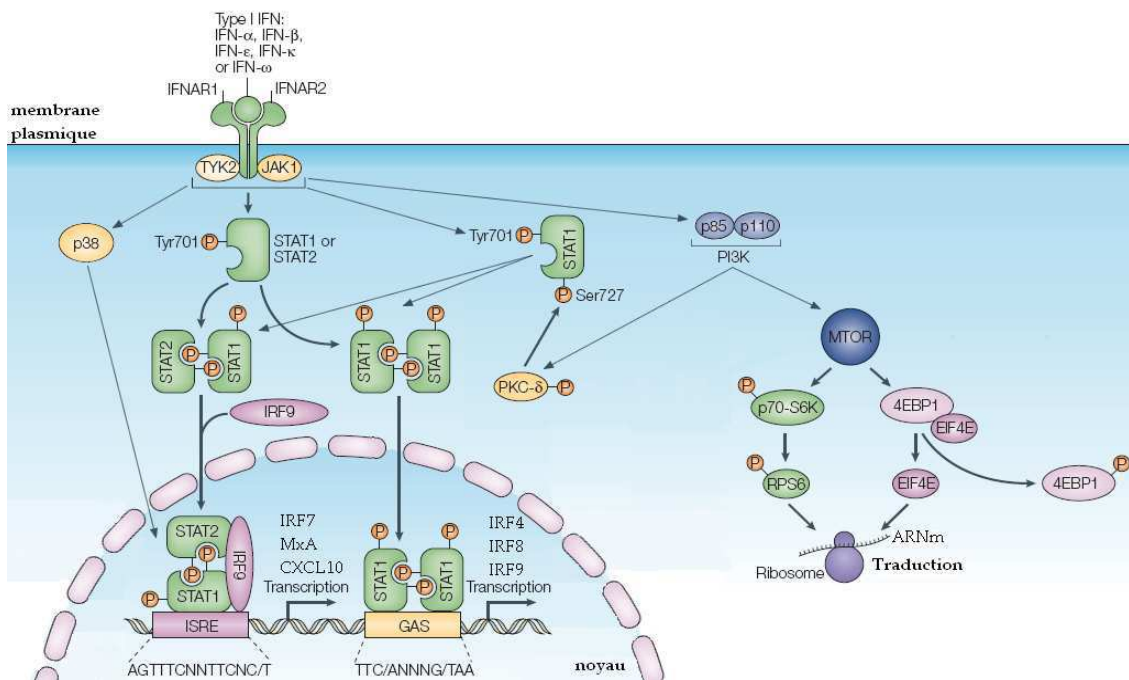


Figure 9. Les voies de signalisation induites par l'IFN de type I. Tous les IFN de type I (IFN- α , - β , - ϵ , - κ et - ω) se fixent à un récepteur commun appelé IFNAR. Le récepteur à l'IFN de type I est composé de deux sous-unités, IFNAR1 et IFNAR2, qui sont associées avec les kinases TYK2 et JAK1 respectivement. L'engagement du récepteur entraîne l'activation des JAK kinases qui phosphorylent à leur tour STAT2 et STAT1 sur les résidus tyrosines 701, conduisant à la formation du complexe STAT1-STAT2-IRF9 appelé ISGF3. Ce complexe transloque dans le noyau et se fixe sur les séquences ISRE pour initier la transcription des gènes ISG comme IRF7, MxA ou CXCL10. L'activation de l'IFNAR induit également la formation d'homodimères STAT1-STAT1 qui, une fois dans le noyau, fixent les séquences GAS pour initier la transcription d'autres gènes ISG comme IRF4, IRF8 ou IRF9. D'autres facteurs que les protéines STAT sont activés après fixation des IFN de type I par leur récepteur comme la p38MAPK et la PI3K. La sérine kinase p38 active différents facteurs de transcription qui agissent en collaboration avec les protéines STAT alors que la PI3K est responsable de l'activation de la voie mTOR qui régule la traduction protéique et de l'activation de la PKC- δ qui phosphoryle STAT1 sur le résidu sérine 727. Cette dernière phosphorylation joue un rôle important dans la fonction transcriptionnelle de STAT1. *Adapté de Plataniis et al., Nat Rev Immunol, 2005.*

En plus des protéines STAT, les IFN de type I induisent l'activation d'autres facteurs de transcription. En effet, après **engagement du récepteur IFNAR**, les kinases **PI3K**(Uddin et al. 1997; Kaur et al. 2005), **MEK/ERK2**(David et al. 1995) et **p38MAPK**(Uddin et al. 2000; Katsoulidis et al. 2005) sont activées de façon indépendante de la voie JAK-STAT et sont impliquées dans **l'activation des facteurs NF- κ B**(Yang et al. 2001; Kaur et al. 2005), **CREB/ATF-1**(Sousa et al.

2005), **AP1** (Katsoulidis et al. 2005), **IRF4**, **IRF8** et le facteur Ets **PU.1** (Kanno et al. 2005). Ces facteurs de transcriptions initient l'expression de gènes soit de façon indépendante en se fixant sur des sites de type EIRE soit en collaboration avec des membres de la famille STAT. Une étude a démontré que l'activation de la voie PI3K par l'engagement du récepteur à l'IFN de type I conduit également à **l'activation de la voie mTOR** et donc au contrôle de la **traduction des ARNm** (Lekmine et al. 2003). Cependant, le rôle de ces facteurs dans la signalisation IFN semble dépendre du type cellulaire et très peu de données ont été établies chez la pDC. Les différentes voies de signalisation induites par les IFN de type I sont résumées dans la figure 9.

Les gènes exprimés en aval de la signalisation induite par les IFN de type I sont nommés **ISG** (IFN-stimulated genes). Parmi ces ISG l'on retrouve les gènes codant pour **l'IRF7**, **MDA5** et **RIG-I** qui vont pouvoir induire davantage la **production d'IFN de type I**, et les gènes codant pour **STAT1**, **STAT2** et **IRF9** qui vont **augmenter la signalisation induite par l'IFN de type I** (van Boxel-Dezaire et al. 2006). Cette caractéristique a été illustrée dans des études montrant que le pré-traitement à l'IFN de type I des pDC accélère l'activation et la maturation des cellules au contact de Flu (Honda et al. 2003; Phipps-Yonas et al. 2008). D'autres ISG ont un rôle dans la réponse anti-virale, ainsi l'IFN produit par la pDC activée va induire l'expression de **MxA** et **CXCL10** qui vont **interférer avec la réplication virale** et **recruter des effecteurs immuns** sur le site d'infection respectivement (Gurney et al. 2004; Megjugorac et al. 2004). Une autre étude a montré que l'IFN- α permet de maintenir les pDC dans un état au repos et d'augmenter leur viabilité et leur migration vers les chimiokines produites dans les ganglions lymphatiques CCL19, CXCL11 et CXCL12 (Cicinnati et al. 2009). Enfin il a été suggéré que l'IFN produit après activation des pDC par des ligands de TLR induit leur expression de **TRAIL** par un **mécanisme autocrine** (Chaperot, L. et al. 2006) et leur confère une activité cytotoxique contre les cellules infectées. La production d'IFN par les pDC induit également l'expression de TRAIL par les cellules environnantes (Kemp et al. 2003). Toutes ces données démontrent que la **signalisation IFN** est nécessaire pour **l'activité antivirale de la pDC** après stimulation TLR.

2. Le contrôle de la signalisation IFN

Pour éviter une sur-activation de l'immunité par les IFN de type I, une régulation de cette signalisation est nécessaire (**Figure 10**). Il a été récemment démontré chez les macrophages et DC que les **récepteurs TAM** à domaine tyrosine kinase jouent un **rôle régulateur négatif des voies TLR** et des voies induites par les récepteurs à cytokine (Lu and Lemke 2001; Lemke and Rothlin 2008). Cet effet inhibiteur est contrôlé par la voie TLR-IFNAR-STAT1 qui augmente l'expression du récepteur TAM **AXL** (Rothlin et al. 2007). AXL s'accumule ensuite à la membrane, **s'associe à l'IFNAR** et usurpe la signalisation JAK-STAT1 après engagement par l'IFN de type I pour induire la **transcription de SOCS1 et SOCS3** (Yoshimura et al. 2007). Les protéines SOCS vont finalement interagir avec les parties cytoplasmiques des TLR et des récepteurs à cytokine, **inhibant leur signalisation** (Yoshimura et al. 2007). Les protéines SOCS contiennent un domaine SH2 qui leur permet de se fixer sur les résidus tyrosines phosphorylés du récepteur à l'IFN de type I activé (Fenner et al. 2006). De plus **SOCS1** peut se fixer directement sur **JAK1** et conduire soit à sa **dégradation par le protéasome** soit à **l'inhibition de son activité kinase** par son domaine KIR situé en N-terminal (Sasaki et al. 1999; Yoshimura et al. 2007).

Par ailleurs, il a été démontré chez les macrophages qu'il existe un dialogue entre les récepteurs à domaine ITAM et la voie de signalisation IFN de façon similaire au dialogue décrit précédemment existant entre les récepteurs ITAM et les TLR (Ivashkiv 2008). En effet, la signalisation induite par l'engagement de faible avidité d'un récepteur ITAM comme FcR γ conduit à l'activation de SYK et peut entraîner l'induction d'un **fort flux calcique** activant des kinases dépendantes du calcium comme **CamKII** et **PYK2**. PYK2 peut s'associer à JAK1 et l'activer, **augmentant alors la phosphorylation de STAT1** (Wang et al. 2008). Au contraire, l'engagement de FcR γ par des ligands de haute avidité induit le recrutement de la phosphatase SHP2 sur l'IFNAR de façon dépendante de la PKC β et δ et augmente son activité catalytique, inhibant alors la signalisation induite par les IFN de type I (Du et al. 2005).

Néanmoins, aucune de ces données n'a été pour le moment réellement démontrée dans les pDC. Les mécanismes de contrôle des voies de signalisation induites par les IFN de type I sont résumés dans la figure 10.

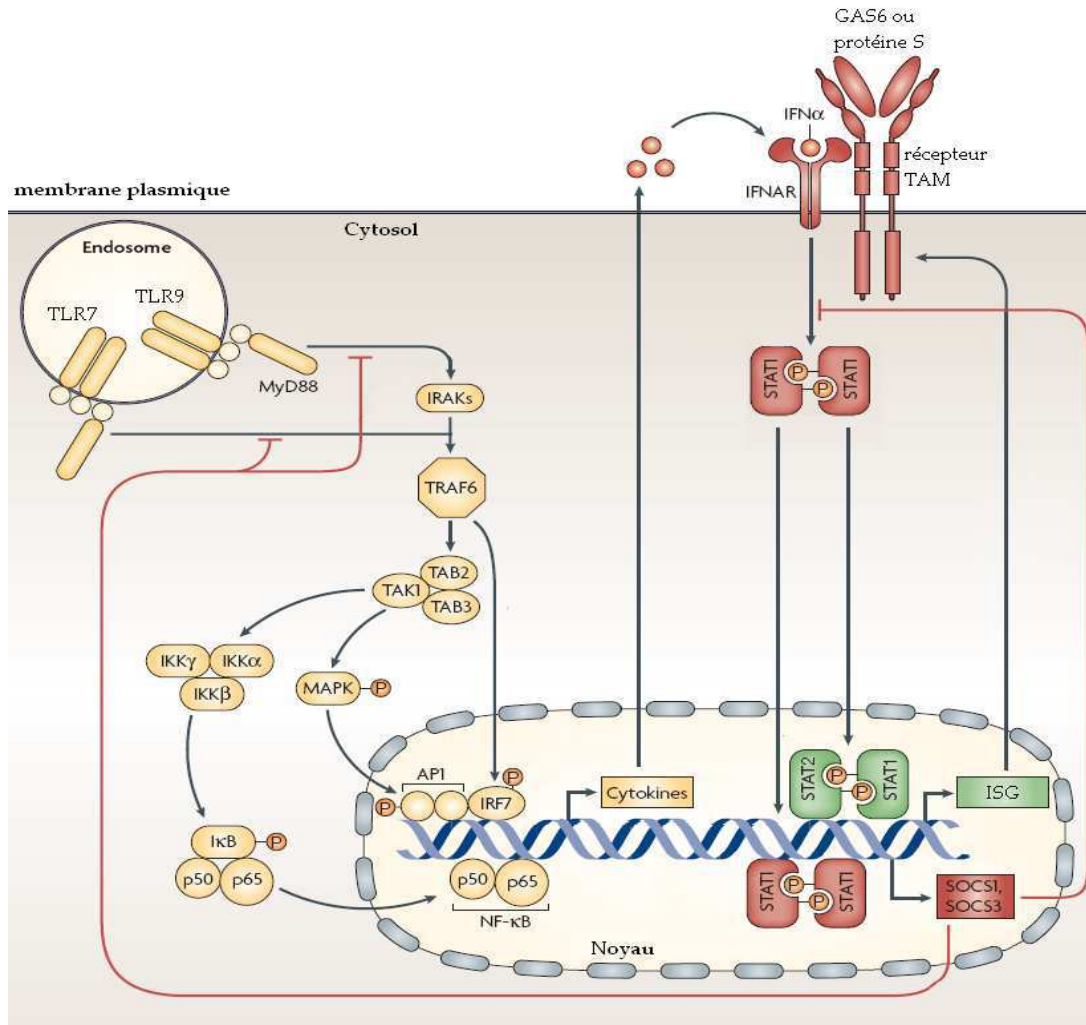


Figure 10. Mécanismes de contrôle de la signalisation IFN. L'activation des TLR7 et -9 par des ligands synthétiques ou des virus entraîne la production de différentes cytokines dont les IFN de type I. Les IFN de type I comme l'IFN- α agissent en boucle autocrine en se fixant sur leur récepteur IFNAR. L'engagement de ce récepteur conduit à la transcription de gènes ISG dont les récepteurs TAM. Les récepteurs TAM s'accumulent alors à la membrane, s'associent aux IFNAR et usurpent la voie JAK-STAT pour stimuler la transcription de SOCS1 et SOCS3. Ces protéines vont interférer négativement avec les voies de signalisation induites par les TLR et les récepteurs à cytokine, permettant le maintien d'une homéostasie immune. Adapté de Lemke et al., *Nat Rev Immunol*, 2008.

Toutes ces données laissent à penser que, dans les pDC, l'expression des gènes induite par l'engagement de l'IFNAR est complémentaire de celle induite par les TLR. Ainsi ces cellules semblent avoir **besoin d'une boucle**

autocrine de l'IFN de type I pour pouvoir exprimer toutes les protéines nécessaires à la **lutte antivirale**.

De plus, les voies de signalisations induites en aval du récepteur à l'IFN de type I régulent positivement ou négativement celles induites par les TLR. En effet, **l'engagement de l'IFNAR dans des pDC non stimulées** va induire une sensibilisation des cellules permettant **d'accélérer leur maturation** en réponse à un ligand de TLR. Cette caractéristique pourrait être importante pour sensibiliser les pDC non stimulées arrivant sur un site d'infection où de l'IFN de type I est déjà produit, les préparant à s'activer rapidement après reconnaissance du pathogène. Au contraire, **l'engagement de l'IFNAR dans des pDC déjà activées** par des ligands de TLR conduira à une **diminution de leur production de cytokines**. Ce mécanisme préviendrait le glissement de la réponse immune vers l'autoimmunité.

III. Les pDC en pathologies

A) Les pDC dans les infections virales

Par leur capacité à reconnaître des motifs génomiques viraux, les pDC sont des cellules clés dans la mise en place de l'immunité antivirale. Leur rôle durant les infections virales est donc très étudié afin de comprendre la progression des différentes pathologies dues aux virus. Je vais présenter ci-après plusieurs pathologies virales pour lesquelles le rôle joué par les pDC a été plus largement décrit dans la littérature.

1. VRS

Le virus respiratoire syncytial (**VRS**) est la première cause d'infection respiratoire **chez l'enfant** et se manifeste par une **obstruction des voies aériennes supérieures**. Malgré une clairance virale après infection, le VRS ne conduit pas au développement d'une immunité protectrice et les infections répétées sont courantes. La complication d'une infection à VRS débouche souvent sur une **bronchiolite**. **Chez l'adulte**, l'infection est bénigne et se traduit le plus souvent par une **rhinite**. Le VRS est un virus à ARN négatif qui infecte les muqueuses nasales. Des études ont montré que cette infection permet le **recrutement important des pDC** au niveau des **muqueuses nasales** chez l'enfant (Gill et al. 2005; Gill et al. 2008). Le nombre de pDC recrutées au niveau de la muqueuse est corrélé à la charge virale suggérant un rôle direct de ces cellules dans la mise en place de l'immunité antivirale (Gill et al. 2005). Des études chez la souris montrent d'ailleurs que la **déplétion en pDC** résulte en une **diminution de la clairance du virus** et une augmentation des symptômes pathologiques (Smit et al. 2006; Wang, H. et al. 2006). Le contrôle de l'infection semble être possible par la production d'IFN de type I par les pDC induite par VRS (Guerrero-Plata et al. 2006; Boogaard et al. 2007). Cependant **l'inactivation du virus** par un traitement UV **inhibe cette**

production et **l'inhibition de l'acidification des endosomes n'altère pas l'activation des pDC** par le VRS(Hornung et al. 2004). Ces résultats suggèrent que les pDC ne reconnaissent pas le VRS par les TLR mais par des **récepteurs cytosoliques**. Par ailleurs, une étude récente montre que les pDC participent à l'activation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans les ganglions drainant le poumon chez des souris infectées par VRS. De plus, il a été montré que l'augmentation du nombre de pDC chez des souris traitées par FLT3L permet de les protéger de cette infection(Smit et al. 2008). Les pDC jouent donc un rôle crucial dans **l'élimination virale** en contexte d'infection par VRS.

2. VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine (**VIH**) infecte environ 0,6 % de la population mondiale. Il cible des cellules du système immunitaire conduisant à une altération progressive de l'immunité appelée syndrome d'immunodéficience acquise (**SIDA**) qui provoque une augmentation de l'occurrence des infections opportunistes. La charge virale des patients et la vitesse de progression vers la phase SIDA sont très hétérogènes entre les individus, suggérant des différences entre les individus dans la mise en place d'une immunité antivirale.

Les **pDC expriment CD4, CXCR4 et CCR5** qui sont les récepteurs au VIH et sont donc des **cibles potentielles** d'infection par ce virus(Smed-Sorensen et al. 2005). Le marquage immunohistochimique d'amygdales et de thymus de patients séropositifs pour VIH a d'ailleurs montré la présence de **pDC VIH p24⁺**, indiquant l'infection effective de ces cellules par le virus(Fong et al. 2002; Keir et al. 2002). De plus, une étude a montré que les pDC infectées par VIH peuvent transmettre le virus aux lymphocytes T CD4⁺ **participant alors à la dissémination virale dans l'organisme**(Lore et al. 2005). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que l'augmentation de la charge virale est associée à une diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et de pDC circulants et est corrélée à une progression de la pathologie vers la phase SIDA(Pacanowski et al. 2001; Soumelis et al. 2001; Chehimi et al. 2002). La **déplétion en pDC** dans le sang est expliquée par le **recrutement massif** des cellules vers les

ganglions lymphatiques et une importante **apoptose des pDC** due à l'infection virale (Schmidt et al. 2004; Brown et al. 2009). De plus, les pDC des patients séropositifs pour VIH présentent *in vitro* une diminution de la capacité à co-stimuler les lymphocytes T et à produire de l'IFN de type I en réponse à des agonistes de TLR, ce qui pourrait participer à la déficience immune caractéristique de la maladie (Feldman et al. 2001; Donaghy et al. 2003; Martinson et al. 2007). Une étude récente a également démontré que les pDC s'accumulant dans la rate des patients VIH⁺ produisent peu d'IFN de type I (Nascimbeni et al. 2009). Cette **altération fonctionnelle des pDC** serait due à l'interférence des **protéines virales gp120** (Martinelli et al. 2007), **p17** (Fiorentini et al. 2008) et **Vpr** (Hong et al. 2009) avec les signalisations TLR. À côté de ces études montrant que les pDC sont infectables et altérées au cours de l'infection, d'autres auteurs montrent au contraire que les **pDC pourraient avoir un rôle antiviral**. En effet, il a été mis en évidence que les pDC s'activent efficacement en réponse au VIH (Yonezawa et al. 2003; Del Corno et al. 2005) principalement **via le TLR7** (Beignon et al. 2005), acquièrent une **capacité cytotoxique** envers les cellules infectées médiée **par TRAIL** (Hardy et al. 2007) et produisent **davantage d'IFN- α** (Lehmann et al. 2008) que les pDC de donneurs sains. Plus récemment, il a été démontré que les pDC jouent un **rôle dans le déclin des lymphocytes T CD4⁺** par induction de leur apoptose via TRAIL (Stary et al. 2009). Les discordances observées entre ces résultats peuvent s'expliquer par une **différence d'activation existant entre les individus**. En effet, une étude dans des modèles primates montre que le polymorphisme des facteurs signalétiques comme IRF7 entre les individus conduit à des réponses IFN différentes (Mandl et al. 2008). De plus, une autre étude montre que les pDC des hommes produisent moins d'IFN de type I que celles des femmes (Meier et al. 2009). Par ailleurs, différentes études s'accordent à montrer que les **pDC activées par le VIH** induisent préférentiellement une **polarisation Treg** de l'immunité par un mécanisme dépendant de l'**IDO** (Boasso et al. 2008; Manches et al. 2008). Toutes ces données mettent en avant un rôle central des pDC dans la pathologie due à l'infection VIH, d'une part elles participent à **l'induction d'une tolérance** et à

la **destruction des effecteurs immuns** et d'autre part leur **activité est altérée par le virus** constituant un mécanisme d'échappement au contrôle immunitaire et une progression rapide de la maladie.

3. Les virus hépatiques

Les virus des hépatites B (**VHB**) et C (**VHC**) sont des virus à ADN et ARN respectivement de la famille des *Hepnaviridae* qui **infectent les hépatocytes**. L'évolution de l'infection par VHB ou VHC est très différente d'un individu à l'autre conduisant **soit à l'éradication du virus** par le système immunitaire **soit à une chronicité**. La chronicité pouvant entraîner l'induction de carcinomes hépatocellulaires, la mise en place de l'immunité anti-VHB/C est un sujet d'étude très documenté. L'infection par des virus hépatiques se traduit par une diminution des DC circulantes et par leur altération fonctionnelle conduisant à la mise en place d'une **immunité adaptative peu efficace** (Duan et al. 2005; Della Bella et al. 2007).

3.1 VHB

De par leur expression de TLR9, les pDC peuvent être à la base de la reconnaissance de VHB mais aucune donnée n'a démontré leur activation possible par ce virus. Il a été montré que les capacités de **différenciation** et de **production d'IFN de type I** par les pDC circulantes sont **diminuées chez les patients infectés par VHB** (Duan et al. 2004; van der Molen et al. 2004). En revanche, les pDC intra-hépatiques semblent présenter un profil activé (Zhang et al. 2008). De plus, une étude montre que la capacité des pDC du sang de patients VHB⁺ à **stimuler des lymphocytes T** après activation *in vitro* par des ligands TLR **reste intacte** (Tavakoli et al. 2008).

3.2 VHC

Les pDC sont capables de **reconnaître le VHC grâce au TLR7** (Zhang et al. 2009). Il a été montré que des pDC sont présentes dans le foie des patients

VHC⁺ avec un profil immature(Lai et al. 2007). Le **nombre de pDC** circulantes chez les patients infectés par VHC est **diminué** et les cellules présentent une **diminution de la production d'IFN de type I**(Ulsenheimer et al. 2005). De plus, leur capacité de **stimulation des lymphocytes T est également altérée**(Kanto et al. 2004; Yonkers et al. 2007). Cependant d'autres études montrent que les pDC ne subissent aucune altération fonctionnelle en contexte d'infection par VHC(Longman et al. 2005; Piccioli et al. 2005). La discordance des résultats pourrait s'expliquer par la co-infection par le VIH de certains patients(Anthony et al. 2004).

3.3 VHB et VHC

Néanmoins, les études réalisées sur les patients infectés par les virus hépatiques s'accordent à dire que la réponse immune induite par les pDC présente une **polarisation en faveur des Treg** qui entraîne la tolérance au virus et la chronicité de l'infection(Kanto et al. 2004; Manigold and Racanelli 2007; Hong and Gong 2008). De façon similaire à ce qui se produit durant l'infection VIH, les protéines virales de VHB et VHC interfèrent avec les signalisations TLR des pDC conduisant à leur altération fonctionnelle. En effet, il a été montré que **l'infection par VHB inhibe l'expression de TLR9** par les pDC(Xie et al. 2009) et que la protéine virale **HBs** qui se fixe sur **BDCA2** entraîne l'expression de **SOCS1** régulant alors négativement la signalisation TLR(Xu et al. 2009). Dans le contexte de l'infection par VHC, la protéine non-structurale **NS5 inhibe la sécrétion cytokinique** des pDC et leur **capacité de co-stimulation** des lymphocytes T(Amjad et al. 2008) et la **protéine core de VHC** interfère avec la signalisation TLR7 **diminuant alors la production d'IFN de type I**(Liang et al. 2009). Toutes ces données mettent en avant le fait que les **mécanismes d'échappement** des virus hépatiques consistent en partie en **l'interférence avec l'activité des pDC**. Ces cellules constituent donc une cible thérapeutique potentielle pour le développement de vaccins anti-VHB/C(Decalf et al. 2007).

Les pDC sont donc les cellules spécialisées de la lutte contre les virus. Lors d'une infection virale comme l'infection par VRS, elles s'activent, produisent de **l'IFN de type I** et permettent la **clairance rapide du virus**. Afin d'échapper au système immunitaire, certains virus comme **VIH, VHB ou VHC** parviennent à **inhiber la signalisation TLR** des pDC entraînant une diminution de leur maturation et de leur production de cytokines. Ceci favorise la mise en place d'une **tolérance immune** conduisant à la **chronicité de l'infection**. Les stratégies d'**intervention thérapeutique** reposent alors sur la **réactivation des pDC**.

B) Les pDC et les maladies auto-immunes

Le relargage d'ADN et d'ARN du soi dans l'environnement extracellulaire est un trait caractéristique de la mort cellulaire nécrotique. Afin de **préserver l'intégrité** de l'organisme il est important que le système immunitaire **évite de reconnaître les acides nucléiques du soi** tout en conservant sa capacité de détecteur du génome microbien. Pour cela, 3 niveaux de contrôle existent : **1) la localisation subcellulaire des TLR3, -7 et -9** dans le compartiment endosomal qui n'est pas accessible aux ADN et ARN du soi, **2) la concentration importante en DNases et RNases** de l'environnement extracellulaire qui permet la dégradation des produits nucléiques issus des cellules mortes et **3) l'hyper-méthylation de l'ADN du soi** qui a été décrite plus haut et la présence de coiffe et de queue poly-A sur les ARN, permettant de les distinguer des acides nucléiques issus de pathogènes. Néanmoins, dans certaines conditions la **tolérance est rompue** et les pDC s'activent en présence des acides nucléiques du soi conduisant à l'initiation ou l'entretien de **pathologies auto-immunes**. Je vais décrire ci-après deux maladies auto-immunes dans lesquelles le rôle des pDC a clairement été identifié comme pro-pathogène.

1. Le lupus érythémateux systémique

Le lupus érythémateux systémique ou **SLE** (Systemic Lupus Erythematosus) est caractérisé par la présence d'**auto-anticorps** dirigés contre les acides

nucléiques et les protéines qui y sont associées, la formation de **complexes immuns** (immune complexes, **IC**) et l'inflammation de nombreux organes et tissus. L'IFN de type I joue un rôle central dans l'étiologie et la pathogénèse du SLE. En effet, la plupart des patients présentent des **taux élevés d'IFN- α** et de gènes induits par l'IFN (**ISG**) (Ronblom et al. 2006; Crow 2007; Ronblom and Pascual 2008) qui sont **corrélés à la gravité de la maladie** et aux quantités d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN double brin et les protéines fixant l'ARN (Bengtsson et al. 2000; Baechler et al. 2003). En fait, les IFN de type I ont de nombreuses actions immunorégulatrices qui peuvent initier ou participer au processus d'auto-immunité, parmi elles l'induction de protéines induites par l'IFN- α constitue une source importante de production d'auto-antigènes (Theofilopoulos et al. 2005; Ronblom et al. 2006). De plus, le polymorphisme de plusieurs gènes codant pour des molécules clés impliquées dans la production d'IFN est fortement associé au SLE (Sigurdsson et al. 2005). Enfin, la thérapie à base d'IFN- α de patients cancéreux ou souffrant d'infections résulte parfois dans des effets secondaires de type SLE (Borg and Isenberg 2007). C'est pourquoi un des moyens thérapeutiques du **traitement de cette maladie** serait l'utilisation d'**anticorps bloquant l'IFN- α** . Dans un essai clinique de phase I, l'administration de tels anticorps a d'ailleurs montré une efficacité prometteuse chez les patients SLE (Yao et al. 2009).

La **source principale** de cette production d'IFN a été démontrée comme étant **les pDC** qui sont capables de **reconnaître les acides nucléiques endogènes** (Lovgren et al. 2004; Barrat et al. 2005). En effet, les patients atteints de SLE présentent une **augmentation de pDC circulantes** (Jin et al. 2008). De plus, les pDC de donneurs sains s'activent au contact des **IC** d'une manière dépendante de **CD32** qui fixe les **immunoglobulines** et de **TLR9** qui reconnaît l'**ADN** (Bave et al. 2003; Means et al. 2005). Cependant, une étude récente montre que les pDC de patients SLE deviennent réfractaires à la stimulation par des agonistes de TLR9 suggérant que ces cellules sont épuisées d'avoir été sollicitées en permanence *in vivo* (Kwok et al. 2008). L'IFN de type I produit par les pDC entraîne d'une part l'activation et la **maturation des mDC** qui stimulent les lymphocytes T autoréactifs et d'autre part la

différenciation des **lymphocytes B autoréactifs** en plasmocytes qui sont à l'origine de la formation des IC(Blanco et al. 2001). Un tel réseau d'interactions cellulaires permet d'**entretenir l'auto-immunité** conduisant à la chronicité du SLE. Le mécanisme responsable de la première activation des pDC au contact avec l'ADN du soi dans le cadre du SLE reste à être défini. Cependant une étude suggère que la protéine nucléaire **HMGB1** (High-mobility group box 1) qui est relarguée par les cellules nécrotiques s'associe aux IC et se fixe à son récepteur **RAGE** (receptor for advanced glycation end-products) conduisant à l'activation de la pDC constituerait **l'élément déclencheur** dans la rupture de tolérance(Tian et al. 2007).

2. Le psoriasis

Le **psoriasis** est une maladie inflammatoire chronique de la peau caractérisée par l'activation locale des mDC et des lymphocytes T auto-immuns qui induisent la prolifération et la **différentiation anormale des kératinocytes** chez des individus génétiquement prédisposés(Lowes et al. 2007). Le **polymorphisme** rencontré dans les gènes codant pour **RAGE, IRF5** et certaines **molécules HLA de classe I** est associé à une **susceptibilité** pour le psoriasis(Vasku et al. 2002; Sanchez et al. 2008). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que les pDC jouent un rôle important dans le développement de cette maladie auto-immune. En effet, un grand nombre de **pDC activées s'accumulent au niveau du derme** des lésions psoriasiques précoces et produisent de l'IFN de type I(Nestle et al. 2005). Ce recrutement des pDC vers la peau est principalement contrôlé par l'expression du récepteur **ChemR23** qui fixe la chemerine produite par les fibroblastes, les mastocytes et les cellules épithéliales de la peau pré-psoriasique(Albanesi et al. 2009). L'intervention du récepteur CXCR3 a également été proposée mais dans des stades plus tardifs de la maladie(Chen et al. 2009). La neutralisation de la signalisation IFN dans la peau développant du psoriasis par des **anticorps anti-IFNAR** ou **l'inhibition de la production d'IFN de type I** par les pDC par des anticorps anti-BDCA2 **inhibe complètement l'activation des lymphocytes T autoréactifs** et le développement des lésions cutanées dans un modèle de xélogreffe psoriasique suggérant **un rôle initiateur des pDC** dans la formation

de ces lésions cutanées(Nestle et al. 2005). Le peptide antimicrobien **LL37** a été identifié comme étant un médiateur clé de l'activation des pDC dans la pathologie du psoriasis(Lande et al. 2007). LL37 constitue un mécanisme ancestral de défense de l'hôte qui prévient l'infection microbienne au niveau des surfaces épithéliales lésées en tuant directement un large spectre de pathogènes comme les bactéries, les protozoaires, les champignons et les virus(Zasloff 2002). Ce peptide, qui n'est pas exprimé dans la peau saine, est produit transitoirement par les kératinocytes et les neutrophiles infiltrant la peau inflammée en contexte infectieux ou après blessure(Dorschner et al. 2001). Cependant, alors qu'un dommage banal de la peau entraîne la production transitoire de LL37, **les lésions psoriasiques présentent des taux élevés persistants de ce peptide**(Ong, P. Y. et al. 2002). Cette forte production pourrait être liée au nombre de copies du gène codant pour LL37 qui est variable comme il a été démontré pour un autre peptide antimicrobien, la β -défensine(Hollox et al. 2008). En plus de son activité microbicide, ce peptide cationique a la capacité de **se fixer à l'ADN et à l'ARN du soi** relargués par les cellules mortes permettant la formation d'agrégats condensés résistants à la dégradation extracellulaire(Lande et al. 2007; Ganguly et al. 2009). Ces complexes **ADN/LL37** et **ARN/LL37** se fixent aux protéoglycanes membranaires et sont endocytés par la cellule de façon dépendante des rafts lipidiques(Sandgren et al. 2004). Ils sont ensuite transportés et retenus dans les **compartiments endosomaux précoces** des pDC permettant **l'activation du TLR9 et du TLR7** respectivement(Lande et al. 2007; Ganguly et al. 2009). De façon surprenante, ces complexes n'entraînent pas la différenciation des pDC ni leur production d'IL-6 et de TNF- α mais **induisent la sécrétion d'IFN de type I**(Ganguly et al. 2009). Les IFN produits entraînent l'activation des mDC qui polarisent les lymphocytes T autoréactifs vers les **voies TH1 et TH17**(Blanco et al. 2001). Les cytokines produites par les lymphocytes TH17 induisent la sécrétion de peptides antimicrobiens dont le LL37 par les kératinocytes(Liang et al. 2006). Cette boucle paracrine positive est un mécanisme possible expliquant la production persistante de LL37 dans le psoriasis(Conrad et al. 2009). Il a d'ailleurs été montré que certains allèles

du gène codant pour le récepteur à l'IL-23 qui est impliqué dans la différenciation des lymphocytes TH17 sont associés au psoriasis(Cargill et al. 2007).

Les différentes caractéristiques du développement des plaques psoriasiques cutanées sont similaires aux traits rencontrés chez les patients atteints d'arthrite psoriasique, une pathologie associée au psoriasis qui se manifeste par des rhumatismes. Certaines études suggèrent que les deux pathologies ont une étiologie commune dont les pDC seraient les cellules initiatrices(Ciocon and Kimball 2007).

En somme, le développement de certaines maladies auto-immunes est étroitement lié à l'activité des IFN de type I et c'est **l'activation inappropriée des pDC** qui conduit à la production de ces IFN. Ces cellules sont donc responsables de **l'initiation ou du maintien de ces pathologies**. Les pDC constituent alors une cible privilégiée pour le traitement immunothérapeutique de ces maladies auto-immunes.

C) Les pDC dans l'allergie

L'**allergie** est une **réaction immunitaire inadaptée et exagérée** du système immunitaire face à un **antigène exogène non pathogène** qui est appelé **allergène**. Ces réactions immunes au contact d'allergènes se manifestent principalement au niveau des zones de contact comme la peau et les muqueuses aériennes et digestives. Afin de les éviter, l'organisme doit mettre en place une tolérance immune envers ces antigènes. Il a d'ailleurs été montré que la **tolérance orale** au niveau des voies digestives fait **intervenir les pDC**(Goubier et al. 2008; Dubois et al. 2009). Néanmoins, cette **tolérance peut être rompue** et entraîner des **réactions d'hypersensibilité**. Ces réactions sont dues initialement à la **présence d'IgE spécifiques d'allergènes** chez les patients allergiques et sont entretenues par une **polarisation TH2 de l'immunité**. Au vu de leur expression du récepteur aux IgE de haute affinité

(FcεRI), **les pDC semblent participer au processus allergique**. Je vais présenter ci-après deux pathologies allergiques où le rôle des pDC a été très étudié.

1. La rhinite allergique

La **rhinite allergique** est une affection bénigne des voies respiratoires supérieures mais qui augmente le risque de développer un asthme et dont la fréquence double tous les 10 ans. On estime que près de 25 % des enfants et jeunes adultes souffrent de rhinite allergique saisonnière. La rhinite allergique est une **inflammation des muqueuses nasales** en réponse à des allergènes comme les pollens. Une étude a montré que le déclenchement expérimental d'une réaction allergique chez des patients souffrant de rhinite saisonnière entraîne une **augmentation du nombre de pDC dans la muqueuse nasale** (Jahnsen et al. 2000). Cependant, une autre étude montre que le taux de pDC dans la muqueuse nasale à l'état basal est plus bas chez les patients allergiques que chez les donneurs sains (Hartmann et al. 2006). Par ailleurs, une étude ex vivo montre que les **pDC de patients** souffrant de rhinite allergique induisent une **polarisation TH2** aux lymphocytes T CD4⁺ (Farkas et al. 2004). Les pDC des muqueuses nasales jouent donc un rôle dans le maintien de l'inflammation chez les patients souffrant de rhinite allergique. Cependant, cette **polarisation est réversible** et peut être redirigée vers la voie TH1 lorsque les pDC sont préalablement activées par des CpG A (Farkas et al. 2004). Ces données ouvrent la voie à une **intervention thérapeutique possible** par **l'utilisation d'agonistes synthétiques de TLR**.

2. L'asthme allergique

L'**asthme allergique** touche près de 300 millions de personnes dans le monde selon l'Organisation mondiale pour la santé (OMS). C'est une **inflammation chronique** des voies aériennes inférieures qui se caractérise par une **bronchoconstriction** et une **hyper-sécrétion de mucus**. Ces symptômes sont médiés par le recrutement d'éosinophiles et de lymphocytes TH2 dans la lumière bronchique. Alors que les mDC induisent une réponse TH2 à

l'encontre des allergènes aériens(Lambrecht et al. 2000), il a été montré dans un modèle murin que les **pDC pulmonaires** jouent un **rôle dans la tolérance de ces allergènes**(de Heer et al. 2004). En effet, la **déplétion en pDC** chez des souris exposées à des antigènes aériens inertes conduit à une réaction de sensibilisation caractérisée par une **augmentation d'IgE spécifiques**, une éosinophilie des voies aériennes et la production de cytokines favorisant la polarisation TH2(de Heer et al. 2004). Au contraire, **l'augmentation des pDC** par administration de FLT3L ou le transfert adoptif de pDC **suppriment ces réactions d'hyper-sensibilité** lors de l'exposition de souris à des allergènes(Kool et al. 2009; Shao et al. 2009). De plus, une étude démontre que la résistance à l'hyper-sensibilité chez des souris est associée à l'augmentation de la capture d'allergènes par les pDC du poumon(Lewkowich et al. 2008). Par ailleurs, une étude a montré que **l'engagement du FcεRI des pDC** par des anticorps permet **d'inhiber la signalisation induite par des ligands de TLR9** de façon dépendante du TNF-α(Schroeder et al. 2008). De plus, il a été montré que les pDC du sang de patients allergiques souffrant d'asthme expriment plus fortement le FcεRI et produisent moins d'IFN de type I après stimulation par des ligands de TLR9 que les pDC de donneurs sains(Tversky et al. 2008). Toutes ces données suggèrent que **l'induction de la tolérance** à l'encontre des antigènes aériens est **médiée par les pDC**.

Ces différents résultats proposent que **l'altération de l'activation des pDC** par les complexes IgE/allergène et l'absence de production d'IFN de type I conduirait **les mDC à induire une réponse TH2 pro-allergique**(Kool and Lambrecht 2007). L'activation des pDC en présence d'allergènes par des **traitements à base d'ODN CpG** permettrait d'induire une production d'IFN de type I et conduirait les mDC à polariser une **réponse immune vers une voie TH1 antiallergique**. De telles approches thérapeutiques seront décrites plus tard.

D) Les pDC en contexte tumoral

Tout au long de la vie, l'accumulation d'erreurs génétiques peut générer des cellules tumorales à partir de cellules saines. Ces cellules sont le plus souvent détruites par le système immunitaire, c'est l'**immunosurveillance**, mais certaines échappent. L'interaction entre l'immunité et les tumeurs peut parfois entrer dans une phase d'équilibre où le développement des cellules tumorales est contrôlé par le système immunitaire sans que celui-ci ne les détruise totalement. Lorsque, sous la pression de l'immunité, les cellules tumorales **acquièrent une résistance** à ce contrôle, il y a **échappement tumoral** et développement possible d'un **cancer**. La destruction des cellules tumorales par le système immunitaire nécessite la génération de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux (**TA**). Les IFN de type I jouent également un rôle dans la lutte contre le cancer par leur capacité à activer l'immunité cytotoxique, à augmenter l'immunogénicité des tumeurs et à diminuer la division des cellules tumorales. Au vu de la capacité des pDC à faire le lien entre l'immunité innée et adaptative, à produire de grandes quantités d'IFN de type I et à pouvoir induire des Treg, leur rôle dans l'immunité anti-tumorale a été grandement investigué. Je présenterai ci-après quelques exemples de cancers où le rôle des pDC a été examiné.

1. Le cancer du sein

En France, le **cancer du sein** se situe au 2^{ème} rang de tous les cancers pris dans leur globalité. Le taux d'incidence standardisé qui a doublé entre 1980 et 2005 est de 101,5 pour 100 000 personnes et le taux de mortalité standardisé de 17,7. Le cancer du sein est au 1^{er} rang des décès par cancer chez la femme (18,9 %)(Belot et al. 2008).

La majorité des recherches qui se sont intéressées à étudier le rôle des DC dans la progression du cancer du sein s'est portée sur l'analyse des mDC. Le constat de ces études est qu'il existe une **défaillance de la maturation des DC** suggérant une tolérance immune vis-à-vis de la tumeur par **ignorance ou anergie**(Lenahan and Avigan 2006; DeNardo and Coussens 2007). Une étude

chez la souris montre aussi que les cellules tumorales conduisent les mDC à induire des lymphocytes TH2 sécréteurs d'IL-13, favorisant le développement du cancer du sein(Aspord et al. 2007). Par ailleurs, des études ont montré que **le nombre de pDC circulantes est diminué** et que leur **maturation est altérée** chez les patientes porteuses d'un cancer du sein(Della Bella et al. 2003) (Pinzon-Charry et al. 2007). La **présence de pDC** dans les tumeurs mammaires primaires a été **corrélée à un mauvais pronostic** suggérant leur contribution au développement du cancer du sein(Treilleux et al. 2004). Plus récemment, il a été mis en évidence la **présence de lymphocytes Treg Foxp3+** dans l'infiltrat lymphoïde de tumeurs mammaires(Gobert et al. 2009). Ces Treg qui semblent avoir été recrutés via un axe CCR4/CCL22, ont un phénotype activé et prolifèrent suggérant un engagement de leur TCR et donc une présentation spécifique de TA par des DC. Il reste maintenant à définir si les pDC ont un rôle direct ou indirect dans l'induction de la polarisation Treg de l'immunité rencontrée dans le contexte du cancer du sein.

2. Le cancer de l'ovaire

Le **cancer de l'ovaire** se situe au 7^{ème} rang des cancers féminins avec un taux d'incidence de 8,1 pour 100 000 personnes. Le taux de mortalité est de 4,6/100 000, le plaçant au 5^{ème} rang des décès par cancer chez la femme(Belot et al. 2008).

Comme pour le cancer du sein, les patientes porteuses d'un cancer de l'ovaire présentent une **altération fonctionnelle des DC *in situ***(Zou 2005). Néanmoins les pDC retrouvées dans le microenvironnement tumoral ovarien sont **fonctionnelles et matures**(Zou et al. 2001a). Ces pDC semblent être recrutées par la tumeur puisque les cellules épithéliales ovariennes tumorales produisent de grandes quantités de la chimiokine CXCL12 capable d'activer la transmigration des pDC exprimant le récepteur CXCR4(Zou et al. 2001a). Au niveau de la tumeur, les pDC **stimulent la production d'IL-10** par les lymphocytes T CD4⁺ qui supprime les fonctions effectrices des lymphocytes T spécifiques de TA induits par les mDC(Zou et al. 2001a). De plus, les pDC sont capables **d'induire des lymphocytes T CD8⁺ régulateurs** producteurs d'IL-

10(Wei et al. 2005). Ces lymphocytes T CD8⁺ régulateurs sont générés de façon indépendante des Treg CD4⁺ et expriment le récepteur CCR7 qui leur permet de retourner vers les ganglions lymphatiques drainant la tumeur afin de supprimer l'activation centrale des lymphocytes T spécifiques de TA ovariens(Wei et al. 2005). Ici, **les pDC semblent avoir une fonction tolérogène**. Néanmoins, savoir si cette propriété tolérogénique est intrinsèque aux pDC ou induite par l'environnement tumoral reste à définir.

3. Les cancers de la peau

Les **cancers de la peau** tous réunis sont les cancers les plus fréquents avec environ 100 000 nouveaux cas chaque année. Il existe deux types principaux de cancer de la peau, les **carcinomes** qui se développent aux dépens des kératinocytes de l'épiderme et les **mélanomes malins cutanés** qui se développent aux dépens des mélanocytes, les cellules pigmentaires de la peau. Selon la localisation des cellules tumorales du carcinome, on distingue le **carcinome baso-cellulaire** (Basal cell carcinoma, **BCC**) qui s'établit à partir des kératinocytes de la base de l'épiderme, et le **carcinome spino-cellulaire** (squamous cell carcinoma, **SCC**) qui se développe principalement à partir de lésions précancéreuses comme les kératoses séniles. L'exérèse chirurgicale de la tumeur est un traitement efficace d'où une très faible mortalité due à ces carcinomes. En revanche, le **mélanome malin** est la tumeur cutanée qui a le **plus grand potentiel métastasant**. Il se situe, par sa fréquence, au 12^{ème} rang des cancers chez l'homme avec un taux d'incidence de 7,6/100 000 et au 8^{ème} rang chez la femme avec un taux d'incidence de 8,8/100 000. En 2005, ce cancer se situait au 18^{ème} rang des décès par cancer représentant 1 % de l'ensemble des décès par cancer. Les taux de mortalité sont de 1,6/100 000 chez l'homme et 1,1/100 000 chez la femme. Le mélanome de la peau est donc un cancer peu fréquent mais dont l'incidence a fortement augmenté depuis 1980(Belot et al. 2008). Dans le monde, son incidence double tous les 10 ans. Lorsque l'exérèse complète de la tumeur n'est pas efficace, notamment lors de la présence de métastases ganglionnaires ou viscérales au diagnostic, un traitement par chimiothérapie ou immunothérapie peut

être proposé. L'injection d'IFN- α est un traitement adjuvant qui peut avoir des effets bénéfiques mais dont la réelle efficacité est toujours discutée(Dreno 2004).

Plusieurs études ont montré la **présence de pDC** dans l'infiltrat leucocytaire de lésions de mélanome cutané(Salio et al. 2003; Vermi et al. 2003; Wenzel et al. 2005). De plus une étude a montré que les cas de **régression spontanée** de mélanome cutané sont **associés à la présence de pDC** et de lymphocytes T CXCR3⁺ granzyme B⁺(Wenzel et al. 2005). Les pDC sont également recrutées au niveau des ganglions lymphatiques sentinelles envahis par des métastases de mélanome et constituent la **population de DC majoritaire**(Lee et al. 2003; Gerlini et al. 2007). Néanmoins, la présence de ces cellules **dans les ganglions lymphatiques sentinelles** a été **associée à l'échappement tumoral**. En effet, certaines études immunohistochimiques chez l'homme et ex vivo dans des modèles murins montrent que les pDC présentes dans les ganglions lymphatiques sentinelles en contexte de mélanome expriment **IDO** et génèrent des **lymphocytes Treg** de façon spécifique conduisant à l'induction d'une tolérance tumorale(Lee et al. 2003; Munn et al. 2004; Sharma et al. 2007). Cependant le **blocage de l'enzyme IDO** permet la **conversion des lymphocytes Treg** des ganglions sentinelles en **lymphocytes TH17** inflammatoires de façon dépendante de l'IL-6 produite par les pDC, suggérant que la nature tolérogène des pDC en contexte de mélanome n'est pas intrinsèque(Sharma et al. 2009). L'immunité anti-tumorale induite en contexte de mélanome par les pDC semble donc **faible voire nulle**. Ceci peut être dû à l'absence de signaux d'activation médiés par les TLR dans le microenvironnement tumoral. Des études étayent cette hypothèse en montrant que les **pDC activées** par des ligands de TLR sont capables dans un modèle murin **d'activer des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes de mélanome** comme melan-A conduisant à la régression tumorale(Salio et al. 2003; Liu et al. 2008). De plus il a été montré que l'injection intradermique ou sous-cutanée d'un **ligand de TLR9** chez des patients porteurs de mélanome induit l'activation des pDC présentes dans les ganglions sentinelles, la **disparition des lymphocytes Treg** et l'**augmentation**

de l'activité cytotoxique NK(Pashenkov et al. 2006; Molenkamp et al. 2007). Cette immunothérapie a permis, chez certains patients, la **régression complète de la tumeur**(Hofmann et al. 2008). Les effets anti-tumoraux de l'activation des pDC les plus spectaculaires ont été observés avec l'utilisation d'**imiquimod** sur les carcinomes cutanés. En effet, les pDC recrutées sur les sites tumoraux après **application topique de ce ligand de TLR7** présentent une activité cytotoxique à l'égard des cellules tumorales conduisant dans la majorité des cas à la **régression complète des BCC et SCC**(Stary et al. 2007; Wolf et al. 2007). L'imiquimod a également montré son efficacité en tant qu'adjuvant chez des patients porteurs de mélanome dans l'induction de réponses immunes humorales et cellulaires dans le cadre d'un vaccin immunothérapeutique avec le peptide de mélanome NY-ESO(Adams et al. 2008). Toutes ces données suggèrent que les **pDC immatures présentes au sein des cancers cutanés** n'induisent pas d'immunité cytotoxique conduisant à la **tolérance des tumeurs** mais que ces cellules sont aptes à générer une réponse immune anti-tumorale efficace lorsqu'elles sont activées par des ligands de TLR. De tels résultats mettent en avant **l'intérêt de cibler l'activation des pDC** dans le traitement des cancers de la peau.

En somme, l'inadéquation de l'état d'activation des pDC peut initier ou maintenir différents types de pathologies. Leur **activation inappropriée** entraîne certaines **maladies auto-immunes** alors que leur persistance dans un **état au repos** peut être à l'origine de la **tolérance** ou de la **polarisation TH2** rencontrées dans certaines infections, allergies et cancers (**Figure 11**). Certaines **stratégies thérapeutiques** mises en place pour le traitement de ces pathologies reposent donc sur **l'activation ou l'inhibition du système immunitaire** en ciblant entre autres les pDC par des agonistes ou des antagonistes des TLR7 et -9.

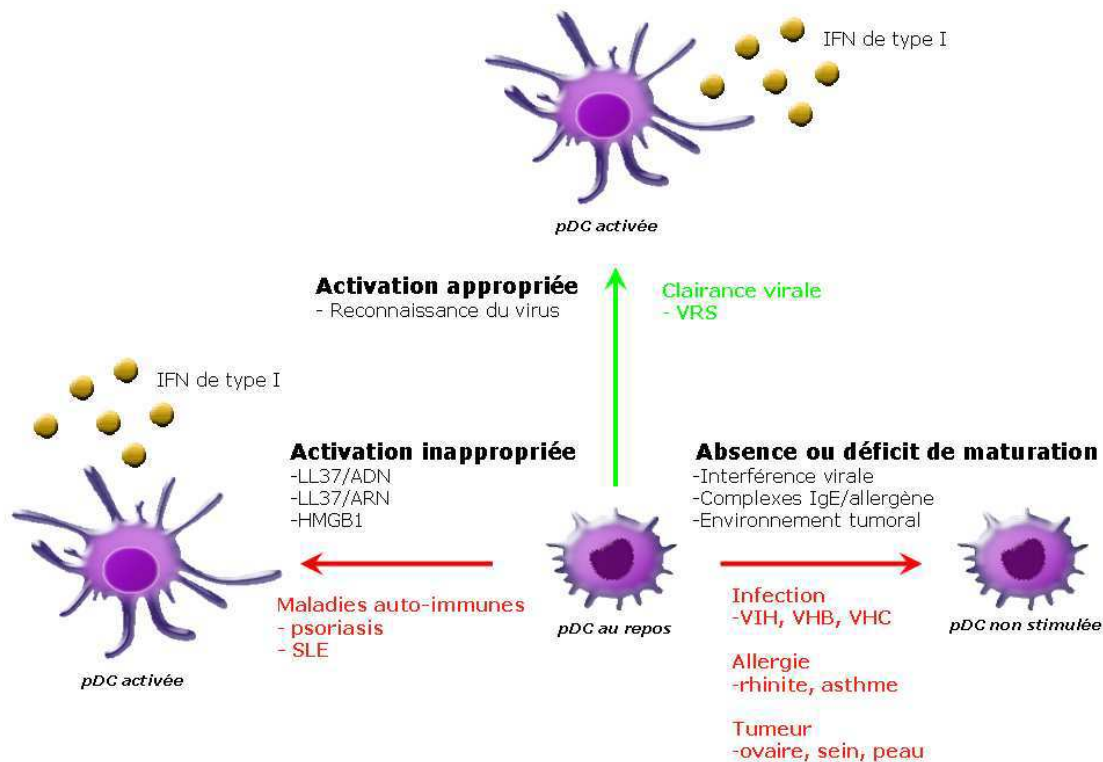


Figure 11. Implication des pDC dans des pathologies.

En contexte d'infection virale, les pDC s'activent après reconnaissance du pathogène et permettent la clairance du virus par leur production d'IFN de type I. Cependant l'altération de leur activité peut entraîner différentes pathologies. D'une part, les pDC peuvent être activées de façon inappropriée par des acides nucléiques du soi (ex : ADN du soi complexé à LL37) et engendrer des maladies auto-immunes comme le psoriasis ou le SLE. D'autre part, l'absence ou la diminution de l'activation des pDC par l'activité virale, la présence de complexes IgE/allergène ou l'environnement tumoral entraîne la tolérance de virus (VIH, VHB, VHC), des réactions allergiques (rhinite, asthme) ou le développement de tumeurs (ex : ovaire, sein, peau).

IV. Les pDC en thérapeutique

A) Ciblage thérapeutique des pDC

Plusieurs molécules thérapeutiques, **agonistes de TLR7 et -9**, se sont révélées être **efficaces** dans le traitement d'**allergies** ou de **cancers** et être de **puissants adjuvants vaccinaux**. Elles permettent d'activer le système immunitaire, de faire sécréter de l'IFN de type I et d'induire la production d'anticorps. Ces approches thérapeutiques permettent d'activer le système immunitaire inné et adaptatif en **ciblant principalement les pDC** et les lymphocytes B qui expriment les TLR7 et -9. Plusieurs essais cliniques en cours testent l'utilisation de ces molécules pour le traitement de cancer ou en tant qu'adjuvant vaccinal. Je vais maintenant décrire les raisons et les perspectives futures de ces approches.

1. Les différents agonistes et antagonistes utilisés

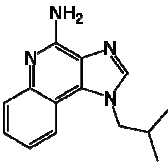
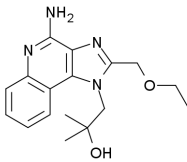
Dans les essais cliniques, les **ODN-ISS** de classe B ont été les plus étudiés. Ils **ciblent à la fois les pDC et les lymphocytes B** qui expriment le TLR9. La production d'IFN- α par les pDC qui induit une polarisation TH1 de l'immunité et l'activation de la prolifération, de la production d'anticorps et du switch isotypique des lymphocytes B, bases de l'immunité adaptative humorale, semblent être à l'origine des effets thérapeutiques observés après l'administration *in vivo* de ces ligands (Kanzler et al. 2007).

Concernant les **agonistes de TLR7**, de petites molécules à base d'imidazoquinolines (Imiquimod, Gardiquimod, Resiquimod) ou analogues de guanosine (Loxoribine) sont également étudiés, cependant la majorité des données dans les études cliniques ont été obtenues avec l'**imiquimod**. De façon similaire aux ODN-ISS, les ligands de TLR7 **activent directement les pDC, les lymphocytes B et les monocytes** et sont de puissants inducteurs de la

production d'IFN- α et de cytokines pro-inflammatoires *in vivo* (Schon and Schon 2008).

Par ailleurs, des **séquences ADN** ont été décrites comme pouvant **interférer avec la stimulation des TLR7 et -9** *in vitro* et *in vivo* et ont été nommées **IRS** (immunoregulatory sequences, séquences immunorégulatrices) (Duramad et al. 2005; Barrat et al. 2007). Il semblerait que ces antagonistes agissent par compétition avec les ligands pour la fixation aux TLR (Latz et al. 2007).

Tableau 3. Exemples d'agonistes de TLR utilisés en immunothérapie

| Nom du ligand | Structure | Récepteur |
|--|--|---------------|
| Imiquimod 3-(2-methylpropyl)-3,5,8-triazatricyclo[7.4.0.0 ^{2,6}]trideca-1(9),2(6),4,7,10,12-hexaen-7-amine |  | TLR7 |
| Resiquimod 1-[4-amino-2-(ethoxymethyl)imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl]-2-methylpropan-2-ol |  | TLR7 |
| CpG A ODN 2216 ODN 2336 | 5'-GGGGG ACGATCGTCGGGGGG -3' | TLR9 |
| CpG B CpG 7909 PF-3512676 ODN 2006 | 5'- TCGTCGTTTTGTCTTTTGTCTGTT -3' | TLR9 |
| CpG C ODN 2395 ODN M362 | 5'- TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG -3' | TLR9 |
| IRS TTAGGG ODN 2088 | 5'-TTT AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG -3' | TLR9 |
| IRS 954 | 5'-TGCTCCTGG AGGGG TTGT-3' | TLR7/9 |

CG, motif stimulateur ; **AGGG**, motif inhibiteur

2. Utilisation des ligands de TLR7 et -9 dans les maladies infectieuses

2.1 En tant qu'adjuvant en vaccination

L'utilisation des **ODN-ISS** a été considérablement étudiée dans le cadre du développement d'**adjuvants vaccinaux** pour la prévention des infections à VHB, Flu, malaria et anthrax. Un vaccin contre le virus de l'hépatite B, actuellement en phase III d'essai clinique, combinant l'**ISS CpG-1018** avec un **antigène de surface du VHB** a prouvé être capable de maîtriser le déclin de la réponse immunitaire lié à l'âge normalement rencontré avec les vaccins VHB classiques (Halperin et al. 2006). En phase I/II d'essai clinique, le **CpG-7909** (CpG B) en association avec le vaccin VHB approuvé **Engerix-B[®]** permet d'**augmenter de façon significative la réponse humorale spécifique** chez des individus sains et chez des individus non-répondeurs infectés par VIH et leur confère une séro-protection à long terme (Cooper et al. 2004a; Cooper et al. 2005; Cooper et al. 2008). Une autre étude clinique s'intéressant à l'utilisation de CpG C (**CpG 10109**) combiné à un vaccin approuvé contre l'anthrax nommé **BioThrax[®]** a rapporté obtenir une **réponse anticorps plus forte** et plus précoce chez les individus testés qu'avec l'administration du vaccin seul (Gu et al. 2007). Par ailleurs, il a été montré que le couplage d'un **vaccin peu efficace** contre la malaria (apical membrane antigen 1- combinaison 1, AMA1-C1) **avec des CpG B** permet d'**augmenter fortement une réponse anticorps**, capable de prévenir le développement du parasite *in vitro* (Mullen et al. 2008; Ellis et al. 2009). Le CpG B a également été testé dans une étude clinique de phase Ib en tant qu'adjuvant d'un vaccin commercial contre Flu. Une dose plus faible de vaccin induit la diminution nette de la réponse TH1 spécifique, l'addition de CpG B a permis de restaurer la réponse au niveau de celle normalement attendue avec la dose conventionnelle (Cooper et al. 2004b). Ces résultats suggèrent que l'**utilisation des ODN-ISS** pourrait **contribuer à la réduction des doses vaccinales** sans compromettre pour autant leur efficacité. Enfin, Toutes ces données illustrent la capacité des molécules ISS à augmenter et à maintenir dans le temps l'immunogénicité des vaccins classiques, démontrant leur intérêt en tant qu'adjuvant.

2.2 En tant que molécules thérapeutiques

Les **agonistes de TLR7** sont également des adjuvants de choix pour le traitement de certaines infections. Ainsi, l'**imiquimod** en crème à 5 %, est déjà indiqué et approuvé aux Etats-Unis depuis une dizaine d'années dans le **traitement des verrues ano-génitales** induites par le virus du papillome humain (VPH) (A et al. 2009; Diamantis et al. 2009). De récentes données démontrent qu'il permet la régression complète des lésions chez plus de 50 % des patients lorsqu'appliqué, 3 fois par semaine pendant 16 semaines (Diamantis et al. 2009). D'autres pathologies infectieuses de la peau répondent au traitement par l'imiquimod comme le **molluscum contagiosum**, l'**herpès génital** et les **leishmanioses**(A et al. 2009).

L'**administration de resiquimod** par voie orale a fait l'objet d'une étude en phase IIa chez des patients infectés par VHC(Pockros et al. 2007). Les données cliniques montrent une **diminution de la charge virale** corrélée à une production d'IFN- α . Un essai clinique de phase 1b utilisant des CpG 10101 a obtenu les mêmes résultats(McHutchison et al. 2007). Néanmoins, dans les deux cas, des **effets secondaires importants** similaires à ceux rencontrés lors d'une thérapie à base d'IFN- α ont été observés et ont mis **fin à leur développement**.

3. Utilisation des ligands de TLR9 en contexte allergique

L'allergie est un autre champ dans lequel le développement des agonistes de TLR9 a démontré son efficacité. Aucune étude n'est parue sur l'utilisation d'agonistes de TLR7 dans ce cadre. Les maladies allergiques sont caractérisées par une polarisation TH2 inappropriée en réponse à des antigènes environnementaux. Par leur capacité à dévier la réponse immune allergique vers la voie TH1 *in vivo*, les ODN-ISS sont donc particulièrement intéressants pour le traitement de telles pathologies. Des essais cliniques utilisant un **ODN-ISS** lié de façon covalente à l'**allergène Amb a1** et administré à des patients allergiques à l'ambrosie a démontré une **réduction des symptômes du rhume des foins** de façon significative en comparaison

avec les sujets placebo (Simons et al. 2004; Creticos et al. 2006). Une étude clinique plus récente de phase I/IIa a testé une immunothérapie combinant des particules virus-like (**VLP**) **contenant des CpG de classe A** avec des **allergènes d'acariens**. Cette étude a démontré, outre l'innocuité d'un tel protocole vaccinal, une **réduction du taux d'IgE** et de la réactivité cutanée chez les patients allergiques mis au contact d'acariens au bout de seulement 10 semaines de traitement (Senti et al. 2009). Bien que ces résultats semblent prometteurs pour le traitement des allergies, une étude démontre que l'utilisation de telles immunothérapies pour traiter des patients souffrant d'asthme est inefficace (Gauvreau et al. 2006). Néanmoins les auteurs soulèvent la possibilité que les doses utilisées ne soient pas adéquates étant donné que c'est la première étude de ce genre.

4. Utilisation des ligands de TLR7 et -9 dans le cancer

L'intérêt d'utiliser des agonistes synthétiques des TLR7 et -9 dans le traitement du cancer repose sur 2 critères : **1) induire la production d'IFN- α** et de cytokines pro-inflammatoires afin de créer un environnement propice à la mise en place d'une réponse immune adaptative cytotoxique et **2) lever la tolérance envers les antigènes tumoraux** qui sont peu immunogènes. Ces molécules thérapeutiques peuvent être utilisées seules, en tant qu'adjuvants vaccinaux ou en association avec d'autres traitements.

Dans le contexte de l'utilisation de molécules seules, ce sont les agonistes de TLR7 qui semblent les plus prometteurs. La crème à base d'imiquimod, **Aldara[®]**, est approuvée pour le **traitement des BCC** aux Etats-Unis et en France. Dans une étude multicentrique européenne de phase III, une régression tumorale a été observée chez 80 % des patients traités par l'imiquimod (Schulze et al. 2005). L'**efficacité clinique** du traitement a été associée au **rôle directement joué par les pDC**. En effet, le profil d'expression génique des tumeurs BCC traitées a montré une signature IFN (Urosevic et al. 2005) qui est corrélée à la **présence abondante de pDC** infiltrant les lésions tumorales (Wolf et al. 2007). Les patients cliniquement non répondeurs au traitement ont une infiltration en pDC et une signature IFN faible. En plus du

BCC, l'imiquimod a démontré son efficacité dans le traitement de plusieurs tumeurs primaires de la peau dont le **kératoacanthome**, la **kératose actinique**, le **mélanome primaire *in situ*** et le **lymphome T cutané**(Novak et al. 2008). Par ailleurs, une étude clinique multicentrique récente de phase II a testé l'**injection intraveineuse** d'un agoniste de TLR7, le **852A**, chez des patients porteurs de mélanome métastatique de stade IV réfractaires à la chimiothérapie. Les auteurs montrent que cette thérapie bien tolérée permet de **stabiliser la maladie** de façon prolongée(Dummer et al. 2008). L'**inhibition de la progression tumorale** a été démontrée comme étant **dépendante des pDC** et de la production d'IFN- α (Inglefield et al. 2008).

Bien qu'il n'existe pas encore de drogues approuvées par des agences réglementaires pour la thérapie des cancers à base d'agonistes de TLR9, certains résultats obtenus dans des essais cliniques sont encourageants. En effet, une étude en phase II sur des patients porteurs de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (non-small-cell-lung carcinoma, **NSCLC**) traités par **chimiothérapie** à base de **platine-taxane** en combinaison avec le ligand de TLR9, **PF-3512676**, administré en sous-cutané a montré une **augmentation de la médiane de survie** de ces patients de 6 mois en comparaison avec des patients ayant reçu une chimiothérapie seule(Manegold et al. 2008). Cette étude se poursuit actuellement en phase III.

La vaccination de patients cancéreux utilisant les ODN-ISS en tant qu'adjuvants a également fait l'objet d'essais cliniques. Ainsi une étude montre que la vaccination de patients porteurs de mélanomes métastatiques avec le peptide **Melan-A**, un antigène exprimé par la tumeur, associé au **CpG 7909** permet d'**augmenter la fréquence de lymphocytes T spécifiques** de Melan-A à plus de 3 % des lymphocytes T CD8⁺ circulants(Speiser et al. 2005). Néanmoins l'impact de la vaccination sur le développement tumoral est **limité** et ce traitement entraîne une **augmentation de lymphocytes Treg** au sein de la tumeur(Appay et al. 2006). Des dizaines d'autres études sont en cours sur l'efficacité des ODN-ISS en thérapie anti-tumorale sous forme de vaccins, de monothérapies ou combinés à la chimiothérapie (Tableau 4).

Tableau 4. Essais cliniques récents sur l'utilisation de ligands de TLR7 et -9 en immunothérapie anti-tumorale

| Traitement | TLR dont la molécule est agoniste | Type de cancer | Phase de l'étude (nombre de patients) |
|---|-----------------------------------|--|---------------------------------------|
| Vaccins | | | |
| CpG 7909 + peptide MAGE-3.A1 | TLR9 | Mélanome | Phase I/II (14) |
| CpG 7909 + peptide naturel MART1 + peptide tyrosinase + Montanide ISA-51 | TLR9 | Mélanome | Phase I (27) |
| Resiquimod + peptide NY-ESO-1 + Montanide ISA-51 | TLR7 | Mélanome | Phase I (26) |
| CPG 7909 + cyclophosphamide + fludarabine + PBMC autologues + MART1 dans IFA | TLR9 | Mélanome | Phase I (12) |
| CPG 7909 (dans l'adjuvant AS15) + protéine fusion MAGE-3 His | TLR9 | Mélanome | Phase II (68) |
| CPG 7909 (dans l'adjuvant AS15) + protéine recombinante HER2 | TLR9 | Cancer du sein | Phase I/II (40) |
| Monothérapie | | | |
| PF-3512676 | TLR9 | LLC, leucémie lymphoïde chronique (2ème ligne) | Phase I (48) |
| IMO-2055 | TLR9 | Cancer du rein (1ère et 2ème ligne) | Phase I (92) |
| Imiquimod | TLR7 | Cancer du sein avec métastases cutanées | Phase II (29) |
| Thérapies combinées | | | |
| ISS-1018 + rituximab (anti-CD20) | TLR9 | LNH, Lymphome non-hodgkinien (2ème ligne) | Phase II (30) |
| PF-3512676 + irradiation locale | TLR9 | LNH | Phase I/II (30) |
| PF-3512676 ± Paclitaxel/carboplatine | TLR9 | NSCLC (1ère ligne) | Phase III (800) |
| PF-3512676 ± Gemcitabine/cisplatine | TLR9 | NSCLC (1ère ligne) | Phase III (800) |
| PF-3512676 ± Paclitaxel /carboplatine /bevacizumab | TLR9 | NSCLC (1ère ligne) | Phase II (140) |
| PF-3512676 ± Erlotinib | TLR9 | NSCLC (2ème ligne) | Phase II (130) |
| PF-3512676 ± Pemetrexed | TLR9 | NSCLC (2ème ligne) | Phase II (130) |
| PF-3512676 + KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) | TLR9 | Leucémie/lymphome après greffe de moelle osseuse | Phase I (25) |
| ISS-1018 + irinotecane + cetuximab (anti-EGFR) | TLR9 | Cancer colorectal (2ème ligne) | Phase I (15) |
| IMO-2055 + gemcitabine + carboplatine | TLR9 | Tumeurs solides refractaires | Phase I/II |

D'après le répertoire des essais cliniques sur www.clinicaltrials.gov

5. Utilisation de ligands inhibiteurs des TLR7 et -9 dans le cadre de maladies auto-immunes

Comme je l'ai décrit plus haut, les manifestations pathologiques observées dans plusieurs maladies auto-immunes comme le SLE ou le psoriasis sont dues à l'**activation inappropriée des pDC** et à leur production massive d'IFN- α . Des améliorations cliniques peuvent avoir lieu chez les patients SLE traités par des **corticostéroïdes**, traitement qui **inhibe la production d'IFN- α** et **réduit le nombre de pDC** circulantes (Shodell et al. 2003). Cependant, à fortes doses, ces drogues ont de **nombreux effets secondaires** et augmentent le risque de maladies cardio-vasculaires. Une autre approche consiste en l'injection d'anticorps monoclonaux neutralisants dirigés contre l'IFN- α . Cette approche a montré son efficacité dans le traitement de patients atteints de SLE dans un essai clinique de phase I (Ronnlom and Pascual 2008). Ce traitement provoque moins d'effets secondaires que les glucocorticoïdes mais son administration aux patients doit être plus régulière pour maintenir son efficacité et pourrait augmenter la susceptibilité aux infections.

D'autres se sont alors logiquement intéressés à l'**utilisation des IRS**. Ces inhibiteurs des TLR7 et -9 sont capables de **bloquer la production d'IFN de type I par les pDC activées** par des ligands naturels et synthétiques des TLR7 et -9 (Barrat et al. 2007) ainsi que la différenciation des lymphocytes B (Duramad et al. 2005). Ces ODN pourraient donc être efficaces dans le traitement de maladies auto-immunes médiées par les pDC, leur utilisation en thérapeutique reste maintenant à être testée.

Le principe des différentes stratégies immunothérapeutiques utilisant des imidazoquinolines, des CpG et des séquences immuno-régulatrices pour le traitement des infections, des allergies, des cancers et des maladies auto-immunes est résumé dans la figure 12.

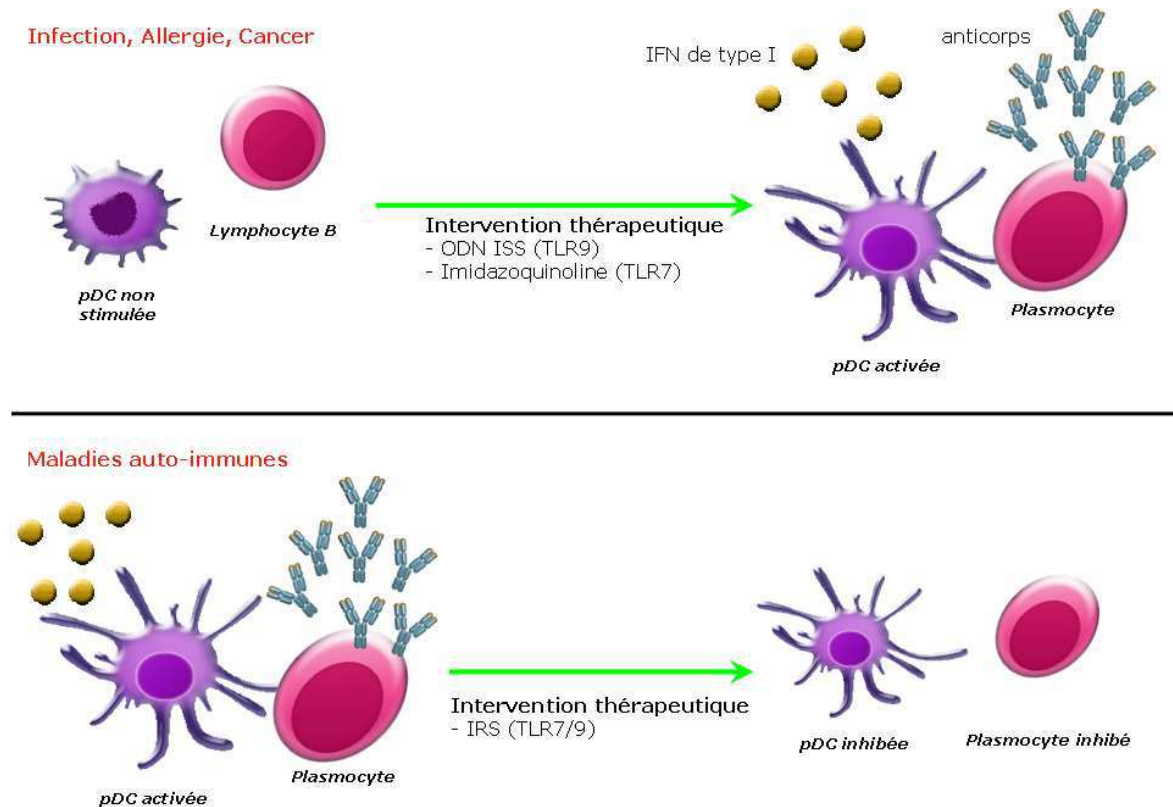


Figure 12. Principe des stratégies thérapeutiques utilisant des agonistes et antagonistes des TLR7 et -9. Certaines approches immunothérapeutiques s'intéressent à l'utilisation de molécules qui activent le système immunitaire et permettent la sécrétion d'IFN de type I et la production d'anticorps pour le traitement de maladies infectieuses, d'allergies et de cancers. Ces molécules, comme les imidazoquinolines et les ODN ISS, ciblent les TLR7 et -9 exprimés par les pDC et les lymphocytes B. Dans le cas des maladies auto-immunes où le système immunitaire est activé de façon inappropriée, l'utilisation d'antagonistes des TLR7 et -9 comme les IRS permettrait d'inhiber les effecteurs immuns et de diminuer les symptômes de ces pathologies.

B) Immunothérapie du cancer à base de pDC

Comme nous l'avons vu précédemment, le développement d'un cancer chez un patient est dû entre autres à l'absence d'une immunité cytotoxique efficace spécifique de la tumeur. Afin de palier cette déficience du système immunitaire, des stratégies immunothérapeutiques ont été mises en place pour stimuler une réponse immune anti-tumorale. Les **stratégies passives**, consistant en l'**injection directe** des **effecteurs cytotoxiques** ou d'**anticorps** au patient, ont montré leur efficacité dans certains cancers comme le lymphome B non-hodgkinien (**rituximab**[®]). L'**immunothérapie**

active, elle, repose sur le principe de vaccination et est supposée être plus efficace dans le temps par l'induction d'effecteurs T et B et la mise en place d'une immunité mémoire. Ces stratégies utilisent l'injection directe d'antigènes (lysats tumoraux, peptides, ADN...) ou de **DC chargées avec des antigènes**. Les vaccins à base de DC actuellement en essai clinique utilisent des DC myéloïdes générées *ex vivo* à partir de monocytes ou de précurseurs CD34⁺ issus du sang du patient. Ces DC sont chargées avec des antigènes tumoraux et sont activées par des cytokines pro-inflammatoires ou des agonistes de TLR. Les conclusions des différentes études cliniques déjà effectuées sont que les vaccins à base de DC permettent d'**induire une réponse immune chez** la plupart des patients traités mais seule **une minorité des patients répond cliniquement à la thérapie** (Tacke et al. 2007). C'est pourquoi le développement de nouveaux vaccins à base de DC est toujours à l'étude.

L'utilisation des pDC dans une telle stratégie immunothérapeutique semble intéressante au vu de leur capacité à produire de l'IFN de type I et à induire efficacement des réponses anti-tumorales (décrit plus haut). A ce jour, un seul essai clinique de phase I/II est en cours qui **teste un vaccin à base de pDC**. Après avoir montré que les pDC de patients porteurs de mélanome sont **capables de capturer des antigènes exogènes via CD32** et de les présenter aux lymphocytes T CD4⁺ (Benitez-Ribas et al. 2006), l'équipe du Pr. Figdor a mis en place une stratégie vaccinale à base de **pDC autologues** pour l'immunothérapie du mélanome. Pour cela, les pDC de patients sont isolées par sélection positive en utilisant des microbilles magnétiques couplées à un anticorps anti-BDCA4 (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) après cytophérèse, **chargées avec des antigènes de mélanome** (antigène exprimé par la tumeur du patient), activées par le virus de la FSME (Frühsommer-Meningoenzephalitis, méningo-encéphalite à tique) approuvé pour la thérapie et réinjectées au patient. Les résultats de cet essai clinique ne sont pas encore publiés.

Comme le **développement à large échelle** d'un vaccin standardisé à base de pDC serait **limité par la fréquence de ces cellules** chez le patient, la

variabilité fonctionnelle existant entre les individus et **le temps et le coût de préparation** de vaccins individuels, il serait préférable d'utiliser des cellules provenant d'une source déjà disponible et illimitée telle qu'une lignée cellulaire. C'est pourquoi notre laboratoire a étudié la possibilité d'utiliser **une lignée de pDC, les cellules GEN2.2** (qui seront décrites ultérieurement), en tant que nouvelle stratégie immunothérapeutique dénommée **GENiusVac** pour le traitement de cancers ou de maladies infectieuses chroniques. Cette approche consisterait à **induire des réponses T spécifiques d'antigènes** restreintes par le HLA-A*0201 en injectant au patient la lignée de pDC irradiée et chargée par des peptides viraux ou tumoraux. Le Dr. Caroline Asford a montré que la stimulation semi-allogénique de PBMC issues de donneurs sains HLA-A*0201⁺ par GENiusVac conduit à 5-20 % de lymphocytes T spécifiques (tétramère⁺) et fonctionnels en 7 jours, 40-60 % en 15 jours et jusqu'à 98 % en 40 jours pour des antigènes viraux et tumoraux. L'induction de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques par GENiusVac est **plus efficace que celle obtenue avec des mDC autologues** ou semi-allogéniques. La vaccination par GENiusVac de souris immunodéficientes reconstituées avec des PBMC humaines HLA-A*0201⁺ a démontré la **possibilité d'induire de telles réponses in vivo**. De plus l'inhibition du développement tumoral chez ces souris humanisées permet de démontrer l'efficacité thérapeutique de cette stratégie. De façon importante, Dr. Asford et Dr. Charles ont montré que GENiusVac permet **d'induire ex vivo de fortes fréquences de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques** et fonctionnels à partir de PBMC ou de TIL (tumor-infiltrating lymphocytes, lymphocytes infiltrant la tumeur) de patients porteurs de mélanome en stade I-IV. Les réponses à l'encontre des antigènes de mélanome MelA, GP100, tyrosinase et MAGE-3 ont pu atteindre 62 %, 24 %, 85 % et 4,3 % de cellules tétramère⁺ respectivement. Ces lymphocytes T spécifiques sécrètent de l'IFN- γ et présentent une activité cytotoxique contre les cellules tumorales de mélanome semi-allogéniques et autologues. Toutes ces données, qui seront publiées prochainement, forment la preuve de concept d'**une nouvelle stratégie immunothérapeutique très prometteuse**.

V. Elaboration d'une lignée de pDC : les cellules GEN2.2

Compte tenu de la difficulté à purifier les pDC à partir du sang périphérique, notre laboratoire a tenté et a réussi à **générer une lignée de pDC, nommée GEN2.2**, établie à partir de l'entité leucémique dérivée de pDC (LpDC) décrite récemment(Chaperot et al. 2001). Au niveau clinique, cette pathologie agressive présente des lésions nodales et cutanées et progresse fréquemment vers la leucémie(Feuillard et al. 2002). Les LpDC sont caractérisées par leur expression de CD4, CD56 et CD123 et l'absence d'expression des marqueurs de la lignée lymphoïde (CD3, CD8, CD16, CD19, CD20 et CD57) et myéloïde (CD13 et CD33). Ces cellules surexpriment les ARNm codant pour pT α , λ 5 et Spi-B(Briere et al. 2002), elles expriment **BDCA-2** et **BDCA-4** et après stimulation virale, **maturent et produisent de l'IFN- α** , de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF α (Chaperot et al. 2004). De plus, elles sont capables d'**induire la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs** en lymphocytes TH1 et TH2 après activation par Flu et par IL-3 et CD40L respectivement(Chaperot et al. 2004). Parce qu'elles partagent les mêmes traits phénotypiques et fonctionnels que leurs homologues normales, les cellules GEN2.2 constituent **un outil inépuisable et standardisable** pour l'étude de la biologie des pDC.

RESULTATS

Objectif de l'étude

Comme nous l'avons vu, plusieurs stratégies thérapeutiques innovantes dans le traitement des maladies infectieuses, des allergies et du cancer ciblent les TLR par l'utilisation d'agonistes synthétiques. En effet, l'activation de ces récepteurs est le signal initial pour l'induction d'une réponse immune. Actuellement, les agonistes thérapeutiques les plus utilisés ciblent principalement les TLR7 et -9 qui sont exprimés de façon prédominante par les pDC. Ces cellules sont donc un sujet d'investigation pour le développement de nouvelles immunothérapies anticancéreuses.

Notre laboratoire avait observé que la stimulation des pDC par des ligands de TLR7 naturels ou synthétiques pouvait induire soit l'expression de molécules de co-stimulation et la production de cytokines pro-inflammatoires soit la production massive d'IFN de type I. Cependant, les deux types de ligands conduisaient à l'expression de TRAIL. Les voies de signalisation en aval du TLR7 décrites dans la littérature, que nous venons de voir, ne permettaient pas de comprendre comment la stimulation des pDC par ces ligands pouvait induire de tels profils d'activation.

Pour ces raisons, nous avons étudié dans une première partie les voies de signalisation induites par un ligand naturel, le virus *influenza* (Flu), et un ligand synthétique de TLR7, le CL097, dans les pDC humaines isolées du sang et dans les cellules GEN2.2. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation conduisant à l'expression rapide des gènes induits par l'IFN (ISG) et ce, de façon indépendante de l'IFN de type I.

Dans une deuxième partie, nous avons déterminé si cette voie particulière peut être induite dans les pDC après stimulation du TLR9 par deux

types de CpG. Nous nous sommes également intéressés à l'identification des facteurs signalétiques responsables de l'activation de cette voie de signalisation en ciblant sur un rôle possible du calcium.

Enfin, nous avons caractérisé les cellules dendritiques circulantes chez les patients porteurs de mélanome afin de savoir si ces cellules sont mobilisables et activables dans l'optique de la mise en place d'une immunothérapie utilisant des agonistes de TLR.

Article 1. La stimulation du TLR7 dans les cellules dendritiques plasmocytoïdes conduit à l'expression rapide de gènes induits par l'IFN en absence d'IFN de type I

A) Résumé :

La fixation d'un ligand sur le TLR7 induit l'activation des pDC qui répondent alors par la production de grandes quantités d'IFN de type I ou par la production de cytokines pro-inflammatoires et l'acquisition d'un phénotype d'APC activée. L'engagement du TLR7 peut conduire à l'activation des voies NF- κ B et MAPK qui induisent l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des molécules de co-stimulation ainsi qu'à la translocation du facteur IRF7 qui contrôle la transcription des gènes codant pour les IFN de type I. La stimulation du TLR7 conduit également à l'expression des gènes induits par l'IFN comme MxA, CXCL10 et TRAIL. Il a été montré dans un modèle murin qu'une boucle autocrine de l'IFN de type I permet l'expression de ces gènes.

Afin de comprendre comment la stimulation des pDC par des ligands d'un même récepteur peut conduire à ces différents profils d'activation, nous avons analysé les événements signalétiques induits par deux ligands de TLR7 : le virus *influenza* (Flu, un ligand naturel) et le CL097 (un ligand synthétique), dans des pDC humaines isolées du sang et dans les cellules de la lignée GEN2.2.

Nous démontrons qu'il existe une nouvelle voie de signalisation en aval du TLR7 dans les pDC qui conduit à l'expression rapide des gènes induits par l'IFN en absence d'IFN de type I. Cette voie implique la phosphorylation précoce de STAT1 de façon dépendante de la voie PI3K-MAPK. Cette caractéristique confère aux pDC la capacité de répondre plus rapidement à

l'infection virale, renforçant leur rôle dans les phases précoces de la réponse immune. Enfin, ce travail permettrait d'aider à définir de nouvelles cibles thérapeutiques pour favoriser l'activation des pDC dans le cas d'immunothérapies antivirales et anti-tumorales et pour inhiber leur activité en contexte d'auto-immunité.

TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN

Jérémy Di Domizio, Ariane Blum, Maighread Gallagher-Gambarelli, Jean-Paul Molens, Laurence Chaperot and Joël Plumas

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published semimonthly by the American Society of Hematology, 1900 M St, NW, Suite 200, Washington DC 20036.

Copyright 2007 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN

Jérémy Di Domizio,^{1,3} Ariane Blum,^{1,3} Maighread Gallagher-Gambarelli,^{1,4,5} Jean-Paul Molens,^{1,3} Laurence Chaperot,^{1,3} and Joël Plumas^{1,3}

¹Université Joseph Fourier, Grenoble; ²Inserm U823, Immunobiologie et immunothérapie des cancers, La Tronche; ³Etablissement Français du sang (EFS) Rhône-Alpes, Laboratoire R&D, La Tronche; ⁴Commissariat à l'Énergie Atomique, Direction des sciences du vivant, institut de recherches en technologies et sciences pour le vivant, Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes, Grenoble; and ⁵Inserm U880, Grenoble, France

On recognition of influenza virus (Flu) by TLR7, plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce type I IFN in significant amounts. Synthetic TLR7 ligands induce the maturation of pDCs, as evidenced by the expression of costimulatory molecules and the production of proinflammatory cytokines; however, they induce only low-level production of IFN- α . To dissect the TLR7 signaling in pDCs and how these different profiles are induced, we studied the effects of 2 TLR7 ligands (Flu and

CL097) on the activation of blood-isolated pDCs and the human GEN2.2 pDC cell line. Type I IFN production by pDCs correlates with differential interferon regulatory factor 7 (IRF7) translocation into the nucleus induced by the 2 TLR7 ligands. Surprisingly, with both activators we nevertheless observed the rapid expression of the IFN-inducible genes *mx*, *cxcl10*, and *trail* within 4 hours of stimulation. This expression, controlled by STAT1 phosphorylation, was independent of type

I IFN. STAT1 activation was found to be strictly dependent on the PI3K-p38MAPK pathway, showing a new signaling pathway leading to rapid expression of IFN-inducible genes after TLR7 triggering. Thus, pDCs, through this unusual TLR7 signaling, have the capacity to promptly respond to viral infection during the early phases of the innate immune response. (Blood. 2009;114:1794-1802)

Introduction

Toll-like receptors (TLRs) contain a leucine-rich repeat ectodomain that enables the recognition of pathogen-associated molecular patterns.¹ Among the 10 TLRs identified in humans, TLR7 is the least studied. This TLR binds single-stranded viral RNA, localizes to endosomal compartments, and is particularly expressed by plasmacytoid dendritic cells (pDCs).² Ligand binding to TLR7 activates human pDCs that respond by either producing proinflammatory cytokines or substantial levels of type I IFN and activating specific T cells.³⁻⁵ In addition, we have recently shown that Flu and TLR7 agonist-activated pDCs express TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). This renders them capable of direct cytotoxic activity toward infected and tumor cells.⁶ This has been observed in vivo: Stary et al⁷ describe the presence of TRAIL-expressing and IFN- α -producing pDCs in tumors after topical use of the TLR7 ligand imiquimod in basal cell carcinoma treatment. Taken together, these data suggest that pDCs represent key target cells in the striking antitumor effects observed with synthetic TLR7 agonists, such as imidazoquinolines, in the treatment of cutaneous virus-induced neoplasia (eg, condyloma-HPV),⁸ and other skin tumors, such as basal cell carcinoma.⁹

The signaling pathways triggered by TLR7 activation have been partially described. After ligand recognition, endosomal TLR7 interacts with the key adaptor molecule MyD88 (myeloid differentiation primary-response gene 88) that recruits a signal complex comprising IRAK1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1), IRAK4, and TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6). TLR7 triggering leads to the activation of NF- κ B (nuclear

factor- κ B) and MAPKs (mitogen-activated protein kinases), inducing the expression of proinflammatory cytokines and costimulatory molecules and the translocation of IRF7 (interferon-regulatory factor 7) into the nucleus, where it can induce the transcription of type I IFN genes.¹⁰ Agonistic engagement of TLR7 also leads to the expression of the IFN-inducible genes *mx*, *cxcl10*, and *trail*.¹¹ A type I IFN autocrine loop is thought to explain the expression of these genes, as has been described in mouse bone marrow-derived DCs.¹² However, the precise pathway downstream of TLR7 leading to human pDC activation remains to be determined.

In this study we analyzed the activation profile and signaling events triggered by 2 TLR7 ligands: influenza virus (Flu; natural ligand) and CL097 (synthetic agonist). We studied the effects of these 2 ligands on both blood-isolated pDCs and the pDC model cell line GEN2.2. Results of these studies show the existence of a novel pathway downstream of TLR7 involving early STAT1 phosphorylation and expression of IFN-inducible genes in the absence of type I IFN.

Methods

Antibodies, flow cytometry

Surface or intracellular phenotype was determined by flow cytometry on a FACSCanto II (Becton Dickinson), using specific antibodies, by direct or

Submitted April 15, 2009; accepted June 15, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, June 24, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-04-216770.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2009 by The American Society of Hematology

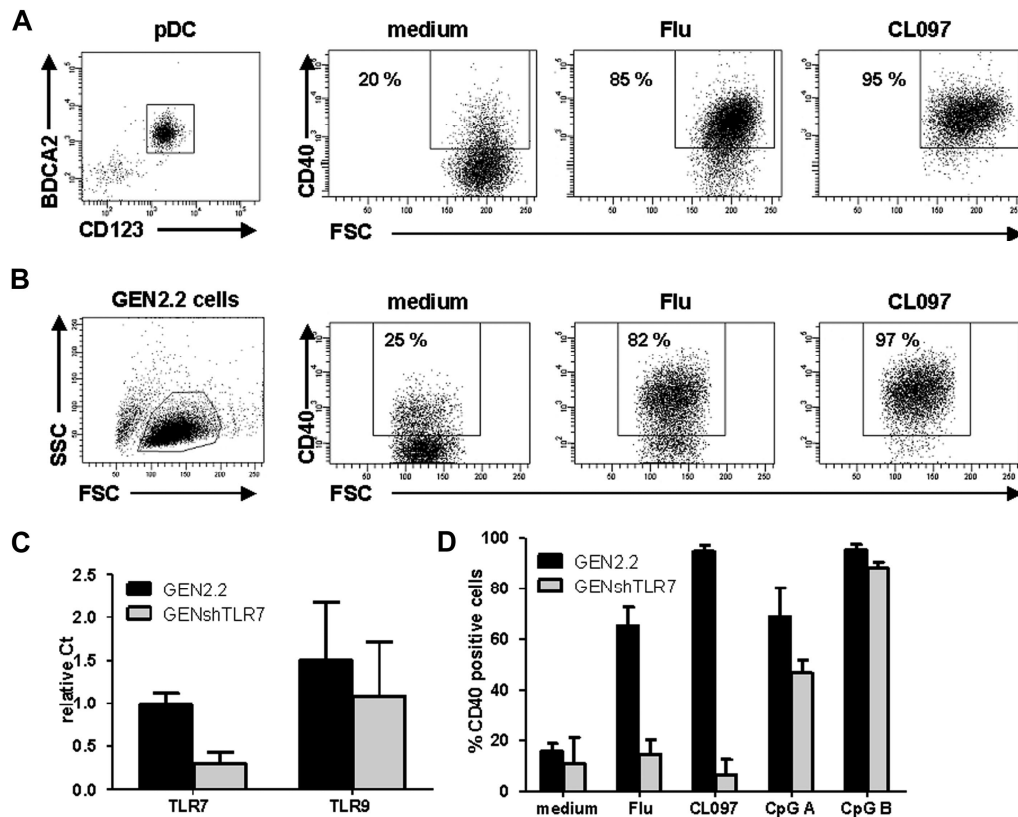


Figure 1. Influenza virus and CL097 induce human pDC activation by triggering TLR7. (A, left) Flow cytometric evaluation of purity of unstimulated pDCs enriched from healthy donor blood labeled with anti-BDCA2 and anti-CD123 antibodies. Cells were untreated (medium) or stimulated with UV-formol-inactivated influenza virus (Flu) or synthetic TLR7 ligand (CL097). Expression of CD40 was measured by flow cytometry on CD123⁺ cells. Dot plots are shown, the percentage of CD40⁺ cells is indicated on each plot. Results shown are representative of 4 independent experiments. (B) GEN2.2 cells were untreated or stimulated with Flu or CL097 for 24 hours. CD40 expression was evaluated on forward scatter (FSC)/side scatter (SSC)-gated live cells by flow cytometry. Percentages indicated on dot correspond to the proportion of CD40⁺ cells. Results shown are representative of at least 5 independent experiments. (C) Expression levels of TLR7 and TLR9 in the GEN2.2 cell line and in lentiviral shRNA TLR7-transfected GEN2.2 cells (GENshTLR7) measured by real-time PCR. Expression levels are normalized to G6PDH. Data are shown as the mean and SD from duplicate values of 2 independent experiments. (D) GEN2.2 and GENshTLR7 cells were untreated or stimulated with Flu, CL097, or 2 different synthetic TLR9 ligands (CpG A and CpG B) for 24 hours. Expression of CD40 was measured by flow cytometry. The mean percentages and SDs from duplicate values of 3 independent experiments are shown.

indirect labeling. The following antibodies were from Immunotech (Beckman Coulter): PE-conjugated anti-CD40 (mAb89), PE-conjugated anti-CD80 (mAb104), and PE-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). PE-conjugated anti-CD123 (9F5) was purchased from PharMingen. PE-conjugated antiphospho-STAT1 (4a/ pY701-stat1) was from BD (Becton Dickinson). FITC-conjugated anti-BDCA-2 (AC144) and FITC-conjugated anti-IFN- α (LT27:295) were from Miltenyi Biotec, and purified anti-TRAIL (2E5) from from Alexis.

Cells

Normal pDCs were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy volunteers with a BDCA-4 cell isolation kit (Miltenyi Biotec). Their purity, as determined with anti-BDCA-2 and anti-CD123 mAbs, was approximately 80% (Figure 1A).

The pDC cell line GEN2.2 was grown in complete medium (RPMI 1640 Glutamax; GibcoBRL) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 20 μ g/mL gentamicin, nonessential amino acids) to which 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco) was added.

Generation of lentiviral shRNA TLR7-transfected GEN2.2 cells

GEN2.2 cells were transfected with MISSION Lentiviral transduction particles targeting TLR7 (NM_016562) Clone ID: TRCN0000056975 (Sigma-Aldrich) at MOI 2. Transfected cells were maintained in the presence of 10 μ g/mL puromycin for 2 weeks to allow the selection of resistant clones that we called GENshTLR7 cells. The level of TLR7 mRNA expression in GENshTLR7 cells was assessed by real-time polymerase chain

reaction (PCR). Silencing was found to diminish TLR7 mRNA expression by 80%.

Activation of GEN2.2 cells

Cells were cultured at 10⁶ cells/mL in complete medium with 10% fetal calf serum. Cells were stimulated with either 640 UHA/mL UV-formol-inactivated influenza virus strain A/H3N2/Wisconsin/67/05 (Sanofi Pasteur) or 1 μ g/mL CL097 (TLR7/8 ligand; Invivogen) or 10 μ g/mL CpG-A ODN 2336 (TLR9 ligand; Coley Pharmaceuticals) or 10 μ g/mL CpG-B ODN 2216 (TLR9 ligand; Invivogen) or 50 000 U/mL human recombinant IFN- α (PeproTech). For some experiments, blocking anti-IFN- α (50 000 U/mL; PBL Medical Laboratories), anti-IFN- β (25 000 U/mL; PBL Medical Laboratories), and anti-IFN- α/β 2 (5 μ g/mL; PBL Medical Laboratories) or inhibitors from Calbiochem were added: 5 μ M BAY11-7082, 5 μ M BMS-345541, 10 μ M LY-294002, or 50 μ M SB203580. After stimulation, phenotypic analyses were performed by flow cytometry. Culture supernatants were cryopreserved for cytokine measurements. These supernatants were tested for IFN- α content by enzyme-linked immunosorbent assay (PBL Medical Laboratories) and for IL-6, IL-8, TNF- α , and CXCL10 by Cytometric Bead Array multiplex (CBA; BD Biosciences).

Protein extraction and signaling factor analysis

After stimulation of GEN2.2 cells, cytosolic and nuclear fractions were extracted with the use of the protein extraction kit from Active Motif. Nuclear extracts were probed for NF- κ B subunits c-Rel, p50, p52, p65, and RelB content with the use of the TransAM NF- κ B family kit (Active Motif).

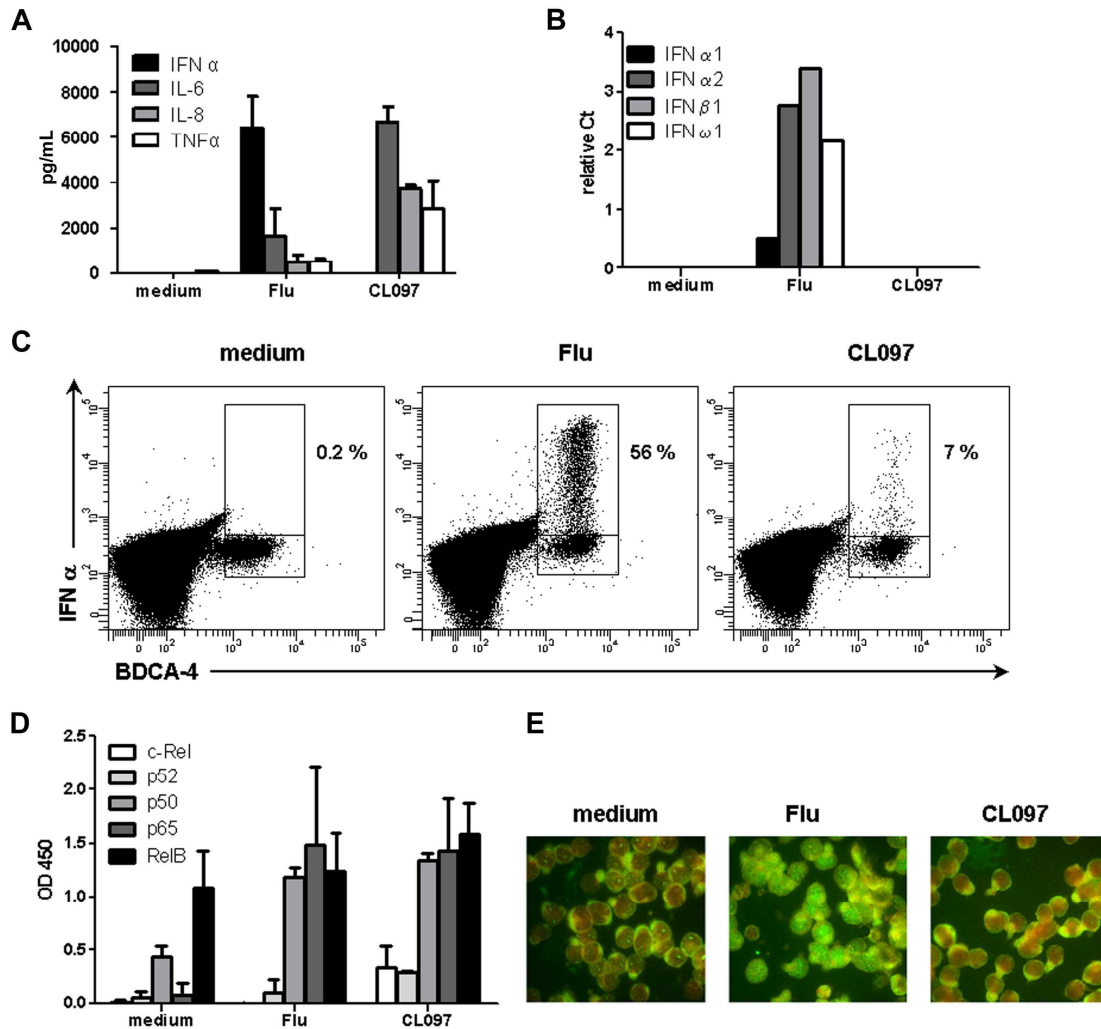


Figure 2. Differential pDC maturation is triggered by different TLR7 ligands. GEN2.2 cells were untreated or stimulated with Flu or CL097 for 24 hours. (A) Production of proinflammatory cytokines was measured in culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay and CBA. The mean and SD from duplicate values of 3 independent experiments are shown. (B) After 24 hours of culture, RNA was extracted, and RNA expression levels of type I IFNs: IFN- α 1, - α 2, - β 1, and - ω 1 were measured by quantitative PCR. Data shown are normalized to G6PDH and are representative of 2 independent experiments. (C) PBMCs from healthy donors were cultured in the absence or presence of Flu or CL097 for 3 hours. Secretion was blocked by adding brefeldin A for a further 4 hours. Intracellular IFN- α production was measured in HLA-DR⁺ BDCA4⁺ pDCs by flow cytometry. Dot plots show the percentage of IFN- α -producing cells among pDCs. Representative results from 3 different donors are shown. (D) GEN2.2 cells were cultured in the absence or presence of Flu or CL097 for 3 hours. Cells were lysed and proteins were extracted. The different NF- κ B subunits were quantified in nuclear fractions with the use of the TransAM kit. The mean OD and SD from duplicate values of 3 independent experiments are shown. (E) GEN2.2 cells were cultured in the absence or presence of Flu or CL097 for 3 hours. Cells were immunostained for IRF7 and Evans blue colored. Immunofluorescence was assessed by microscopy. Representative images from 3 independent experiments are shown.

Whole-cell extracts were used for quantification of phospho-STAT1 and phospho-p38MAPK by CBA multiplex (BD Biosciences).

Western blot analysis

After activation, GEN2.2 cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), lysed in 100 μ L sample buffer, and heated at 100°C for 5 minutes. Whole-cell extract (20 μ g) was loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad). Nonspecific binding sites were blocked with 5% nonfat milk in PBS Tween20 0.1%. Membranes were then incubated with primary antibodies: antiphospho-STAT1 (4a/pY701), antiphospho-STAT2 (7a/pY; PharMingen), and anti-actin (Sigma-Aldrich). Antibody labeling was shown with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Dako) and was visualized with enhanced chemiluminescence (Amersham Life Science).

Immunofluorescence

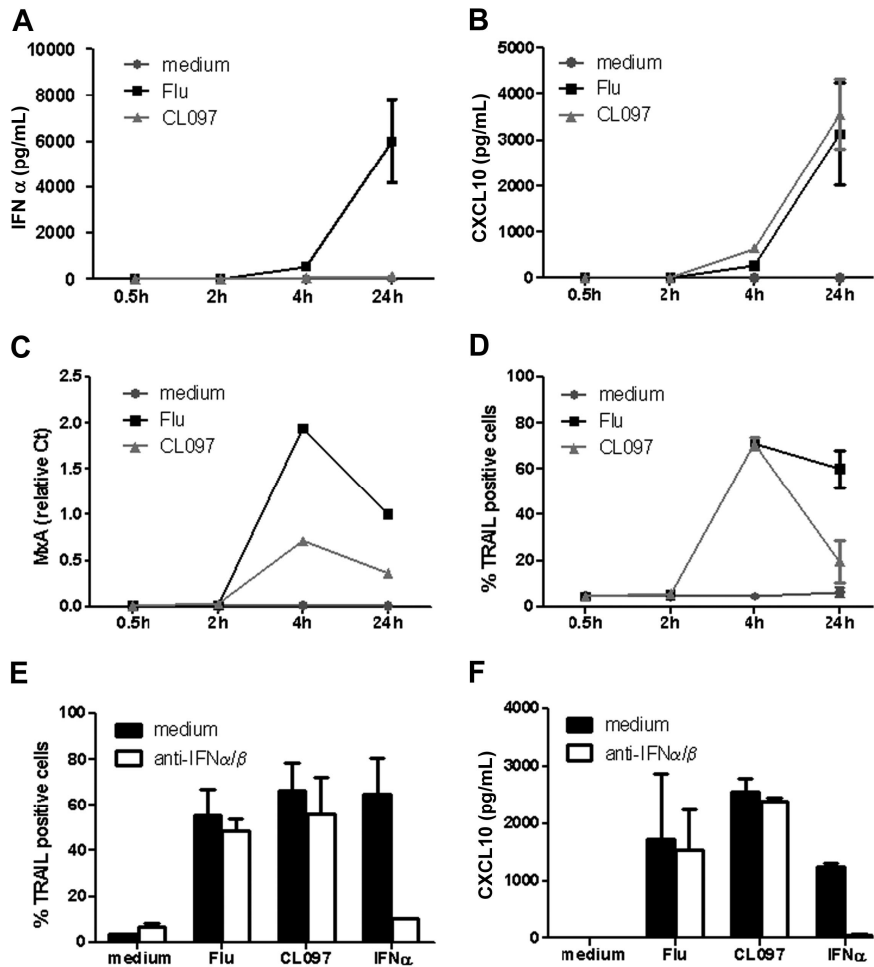
Twenty-one-well Teflon-printed slides (Immuno-Cell International) were coated with 1 μ g/mL poly-L-lysine (Sigma-Aldrich). GEN2.2 cells (10^4) were added to

each well and allowed to adhere for 1 hour. Cells were then stimulated for 2 and 3 hours with 640 UHA/mL UV-formol-inactivated influenza virus strain A/H3N2/Wisconsin/67/05, 1 μ g/mL CL097, or 5000 U/mL human recombinant IFN- α . After activation, medium was removed, slides were fixed in -20°C methanol for 10 minutes and dried at room temperature for 1 hour. Slides were rehydrated in PBS for 10 minutes and then incubated with primary antibody anti-IRF7 (H-246; Santa Cruz Biotechnology). Antibody labeling was revealed with the use of FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (PharMingen). Cells were also colored with 1 mg/mL Evans blue (Sigma-Aldrich) before visualization by fluorescence microscopy. Cells were observed with a Zeiss HBO 50/AC microscope with lens 63X/1.25 oil iris, and images were acquired with a Zeiss MC 80 DX camera by the image-acquisition software Axiovision 4 Version 4.0.1.0.

Quantitative reverse transcription PCR

Total RNA was isolated from stimulated GEN2.2 cells with the use of RNeasy kit (QIAGEN). Reverse transcription to cDNA was carried out by standard methods with reverse transcriptase (Roche Diagnostics) and dNTP (Roche). These cDNAs were amplified with naked primers, LightCycler TaqMan Master mix, and Universal ProbeLibrary probe (Roche). PCRs

Figure 3. TLR7 triggers expression of IFN-inducible genes in a type I IFN-independent manner. GEN2.2 cells were untreated or stimulated with Flu or CL097 for different times. Supernatants were collected for evaluation of (A) IFN- α and (B) CXCL10 production. (C) RNA was extracted for measurement of MxA transcription levels by real-time PCR. (D) TRAIL expression was evaluated by flow cytometry. GEN2.2 cells were untreated or stimulated with Flu or CL097 in the absence or presence of anti-IFN- α/β and anti-IFN- α/β R neutralizing antibodies for 4 hours. (E) TRAIL expression was evaluated by flow cytometry, and (F) CXCL10 production was measured in culture supernatants by CBA. Data shown are the means and SDs from duplicate values from 2 independent experiments except data in panel C, which are representative of 2 independent experiments.



were conducted in a LightCycler instrument (Roche). Primers were synthesized by Roche; their sequences were as follows (listed 5'-3'): G6PDH (forward, AACAGAGTGAGCCCTTCTTCA; reverse, GGAGGCTGCATCATCGTACT); human TLR7 (forward, GCTAGACTGTCTCAAAA-GAACAAAA; reverse, GCCCACACTCAATCTGCAC); human TLR9 (forward, ATAGCCGTGAGCCGGAAT; reverse, GCAGGCAGAGGTGAGGTG); IFN- α_1 (forward, CCCTCTTTATCAACAAACTTGC; reverse, TTGTTTTCAIGTTGGACCAGA); IFN- α_2 (forward, TCCTGCTTGAAGGACAGACA; reverse, TTTCAGCCTTTTGGAACTGG); IFN- β_1 (forward, CTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCA; reverse, GCCAGGAGGTTCTCAACAAAT); IFN- ω_1 (forward, ACCAGCTATAGCCCTGTTGG; reverse, AAGTAGCCATGGTCTGAGG); MxA (forward, TCCAGC-CACCATTTCCAAG; reverse, CAACAAGTTAAATGGTATCACAGAGC). Relative threshold cycle values for each gene were normalized to the housekeeping gene G6PDH with the use of the equation 2^{-dCp} , where Cp is the mean cross point of duplicate runs calculated by Lightcycler software and dCp = gene Cp - G6PDH Cp.

Results

Influenza virus and CL097 induce human pDC activation via TLR7

This study focuses on TLR7 signaling in pDCs. The recently developed human pDC cell line, GEN2.2, was used as a model of pDCs.^{13,14} We evaluated 2 kinds of TLR ligands: CL097, an imidazoquinoline^{15,16} and influenza virus (Flu).¹⁷ We first verified their activity and their specificity for TLR7. After Flu or CL097 stimulation, both enriched primary pDCs (Figure 1A), and the

GEN2.2 cells (Figure 1B) displayed the same activation profile with a high increase of CD40 expression; thus, both ligands were capable of inducing pDC activation. To verify the TLR7 specificity of the effect, TLR7 shRNA lentiviral transfection of GEN2.2 cells was performed, stably transfected cells were selected leading to the establishment of the GENshTLR7 cell line. These cells showed an 80% decrease in TLR7 mRNA expression, whereas levels of TLR9 mRNA were unchanged (Figure 1C). On Flu or CL097 stimulation, GENshTLR7 cells were unable to up-regulate CD40 but maintained their capacity to respond to TLR9 ligands (CpG A and B; Figure 1D). Moreover, GENshTLR7 cells produced neither IFN- α nor inflammatory cytokines after stimulation (data not shown). Control shRNA-transfected cells displayed the same activation profile as untransfected GEN2.2 cells, confirming that the previous results were not attributable to an alteration caused by lentiviral transfection (data not shown). Thus, both Flu and CL097 act specifically on TLR7 to induce CD40 up-regulation and cytokine production. Altogether, these data show that Flu and CL097 activate human pDCs by triggering TLR7.

Influenza virus and CL097 induce differential activation of pDCs

pDCs are known to secrete proinflammatory cytokines or substantial amounts of type I IFN on activation.^{3,4} The nature of the cytokines produced by GEN2.2 cells after activation by the 2 TLR7 ligands was evaluated. CL097-stimulated GEN2.2 cells produced the proinflammatory cytokines IL-6, IL-8, and TNF- α , whereas Flu-activated cells mainly secreted IFN- α (Figure 2A). To further

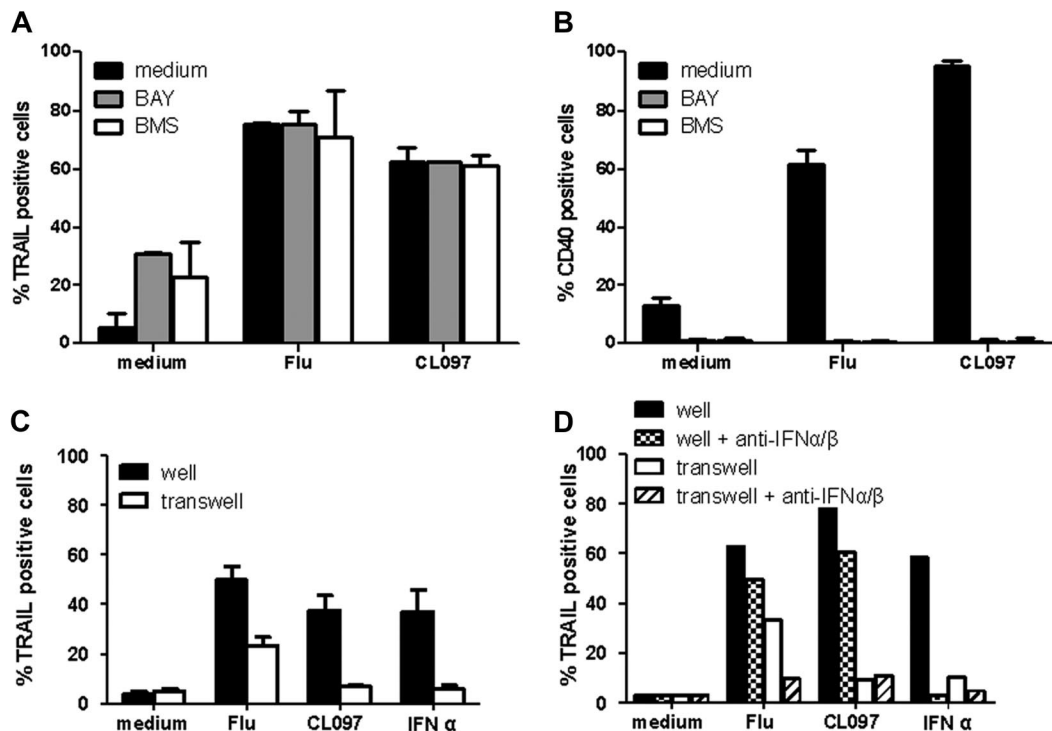


Figure 4. Expression of IFN-inducible genes is independent of the NF- κ B pathway and of extracellular factors. GEN2.2 cells were untreated or stimulated with Flu or CL097 in the absence or presence of the NF- κ B inhibitors BAY and BMS. TRAIL (A) and CD40 (B) expressions were evaluated by flow cytometry after 4 hours and 24 hours of culture, respectively. The mean percentages and SDs from duplicate values of 4 independent experiments are shown. (C) GEN2.2 cells were untreated or stimulated for 2 hours. After washing, cells were placed in 24-well plates; untreated cells were added in transwells. After 4 hours of culture, TRAIL expression was evaluated by flow cytometry on cells in wells and transwells. Data shown are the means and SDs from duplicate values of 3 independent experiments. (D) GEN2.2 cells were untreated or stimulated for 2 hours in the absence or presence of anti-IFN- α/β and anti-IFN- α/β R neutralizing antibodies. After washing, cells were placed in 24-well plates; untreated cells were added in transwells. After 4 hours of culture, TRAIL expression was evaluated by flow cytometry on cells in wells and transwells. Data from 1 representative experiment are shown.

characterize this secretion, the transcription of 4 type I IFN genes was assessed. Only Flu activation induced the transcription of *ifn- α ₁*, *ifn- α ₂*, *ifn- β ₁*, and *ifn- ω ₁* genes in GEN2.2 cells, whereas CL097 activation did not result in transcription of any of the IFN genes tested (Figure 2B). These results were confirmed with human blood pDCs. A higher number of IFN- α -secreting cells were observed after Flu activation (56%) than after CL097 stimulation (7%; Figure 2C). Thus, the 2 TLR7 ligands chosen induced different activation profiles for pDCs.

The transcription factors NF- κ B and IRF7 play essential roles in inducing the expression of proinflammatory cytokines and type I IFN, respectively. Therefore, we examined the translocation of these 2 factors into the nucleus after TLR7 triggering. Both Flu and CL097 induced similar nuclear translocation of p50 and p65 subunits of the canonical NF- κ B dimer (Figure 2D). The quantities of p52 and RelB subunits of the noncanonical NF- κ B pathway were not modified during activation. Interestingly, the NF- κ B c-Rel subunit was detectable only in the nucleus of the CL097-stimulated GEN2.2 cells (Figure 2D). In contrast, IRF7 nuclear translocation was observed only in Flu-activated GEN2.2 cells (Figure 2E). This result corroborates the type I IFN production profile described in the second paragraph. These data suggest that, although both ligands induce inflammatory cytokine secretion via the NF- κ B pathway, Flu but not CL097 induces IFN- α secretion after IRF7 translocation.

IFN-inducible genes are expressed after TLR7 triggering in a type I IFN-independent manner

Secretion of type I IFNs by pDCs leads to the expression of a group of IFN-inducible genes, including *mx*, *cxcl10*, and *trail*.¹⁸⁻²⁰ We

next examined whether the differential type I IFN secretion observed after TLR7 triggering could induce differential expression of these IFN-inducible genes. IFN- α secretion was observed within 4 hours after TLR7 stimulation by Flu, whereas no detectable IFN- α was measured at any time point (up to 24 hours) after CL097 activation (Figure 3A). Surprisingly, the IFN-inducible gene products were nevertheless detected within 4 hours after activation by both TLR7 ligands (Figure 3B-D). The expression profiles were identical whatever the ligand applied: expression peaked at 4 hours and decreased at 24 hours for MxA and TRAIL gene products (Figure 3C-D), whereas CXCL10 production continuously increased up to and beyond 24 hours (Figure 3B). This suggests that, in our model, the induction of MxA, CXCL10, and TRAIL could be independent of IFN- α .

Very low levels of type I IFN could be responsible for inducing the expression of IFN-inducible genes after CL097 stimulation of GEN2.2 cells. To investigate this possibility, GEN2.2 cells were stimulated by the 2 TLR7 ligands in the presence or absence of neutralizing anti-IFN- α/β and anti-IFN- α/β R antibodies. In accordance with the absence of any detectable IFN- α production, the blocking of type I IFN signaling had no effect on TRAIL and CXCL10 expression induced by TLR7 ligands (Figure 3E-F). The preincubation of cells with the neutralizing antibodies for 30 or 60 minutes before ligand exposure to exclude the involvement of any autocrine intracellular type I IFN pathway had no effect on these expressions (supplemental Figure 1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). However, the neutralizing antibodies could block both TRAIL and CXCL10 expression induced by exogenous IFN- α . Altogether, these data show that expression of IFN-inducible genes

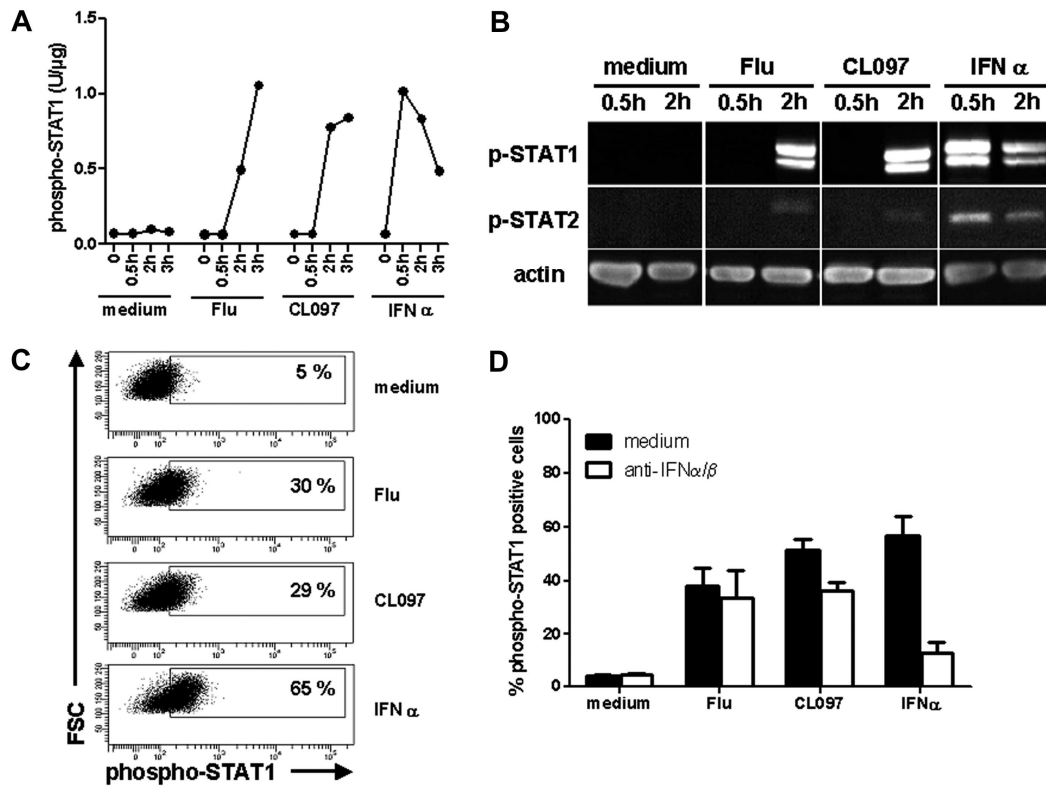


Figure 5. STAT1 is phosphorylated independently of type I IFN after TLR7 triggering with either ligand. GEN2.2 cells were untreated or stimulated with Flu, CL097, or IFN- α for 30 minutes, 2 hours, and 3 hours. Whole-cell protein extracts were prepared. (A) Phospho-STAT1 (pY701) was quantified in the protein extracts by CBA. Data shown are representative of 2 independent experiments. (B) Western blot analysis of phospho-STAT1 (pY701) and phospho-STAT2 (pY690) after activation of GEN2.2 cells. Data shown are representative of 2 independent experiments. (C) After 2 hours of stimulation, cells were fixed and permeabilized for phospho-STAT1 (pY701) analysis by flow cytometry. Representative dot plots of 4 independent experiments are shown. (D) Activation of GEN2.2 cells in the absence or presence of anti-IFN- α/β and anti-IFN- α/β R neutralizing antibodies for 2 hours. Phospho-STAT1 (pY701) was analyzed by flow cytometry. Data shown are the means and SDs from duplicate values of 2 independent experiments.

could be triggered independently of type I IFN within 4 hours after TLR7 triggering.

Expression of IFN-inducible genes is independent of the NF- κ B pathway and extracellular factors

To analyze whether NF- κ B was involved in the observed expression of IFN-inducible genes, we measured TRAIL expression in GEN2.2 cells 4 hours after activation by Flu and CL097 in the presence of the I- κ B kinase inhibitors BAY11-7082²¹ and BMS-345541.²² Neither of these inhibitors altered the TRAIL expression profile (Figure 4A), whereas they both abrogated NF- κ B-dependent CD40 up-regulation (Figure 4B). These results indicate that the expression of IFN-inducible genes after TLR7 triggering is independent of NF- κ B activation.

Extracellular factors could also contribute to the induction of expression of IFN-inducible genes. To rule out their involvement, TRAIL expression was measured on untreated GEN2.2 cells to which supernatants from TLR7-activated GEN2.2 cells were applied. No induction of TRAIL expression was observed in cells exposed to supernatants from CL097-activated cells (Figure 4C). The expression of TRAIL induced by the supernatant from Flu-activated cells was the result of the presence of secreted IFN- α in this supernatant. This expression could be blocked with the use of neutralizing anti-IFN- α/β antibodies (Figure 4D). These latter results show that expression of IFN-inducible genes after TLR7 triggering is caused by a previously undescribed intracellular signaling pathway.

Phosphorylation of STAT1 in response to TLR7 triggering depends on the PI3K-p38MAPK pathway

Expression of IFN-inducible genes is regulated by the transcription factor IFN-stimulated gene factor 3.²³ IFN-stimulated gene factor 3 is in fact a complex of proteins, including STAT1, STAT2, and IRF9. We next examined whether this complex was activated in response to TLR7 triggering. Activation of GEN2.2 cells by both Flu and CL097 induced phosphorylation of STAT1 within 2 hours (Figure 5A-B) at levels comparable to the classic type I IFN activation (Figure 5B). Low-level phosphorylation of STAT2 was also observed (Figure 5B). In these analyses, no variation in total STAT protein quantity was observed (data not shown). These results were further confirmed by flow cytometric analysis. Results showing that STAT1 was phosphorylated in one-third of the GEN2.2 cells within 2 hours after TLR7 activation are presented in Figure 5C. The presence of neutralizing anti-IFN- α/β and anti-IFN- α/β R antibodies, which prevented IFN- α -induced STAT1 activation, had no effect on the level of STAT1 phosphorylation induced subsequent to TLR7 triggering (Figure 5D). Thus, STAT1 activation could also be induced via TLR7 signaling in a type I IFN-independent manner.

Other groups have suggested that STAT1 phosphorylation in response to TLR9 triggering depends on p38MAPK activation.²⁴ To test this hypothesis in the TLR7 model, we analyzed the activation of p38MAPK in stimulated GEN2.2 cells. Phosphorylation of p38MAPK was observed within 30 minutes after stimulation of GEN2.2 cells by either Flu or CL097, but not after

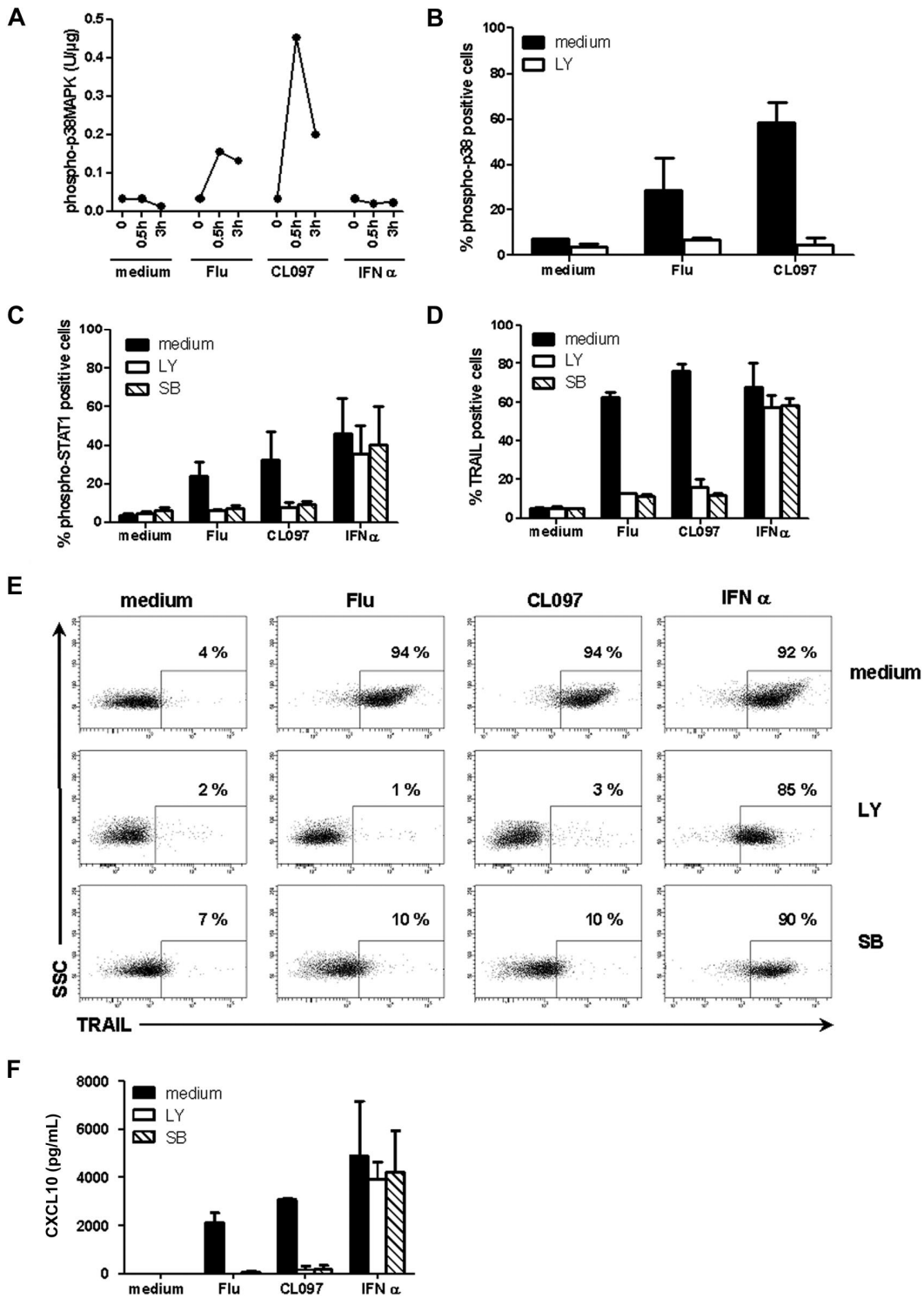


Figure 6. STAT1 phosphorylation and expression of IFN-inducible genes after TLR7 triggering depends on the PI3K-p38MAPK pathway. GEN2.2 cells were untreated or stimulated with Flu, CL097, or IFN- α for 30 minutes or 3 hours. (A) Phospho-p38MAPK (pT180/pY182) was quantified on whole-cell lysates by CBA. Data shown are representative of 2 independent experiments. (B) GEN2.2 cells were untreated or stimulated with Flu, CL097, or IFN- α for 30 minutes in the absence or presence of the PI3K inhibitor LY. Cells were fixed and permeabilized for phospho-p38MAPK (pT180/pY182) analysis by flow cytometry. The mean percentages and SDs from duplicate values of 2 independent experiments are shown. (C) Phospho-STAT1 (pY701) and (D) TRAIL expression were analyzed by flow cytometry after 2 hours or 4 hours of stimulation of GEN2.2 cells with Flu, CL097, or IFN- α in the absence or presence of LY and the specific p38MAPK inhibitor SB203580 (SB). The mean percentages and SDs from duplicate values of 3 independent experiments are shown. Blood-isolated pDCs were unstimulated or stimulated with Flu or CL097 for 4 hours in the absence or presence of LY and SB. (E) Expression of TRAIL was evaluated by flow cytometry. Dot plots representative of 2 experiments are shown. The percentage of TRAIL-positive cells is indicated on each plot. (F) CXCL10 production was measured in cell culture supernatants by CBA. The mean and SD from duplicate values of 2 experiments performed with 2 different donors are shown.

activation by type I IFN, as was expected (Figure 6A). Thus, phosphorylation of p38MAPK is induced by TLR7 stimulation. We next investigated the possible pathway linking TLR7 via p38MAPK to STAT1. We found PI3K, which has previously been linked to the TLR7 pathway,²⁵ to have a role in this pathway. The PI3K inhibitor LY294002, in addition to altering the p38MAPK phosphorylation profile in response to TLR7 triggering (Figure 6B), also impaired STAT1 phosphorylation and TRAIL expression by GEN2.2 cells. A similar effect was observed in the presence of the specific²⁶ p38MAPK inhibitor SB203580 (Figure 6C-D). These results were confirmed on blood-isolated pDCs after stimulation of cells with Flu or CL097 whereby the presence of LY or SB inhibited TRAIL expression (Figure 6E) and CXCL10 production (Figure 6F). Taken together, these data show that both STAT1 activation and the expression of IFN-inducible genes after TLR7 triggering depended on the PI3K-p38MAPK pathway.

Discussion

Many studies have suggested that the effects triggered by TLR7 ligands as adjuvants in cancer immunotherapy could be attributed to the activation of pDCs and their subsequent type I IFN production.^{7,27,28} To understand how agonists for the same receptor lead to different activated pDC phenotypes, we initiated a study of the signaling pathways induced in pDCs by 2 different TLR7 ligands. In this study we show that, in contrast to Flu activation, CL097 stimulation of pDCs does not induce production of high levels of IFN- α . However, we were able to show that both TLR7 ligands led to rapid expression of IFN-inducible genes via a type I IFN-independent pathway.

The data presented here show that Flu and CL097 both trigger human TLR7 but induce differential cytokine production. With the use of stably shRNA-transfected cells, GENsh-TLR7, we could show that human pDC activation by inactivated influenza virus required TLR7, as had been previously described in a mouse model.¹⁷ Type I IFN production after CL097 activation was found to be null or extremely low compared with the massive amounts of IFN- α produced in the presence of Flu. This result corroborated those concerning IRF7 translocation into the nucleus of pDCs after stimulation with the different ligands. This differential type I IFN production is reminiscent of results obtained with TLR9 ligands.²⁹ Kerkmann et al²⁹ have shown that TLR9 triggering with CpG A ODNs leads to a high production of type I IFN, whereas CpG B ODNs, although they bind TLR9, are unable to induce IFN secretion. The mechanism responsible for the differential behavior of pDCs after TLR9 triggering has been suggested to be the result of the spatiotemporal location of the ligand within the cell and its higher order structure.³⁰ Indeed, multimeric CpG A ODNs are retained within endosomes, whereas monomeric CpG B ODNs traffic to lysosomal compartments where they trigger the activation of different signaling factors.^{31,32} Similarly, Heil et al³³ observed that synthetic TLR7 ligands induce higher IFN- α production by PBMCs when complexed to the cationic lipid DOTAP.³³ Thus, Flu's RNAs may follow the same cell trafficking as multimeric CpG A ODNs, whereas CL097 may rather stay in a monomeric structure such as CpG B, leading to a lysosomal location and absence of type I IFN production.

MxA, CXCL10, and TRAIL, through their role in the inhibition of virus replication, in the chemotaxis of immune cells, and in the apoptosis of transformed and infected cells, are

key players in countering infection and cancers.³⁴ Here, we have shown that these genes, which have been described to be tightly regulated by IFNs in various hematopoietic cells,^{23,35} are rapidly expressed in TLR7-activated pDCs in the absence of type I IFN production, even when type I IFN-receptor signaling was blocked with neutralizing anti-IFN- α / β and anti-IFN- α /13R antibodies. Although expression of the "IFN-inducible" genes was independent of IFN, it remained dependent on STAT1 phosphorylation on Tyr-701. This phosphorylation was found to be p38MAPK dependent in our model, a similar signaling pathway was also described in CpG A-activated pDCs.²⁴ However, because p38MAPK is a serine kinase, known to phosphorylate STAT1 on Ser-727,³⁶ this tyrosine phosphorylation of STAT1 must be mediated by an intermediate tyrosine kinase whose activation depends on p38MAPK. Both the Janus kinases 1 and 2 and c-Src are able to phosphorylate STAT1 on Tyr-701,^{23,37} but their activation is generally associated with cytokine receptors.³⁸ In our model, we have shown that no soluble factors were involved. Therefore, the intermediate kinase responsible for STAT1 phosphorylation in response to TLR7 stimulation remains to be identified.

Here, we have shown that PI3K is involved in the activation of p38MAPK, whereas other groups have shown its implication in IRF7 translocation.^{25,39} Moreover, the NF- κ B-dependent expression of CD80 and cytokine production were also impaired in the presence of LY after TLR7 triggering (data not shown), suggesting that PI3K is a key early signaling factor in the TLR7 pathway.

Altogether, exhaustive characterization of the signaling pathway downstream of TLR7 in pDCs led us to describe the expression of IFN-inducible genes in the absence of cytokine receptor engagement. This originality may confer on pDCs the capacity to respond more rapidly to viral infection, reinforcing their role in the early phases of the immune response. Finally, the work described here may help to define new therapeutic targets that could favor pDC activation in tumor and viral immunotherapy or to dampen it in pDC-driven autoimmunity.

Acknowledgments

This work was supported by 2 grants from the Institut National du Cancer and the Canc erop le Lyon- Auvergne Rh ne-Alpes (ACI-63-04 and Canc erop le 2004-5). J.D.D.'s PhD was financed by the Minist re de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie. A.B. was the recipient of a grant from EFS. M.G.-G. received a Young Researcher's grant from Inserm.

Authorship

Contribution: J.D.D. performed the experiments, analyzed the results, made the figures, and wrote the paper; A.B. and J.-P.M. performed part of the experiments; M.G.-G., L.C., and J.P. proofread the manuscript; and J.D.D., L.C., and J.P. designed the research.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Laurence Chaperot, R&D Laboratory, EFS Rh nes-Alpes, 29 Av Maquis du Gresivaudan, BP35 La Tronche, 38701 France; e-mail: laurence.chaperot@efs.sante.fr.

References

- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
- Ito T, Wang YH, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol*. 2005; 26(3):221-229.
- Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol*. 2002;218(1-2):74-86.
- Asselin-Paturel C, Trinchieri G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med*. 2005;202(4):461-465.
- Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood*. 2003;101(9):3520-3526.
- Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2006;176(1):248-255.
- Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2007; 204(6):1441-1451.
- Garland SM, Waddell R, Mindel A, Denham IM, McCloskey JC. An open-label phase II pilot study investigating the optimal duration of imiquimod 5% cream for the treatment of external genital warts in women. *Int J STD AIDS*. 2006;17(7):448-452.
- Gollnick H, Barona CG, Frank RG, et al. Recurrence rate of superficial basal cell carcinoma following treatment with imiquimod 5% cream: conclusion of a 5-year long-term follow-up study in Europe. *Eur J Dermatol*. 2008;18(6):677-682.
- Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(8):594-606.
- Birmachu W, Gleason RM, Bulbulian BJ, et al. Transcriptional networks in plasmacytoid dendritic cells stimulated with synthetic TLR 7 agonists. *BMC Immunol*. 2007;8:26.
- Gautier G, Humbert M, Deaevieau F, et al. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med*. 2005; 201(9):1435-1446.
- Chaperot L, Bendriss N, Manches O, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2001;97(10):3210-3217.
- Chaperot L, Perrot I, Jacob MC, et al. Leukemic plasmacytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts. *Eur J Immunol*. 2004;34(2):418-426.
- Jurk M, Heil F, Vollmer J, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848 [letter]. *Nat Immunol*. 2002;3(6):499.
- Lee J, Chuang TH, Redecke V, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(11):6646-6651.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004;303(5663):1529-1531.
- Gurney KB, Colantonio AD, Blom B, Spits H, Uittenbogaart CH. Endogenous IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells exerts an antiviral effect on thymic HIV-1 infection. *J Immunol*. 2004;173(12):7269-7276.
- Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol*. 2004;75(3):504-514.
- Kemp TJ, Elzey BD, Griffith TS. Plasmacytoid dendritic cell-derived IFN- α induces TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2L-mediated antitumor activity by human monocytes following CpG oligodeoxynucleotide stimulation. *J Immunol*. 2003;171(1):212-218.
- Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, et al. Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem*. 1997;272(34):21096-21103.
- Burke JR, Pattoli MA, Gregor KR, et al. BMS-345541 is a highly selective inhibitor of I κ B kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF- κ B-dependent transcription in mice. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1450-1456.
- Stark GR. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(5-6):419-423.
- Takauji R, Iho S, Takatsuka H, et al. CpG-DNA-induced IFN- α production involves p38MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *J Leukoc Biol*. 2002;72(5):1011-1019.
- Guiducci C, Ghirelli C, Marloie-Provost MA, et al. PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation. *J Exp Med*. 2008;205(2):315-322.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 2000;35(pt 1):95-105.
- Inglefield JR, Dumitru CD, Alkan SS, et al. TLR7 agonist 852A inhibition of tumor cell proliferation is dependent on plasmacytoid dendritic cells and type I IFN. *J Interferon Cytokine Res*. 2008;28(4):253-263.
- Smits EL, Ponsaerts P, Berneman ZN, Van Tendeloo VF. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *Oncologist*. 2008;13(8):859-875.
- Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2003;170(9):4465-4474.
- Honda K, Ohba Y, Yanai H, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature*. 2005; 434(7036):1035-1040.
- Guiducci C, Ott G, Chan JH, et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med*. 2006;203(8):1999-2008.
- Haas T, Schmitz F, Heit A, Wagner H. Sequence independent interferon- α induction by multimerized phosphodiester DNA depends on spatial regulation of Toll-like receptor-9 activation in plasmacytoid dendritic cells. *Immunology*. 2009; 126(2):290-298.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004; 303(5663):1526-1529.
- Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. 2003;8(3):237-249.
- van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*. 2006; 25(3):361-372.
- Kovarik P, Stoiber D, Evers PA, et al. Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN- γ uses a different signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):13956-13961.
- Chang YJ, Holtzman MJ, Chen CC. Differential role of Janus family kinases (JAKs) in interferon- γ -induced lung epithelial ICAM-1 expression: involving protein interactions between JAKs, phospholipase C γ , c-Src, and STAT1. *Mol Pharmacol*. 2004;65(3):589-598.
- Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 2007; 26(47):6724-6737.
- Cao W, Manicassamy S, Tang H, et al. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat Immunol*. 2008;9(10):1157-1164.

B) Résultats complémentaires et discussion :

1. Expression d'autres gènes induits par l'IFN après activation du TLR7

En plus de MxA, CXCL10 et TRAIL, nous avons analysé la transcription d'autres gènes connus pour être induits par l'IFN comme IRF7 et G1P3. Ainsi nous avons pu observer que ces deux gènes sont transcrits dès 4 h après activation des cellules GEN2.2 par les deux types de ligands de TLR7 (Figure R1.A et B). Le taux d'expression de ces gènes est cependant plus élevé dans les cellules stimulées par Flu qu'après activation par le CL097.

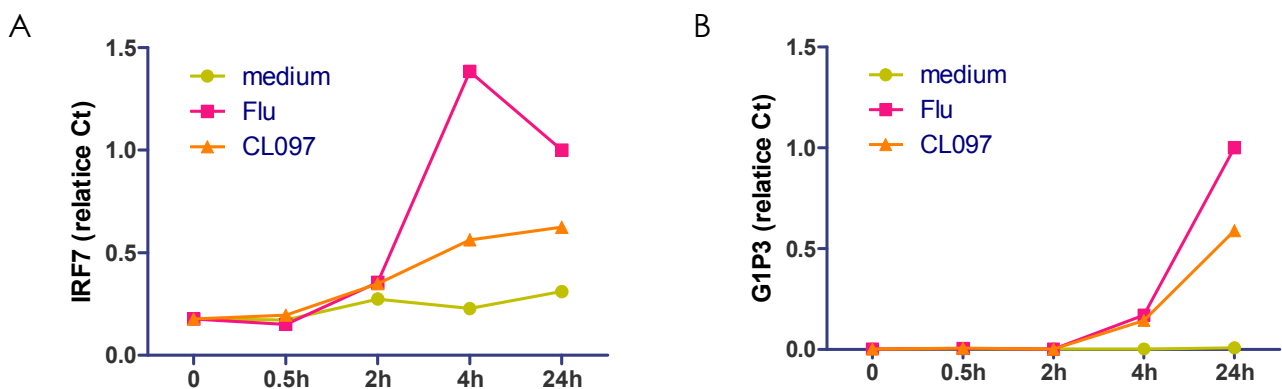


Figure R1. Les gènes induits par l'IFN sont exprimés par les cellules GEN2.2 activées par les deux types de ligands de TLR7. Les cellules GEN2.2 ont été activées ou non par Flu et le CL097 à différents temps. Les ARN ont été extraits pour la mesure de la transcription de (A) IRF7 et de (B) G1P3 par PCR quantitative.

2. Hypothèse d'une boucle autocrine intracellulaire

Il a été émis l'hypothèse que les IFN de type I produits pourraient se fixer à leur récepteur via une voie vésiculaire intracellulaire conduisant à l'expression des gènes induits par l'IFN. Cependant, ce mécanisme possible ne semble pas avoir lieu dans nos cellules et il ne pourrait pas expliquer l'expression des gènes induits par l'IFN dans le cas de la stimulation des cellules par le CL097. En effet, aucune production d'IFN de type I (Figure 2.A) ni transcription des ARNm des IFN de type I (Figure 2.B) ne sont détectées dans les cellules GEN2.2 activées par le CL097. De plus, les analyses de cytométrie en flux de l'immunomarquage intracellulaire de l'IFN- α montrent très peu de pDC IFN- α ⁺ après stimulation du TLR7 par le CL097 (Figure 2.C) alors que la majorité des

cellules expriment TRAIL. Par ailleurs, le taux de production de CXCL10 dans les surnageants est similaire à celui atteint après stimulation par Flu (Figure 3.B-D). Ces données concordent avec l'absence de production d'IFN de type I, intracellulaire ou extracellulaire, quand le CL097 est utilisé pour l'activation du TLR7. Néanmoins, un doute persiste dans le cas de la stimulation par Flu dans lequel un grand nombre de pDC sont positives pour l'IFN- α intracellulaire. Parce que la transfection des cellules GEN2.2 avec un shRNA ciblant l'ARNm de l'IFNAR2 aurait été trop longue à établir (production des particules lentivirales + définition des séquences shRNA efficaces + culture des cellules transfectées par sélection antibiotique + obtention d'un clone positif par culture en dilution limite), nous avons testé, sous demande d'un reviewer, la pré-incubation des cellules avec les anticorps neutralisants anti-IFNAR afin d'interférer avec la voie de signalisation intracellulaire possible.

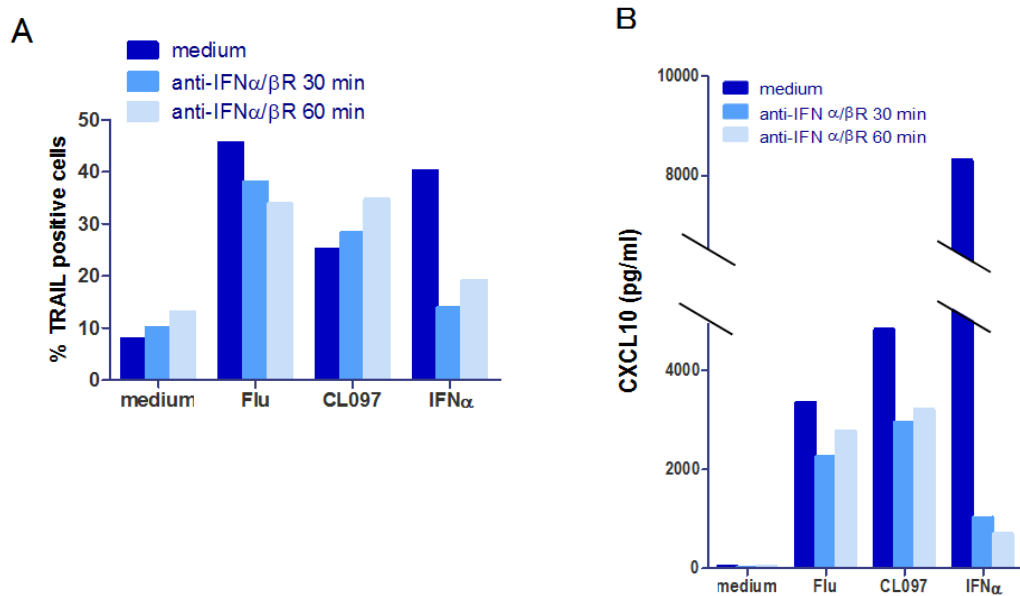


Figure R2. L'expression des gènes induits par l'IFN après stimulation du TLR7 est indépendante d'une boucle autocrine de l'IFN de type I intracellulaire. Des PBMC sont incubées en présence ou non d'anticorps neutralisants anti-IFNAR (anti-IFN α/β R) pendant 30 ou 60 min ; les cellules sont ensuite stimulées ou non par Flu et CL097 pendant 4 h. (A) l'expression de TRAIL a été évaluée par cytométrie en flux sur les pDC BDCA4+ HLA-DR+ et (B) la production de CXCL10 a été mesurée dans les surnageants de culture par CBA.

Les résultats de cette expérience démontrent clairement que la pré-incubation des cellules pendant 30 ou 60 min avec les anticorps neutralisants n'altère pas l'expression de TRAIL (Figure R2.A) des pDC issues du sang

activées par Flu ou le CL097. Des résultats similaires ont été obtenus pour la production de CXCL10 dans les surnageants (Figure R2.B). Ces anticorps sont cependant efficaces pour le blocage de l'expression des gènes induits par l'IFN après stimulation des cellules par de l'IFN- α exogène. Nous pouvons alors conclure que l'activation des pDC décrite dans ce papier n'implique pas une voie de signalisation par boucle autocrine de l'IFN de type I intracellulaire.

3. Hypothèse de l'implication des IFN de type III

Il a été supposé que les IFN de type III (IFN- λ , IL-28 et IL-29) pouvaient être à l'origine de l'expression observée des gènes induits par l'IFN. En effet, même s'ils se fixent sur des récepteurs différents (IL-28R/IL-10R), les IFN de type III entraînent l'activation de voies de signalisation similaires à celles induites par l'engagement des IFN de type I sur leur récepteur (Zhou et al. 2007). Cependant même si la stimulation Flu permet d'activer la transcription du gène codant pour l'IL-28, aucune expression de ce gène n'a pu être détectée dans les cellules activées par le CL097 (Figure R3). Par ailleurs, nous avons montré qu'aucun facteur extracellulaire n'était impliqué dans l'expression des gènes induits par l'IFN (Figure 4C). De plus, l'expression de TRAIL des cellules GEN2.2 exposées aux surnageants de cellules activées par Flu est inhibée par des anticorps neutralisants la voie de signalisation des IFN de type I, suggérant que seuls les IFN de type I sont capables d'induire une telle expression dans notre modèle (Figure 4B).

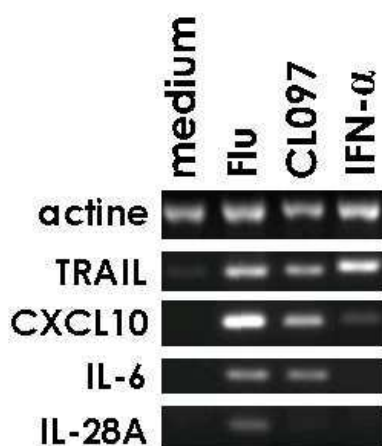


Figure R3. Transcription de l'IL-28A par les cellules GEN2.2 activées. Les cellules GEN2.2 ont été activées ou non pendant 24 h par Flu, CL097 et de l'IFN- α exogène. Les ARN ont été extraits pour une analyse par RT-PCR de la transcription des gènes ISG TRAIL et CXCL10 et des cytokines IL-6 et IL-28A.

Article 2. A novel signalling pathway leading to IFN-stimulated genes expression is induced in TLR7- and TLR9-activated plasmacytoid dendritic cells

A) Introduction

Les différents profils d'activation des pDC que nous venons d'observer après leur stimulation par des ligands de TLR7, production d'IFN de type I et différenciation, rappellent l'activation différentielle observée avec des pDC stimulées par les ligands de TLR9 CpG A et CpG B. Afin de savoir si la voie de signalisation décrite dans l'article 1 est également activée dans les pDC stimulées par des ligands de TLR9, nous nous sommes intéressés à caractériser les voies de signalisation induites par la stimulation des TLR7 et -9 des cellules GEN2.2 et des pDC issues du sang.

Comme nous l'avons vu en introduction de ce manuscrit, l'induction d'un flux calcique peut entraîner l'activation de la voie JAK-STAT. Afin de comprendre comment cette nouvelle voie de signalisation est induite en aval des TLR7 et -9, nous avons étudié l'implication de la signalisation calcique dans la phosphorylation de STAT1 et l'expression des gènes ISG.

B) Matériels et méthodes

La plupart des techniques utilisées sont les mêmes que celles décrites dans l'article 1. Les autres techniques particulières de cette étude sont les suivantes :

1. Analyse du flux calcique par cytométrie en flux

Les cellules GEN2.2 sont incubées à $1 \cdot 10^6$ cellules/ml à l'abri de la lumière pendant 30 minutes avec la sonde FLUO4-AM (FLUO4-Acetomethyl ester, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) à $0,5 \mu\text{M}$. Après cette incubation les cellules sont lavées avec du PBS puis resuspendues à $1 \cdot 10^6$ cellules/ml en milieu RPMI

chaud. Les cellules sont réparties dans des tubes de 5ml à raison de 200 µl par tube.

La détection et le suivi de la fluorescence émise par les cellules ont été effectués par cytométrie en flux avec un FACS Canto II (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Les analyses des données cytométriques ont été établies avec le logiciel FACS DIVA version 6. Les cellules sont excitées à 488 nm et l'intensité de fluorescence émise par la sonde est détectée à 520 nm (canal FITC). Dans certains cas, de la ionomycine (100µg/ml), du virus *influenza* (H3N2, Sanofi Pasteur) (1/500^{ème}), du CL097 (1 µg/ml, Invivogen), du CpG A (CpG 2336, 10 µg/ml, Coley Pharma) ou du CpG B (CpG 2006, 10 µg/ml, Coley Pharma) sont ajoutés.

2. Cultures d'activation

Pour analyser l'implication du calcium dans les voies de signalisation TLR7 et TLR9, les cellules GEN2.2 ont été activées dans différents milieux sans calcium. Les cellules récupérées en culture sont lavées dans du PBS et resuspendues à 1.10⁶ cellules/ml dans du milieu RPMI en présence ou non de 2 mM EDTA, de 6 mM EGTA ou dans du milieu HBSS.

Dans certaines conditions, des inhibiteurs de CamKII (AIP II, 500 nM) ou de Pyk2 (AG17, 500 nM) ont été ajoutés.

C) Résultats

1. Les ligands de TLR7 et TLR9 induisent des productions différentes de cytokines

Nous avons d'abord étudié le profil d'activation des pDC après stimulation des cellules par les différents ligands de TLR7 et -9. La stimulation des cellules GEN2.2 par ces agonistes induit une augmentation de l'expression de la molécule de co-stimulation CD40 de façon similaire quel que soit le ligand utilisé (Figure 1.D de l'article 1). En revanche, la production de cytokines par les cellules GEN2.2 qui débute dès 3 h après activation est différente selon le stimulus reçu (Figure R4). En effet, l'activation des cellules

par Flu ou CpG A induit principalement la production d'IFN- α (Figure R4.C et E) alors que les cellules stimulées par CL097 et CpG B produisent les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF α (Figure R4.D et F). Cependant, la production de CXCL10 qui est connue pour être induite par l'IFN de type I (Figure R4.B) est similaire dans toutes les conditions d'activation. De façon intéressante, la production de TNF α est observée dès 1 h après activation des cellules suggérant que la régulation de sa production est différente de celle des autres cytokines (Figure R4.C-F).

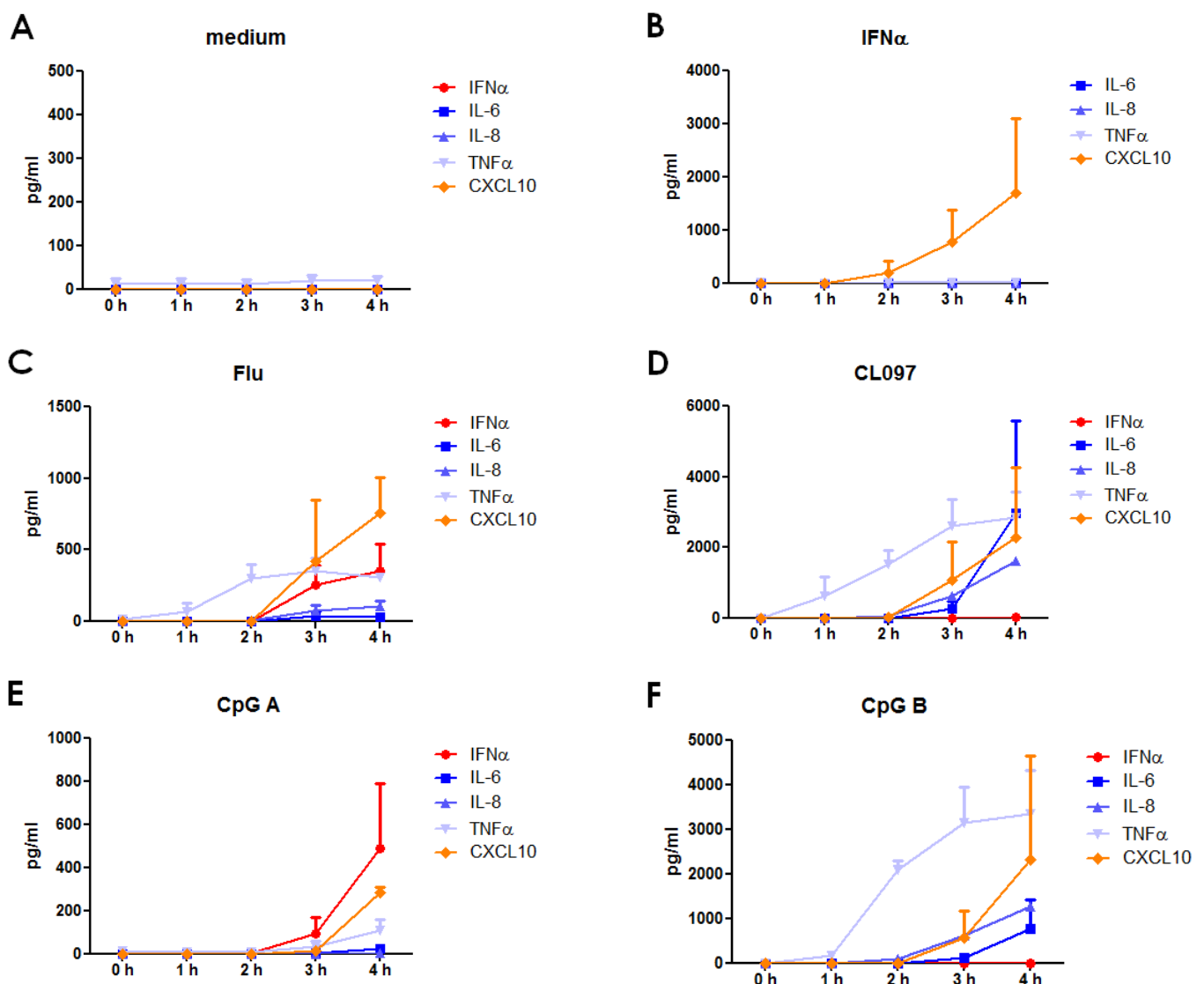


Figure R4. Cytokine and chemokine production by TLR7- and TLR9-activated GEN2.2 cells. GEN2.2 cells were cultured in (A) the absence or presence of (B) IFN- α , (C) Flu, (D) CL097, (E) CpG A, and (F) CpG B. Supernatants were collected at different time points and the productions of IFN- α , IL-6, IL-8, TNF α and CXCL10 were measured by CBA. The means and standard deviations of three independent experiments are shown.

Ces résultats ont été confirmés sur les pDC du sang par immunomarquage intracellulaire. En effet, seules les stimulations par Flu et CpG A entraînent la production d'IFN- α alors que tous les ligands de TLR7 et -9 utilisés peuvent induire la production de TNF α . (Figure R5.A) De façon surprenante, une production de CXCL10 est retrouvée dans toutes les conditions d'activation (Figure R5.B). Cependant, les pDC IFN- α ⁺ ne sont pas CXCL10⁺, ce qui amène à penser que la régulation de la production de CXCL10 ne dépend pas de la présence d'IFN de type I après activation des pDC par des ligands de TLR7 et -9.

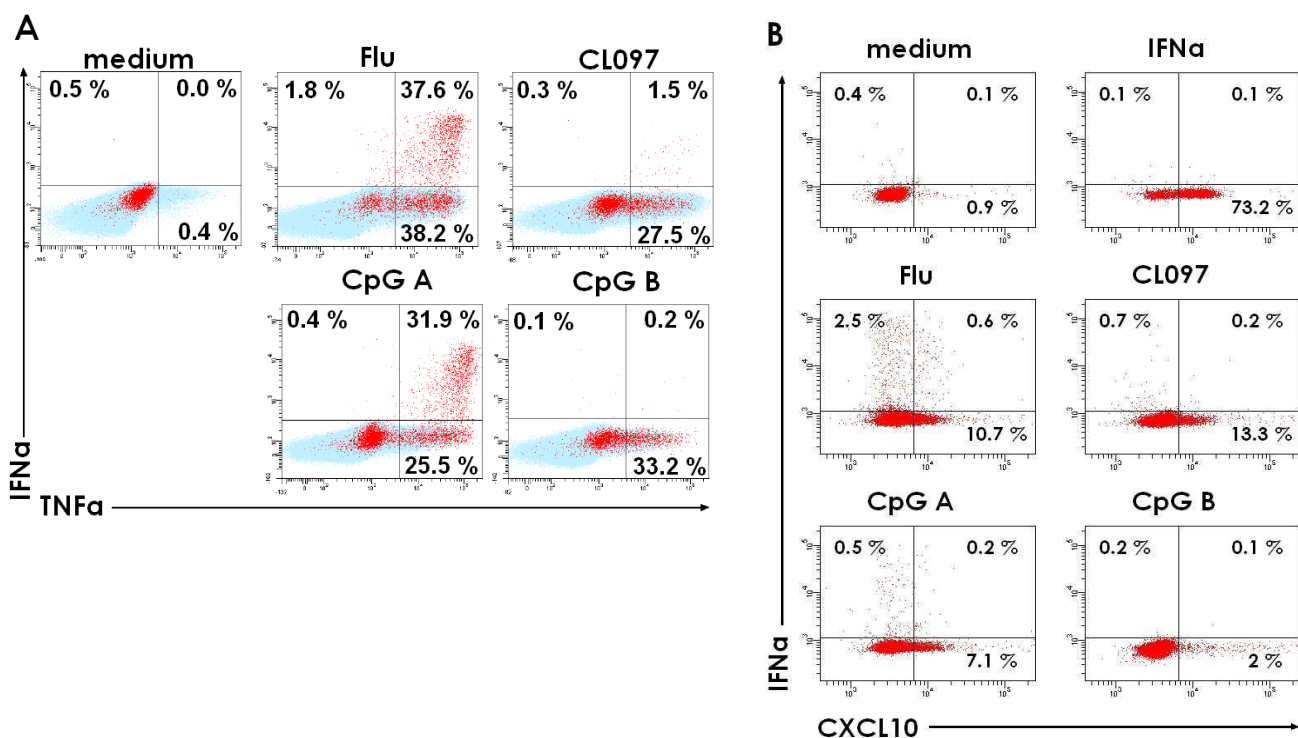


Figure R5. IFN- α , TNF α and CXCL10 production by TLR7- and TLR9-activated blood pDCs. PBMCs from healthy donors were stimulated or not with two TLR7 ligands (Flu and CL097), two TLR9 ligands (CpG A and CpG B) and exogenous IFN- α for 3 hours. Secretion was blocked with brefeldin A (A) or monensin (B) for a further 4 hours. Intracellular IFN- α , (A) TNF α and (B) CXCL10 production was analyzed by flow cytometry on BDCA4⁺ HLA-DR⁺ pDCs (red cells). Dot plots show the percentages of positive cells among pDCs. Representative results of three different donors are shown.

2. La stimulation du TLR7 et du TLR9 des pDC induit l'expression de gènes induits par l'IFN

Comme dans l'article 1, nous avons analysé l'expression des gènes induits par l'IFN (ISG) après activation des cellules GEN2.2 par les agonistes de

TLR7 et -9. Alors que la transcription des gènes codant pour les IFN de type I : IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- β 1 et IFN- ω 1 et ceux de type III : IFN λ 1 et IFN λ 2 n'est observée qu'après stimulation par Flu et CpG A (Figure R6.A), la transcription des ISG TRAIL, CXCL10, MxA, G1P3, IRF5 et IRF9 est augmentée dans toutes les conditions d'activation (Figure R6.B-D). Ces résultats démontrent que l'expression des ISG par les pDC activées par des agonistes de TLR7 et -9 peut avoir lieu en absence de production d'IFN de type I ou III.

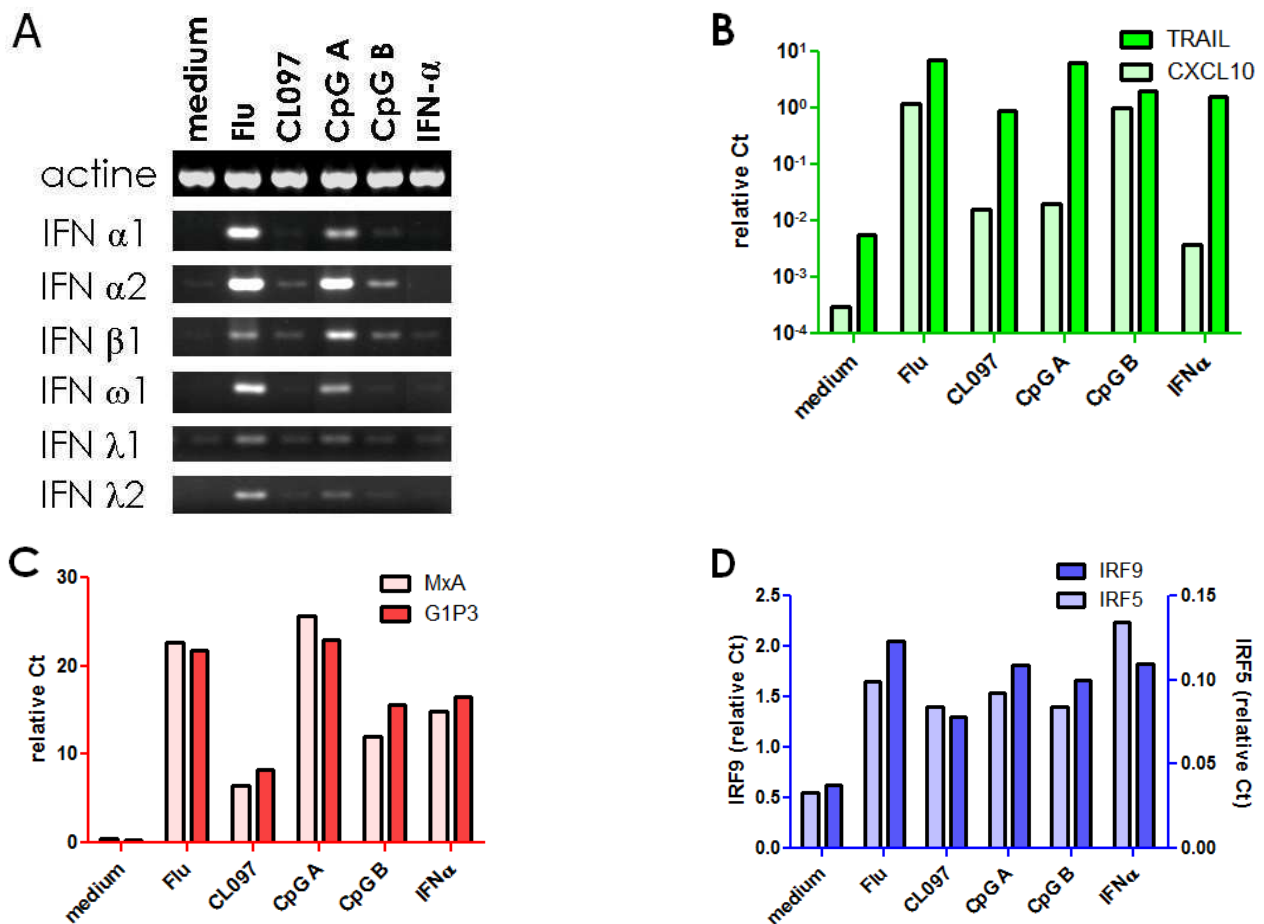


Figure R6. IFN- α and ISGs expression by TLR7- and TLR9-activated GEN2.2 cells. GEN2.2 cells were cultured in the absence or presence of Flu, CL097, CpG A, CpG B and IFN- α for 4 hours. RNAs were extracted for RT-PCR analysis of the expression of (A) *ifna1*, *ifna2*, *ifn β 1*, *ifn ω 1*, *ifn λ 1* and *ifn λ 2*, (B) *trail* and *cxcl10*, (C) *mx*a and *g1p3* and (D) *irf5* and *irf9*.

3. L'expression des ISG par les pDC activées par des ligands de TLR7 et TLR9 est indépendante de l'IFN de type I et de facteurs extracellulaires

Afin de vérifier que l'expression des ISG n'implique pas l'activité d'une autre cytokine que les IFN de type I, les cellules GEN2.2 ont été cultivées en présence des cytokines pro-inflammatoires recombinantes IL-6, IL-8 et TNF α et en présence d'IFN- α . Comme il était attendu, seul l'IFN- α est capable d'induire l'expression de TRAIL sur les cellules GEN2.2 dès 2 h après stimulation par la protéine recombinante (Figure R7.A).

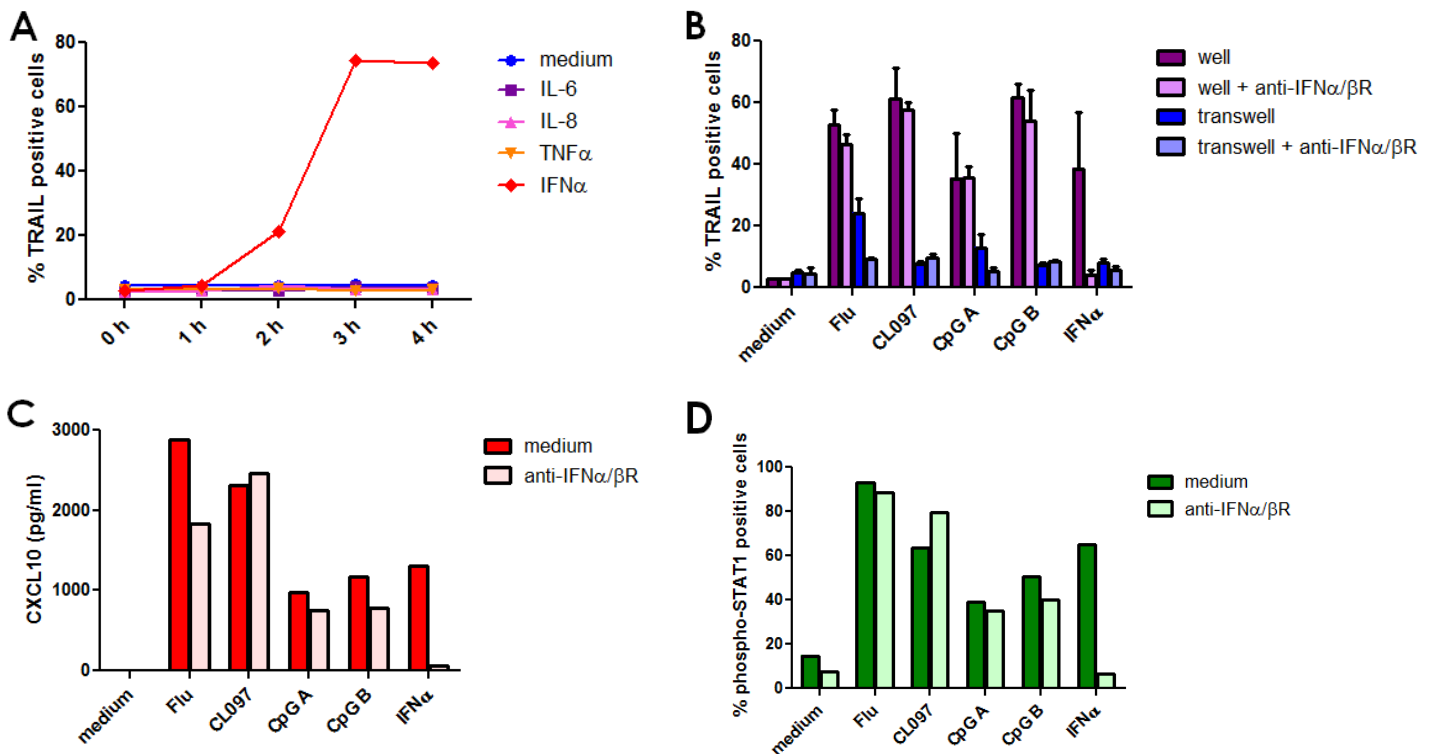


Figure R7. The expression of TRAIL and CXCL10 and the phosphorylation of STAT1 in TLR7- and TLR9-activated GEN2.2 cells are independent of type I IFN. (A) GEN2.2 cells were cultured in the absence or presence of IL-6, IL-8, TNF α or IFN- α . TRAIL expression was evaluated by flow cytometry at different time points. (B) GEN2.2 cells were untreated or stimulated for 2 hours in the absence or presence of anti-IFN- α / β and anti-IFN- α / β R neutralizing antibodies. After washing, cells were placed in 24-well plates; untreated cells were added in transwells, in the absence or presence of neutralizing antibodies. After 4 hours of culture, TRAIL expression was evaluated by flow cytometry on cells in wells and transwells. The mean and SDs of three independent experiments are shown. (C) GEN2.2 cells were untreated or stimulated by TLR7- and TLR9 ligands for 4 hours in the absence or presence of anti-IFN- α / β and anti-IFN- α / β R neutralizing antibodies. CXCL10 production was measured in the supernatants by CBA. (D) The phosphorylation of STAT1 (pY701) was analyzed after 2 hours of activation by flow cytometry.

L'absence d'implication de facteurs solubles a été confirmée par un test transwell dans lequel des cellules GEN2.2 non stimulées sont exposées aux surnageants de cellules activées par les différents agonistes. Ainsi nous observons que la stimulation des cellules par CL097 et CpG B induit l'augmentation de l'expression de TRAIL mais que les cellules exposées à leurs surnageants (en transwell) n'expriment pas cette protéine (Figure R7.B). Par ailleurs, la faible expression de TRAIL des cellules exposées aux surnageants de cellules activées par Flu et CpG A est due à la production d'IFN- α dans ces conditions puisque la présence d'anticorps neutralisant dirigés contre les IFN α/β et l'IFNAR inhibe cette expression (Figure R7.B). De façon intéressante, nous pouvons également observer que la présence des anticorps bloquant l'engagement du récepteur à l'IFN de type I n'altère pas l'expression de TRAIL ni la production de CXCL10 par les cellules stimulées par les agonistes de TLR7 et -9 (Figure R7.B-C). Les anticorps utilisés sont néanmoins efficaces au vu de leur capacité à inhiber l'expression de ces protéines induite par de l'IFN- α exogène.

Toutes ces données démontrent qu'aucun facteur extracellulaire n'est impliqué dans l'expression de TRAIL après stimulation des cellules par des ligands de TLR7 et -9. Cependant, comme il a été démontré dans l'article 1, l'expression de ces ISG semble être associée au facteur de transcription STAT1 qui est phosphorylé après activation des cellules par les différents agonistes (Figure R7.D). Cette phosphorylation a lieu de façon indépendante de l'IFN de type I puisque la présence des anticorps neutralisant n'altère pas l'activation de STAT1.

4. La phosphorylation de STAT1 et l'expression des gènes ISG chez les pDC activées par des ligands de TLR7 et -9 dépendent de tyrosine kinases de type Pyk2 et JAK1

L'expression des ISG par les pDC activées par des ligands de TLR7 et -9 est contrôlée par le facteur STAT1. Ce facteur est phosphorylé après

stimulation par les différents agonistes de façon indépendante de l'IFN de type I. Nous avons montré dans l'article 1 que la phosphorylation de STAT1 et l'expression des gènes ISG après stimulation du TLR7 sont dépendantes de la p38MAPK. Cette sérine kinase ne peut cependant pas être directement responsable de la phosphorylation du résidu tyrosine de STAT1 que nous détectons. Nous avons alors voulu analyser l'implication de tyrosines kinases connues de STAT1 comme JAK1 et JAK2 dans cette phosphorylation. Nous avons ainsi pu observer que la présence de pyridone, un inhibiteur de JAK1, diminue fortement la phosphorylation de STAT1 induite par les différents agonistes (Figure R8). En revanche, la présence de AG490, un inhibiteur de JAK2, n'a aucun effet sur la phosphorylation observée dans les différentes conditions de stimulation. JAK1 est une kinase associée à des récepteurs à cytokines dont l'activation dépend de l'engagement du récepteur par son ligand. Nous avons cependant démontré qu'aucun facteur extracellulaire n'était impliqué dans la phosphorylation de STAT1 en aval des TLR7 et -9. Nous avons alors testé l'implication de la kinase Pyk2, une kinase capable de phosphoryler JAK1, dans l'activation de STAT1. Nous avons observé que la phosphorylation de STAT1 induite par les différents agonistes de TLR7 et -9 est altérée en présence d'AG17, une molécule chimique capable d'inhiber les kinases de la famille Pyk2 (Figure R8). L'AG17 inhibe également en partie la phosphorylation de STAT1 induite par de l'IFN- α exogène, ce qui n'était pas attendu et qui montre la faible spécificité de l'inhibiteur. Toutes ces données suggèrent que l'activation du facteur STAT1 en aval de la stimulation TLR7 et -9 dépend de l'activité de kinases de type Pyk2 et JAK1.

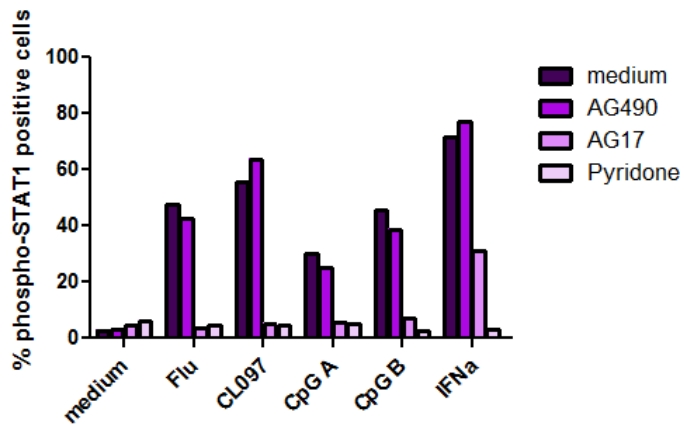


Figure R8. STAT1 phosphorylation in TLR7- and TLR9-activated GEN2.2 cells is dependent on Pyk2- and JAK1-like tyrosine kinases. GEN2.2 cells were untreated or stimulated with the TLR7 and TLR9 ligands and with exogenous IFN- α for 2 hours in the absence or presence of the JAK2 inhibitor (AG490), the Pyk2 inhibitor (AG17) and the JAK1 inhibitor (Pyridone). Phospho-STAT1(pY701) was analyzed by flow cytometry.

5. La phosphorylation de STAT1 après activation par des ligands de TLR7 et TLR9 est indépendante de la signalisation calcique

L'activation de STAT1 en absence d'engagement d'un récepteur à cytokine semble dépendre de l'activité de JAK1 et peut-être celle de Pyk2, une kinase dépendante de la signalisation calcique. Nous avons donc voulu savoir si les agonistes utilisés pouvaient induire une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Pour cela nous avons utilisé la sonde Fluo-4 dont la fluorescence augmente avec la concentration en calcium afin de pouvoir analyser le flux calcique des cellules GEN2.2 stimulées par les différents ligands de TLR7 et -9 par cytométrie en flux. Ainsi nous observons que contrairement à la ionomycine, un ionophore puissant, qui induit une augmentation rapide de la fluorescence des cellules et donc un flux calcique tonique, les différents agonistes utilisés n'induisent aucune modification de la fluorescence (Figure R9.A).

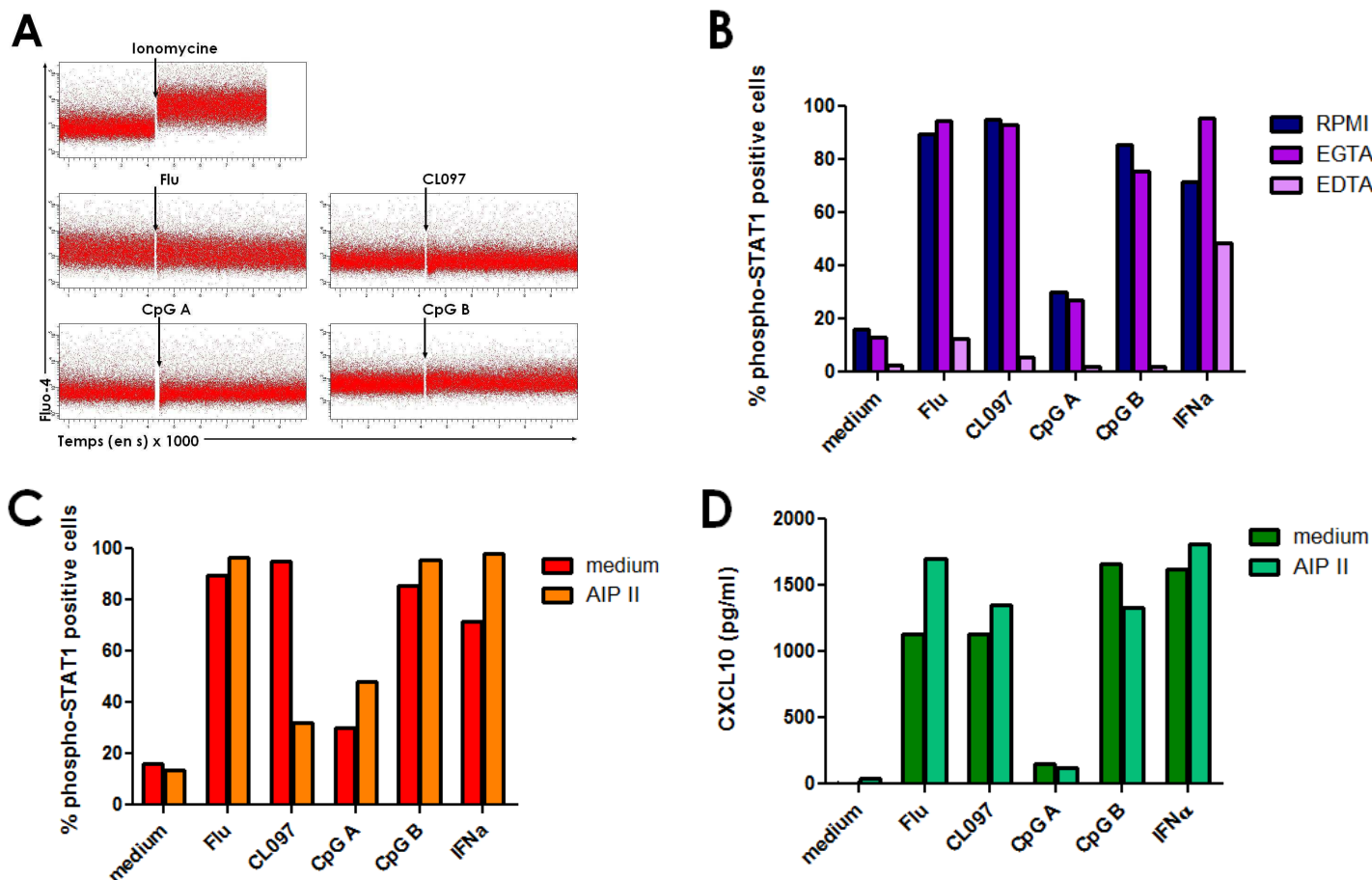


Figure R9. The phosphorylation of STAT1 following TLR7- and TLR9 activation in GEN2.2 cells is independent of calcium signaling. (A) GEN2.2 cells were loaded with Fluo-4 probes and the intracellular calcium concentration change was analyzed by flow cytometry. TLR7 and TLR9 ligands or ionomycin were added at the time indicated by arrows. (B) Phospho-STAT1 (pY701) was evaluated in GEN2.2 cells stimulated or not for 2 hours with the TLR7 and TLR9 ligands and with exogenous IFN- α in RPMI medium containing or not the calcium chelator EGTA, the cation chelator EDTA or in HBSS medium. (C) GEN2.2 cells were untreated or stimulated with the TLR7 and TLR9 ligands and with exogenous IFN- α for 2 hours or 4 hours in the absence or presence of the CamKII inhibitor AIP II. Phospho-STAT1 (pY701) was analyzed by flow cytometry and (D) CXCL10 production was measured in the supernatants by CBA.

Ceci suggère que les ligands de TLR7 et -9 n'entraînent pas de flux calcique dans les cellules GEN2.2. Etant donné qu'un flux calcique transitoire pourrait ne pas être détecté par cette méthode d'analyse et afin de vérifier par une autre méthode si le calcium extracellulaire est impliqué dans la signalisation des TLR7 et -9, nous avons analysé la phosphorylation de STAT1 dans les cellules GEN2.2 stimulées par les différents agonistes dans des milieux ne contenant pas de calcium. Nous observons que la séquestration des cations divalents par l'EDTA inhibe cette phosphorylation. En revanche, la séquestration des ions Ca^{2+} par le chélateur EGTA n'altère en rien la

phosphorylation de STAT1 induite par la stimulation TLR des cellules (Figure R9.B). De plus, nous pouvons observer que l'absence de ces cations n'altère guère la phosphorylation de STAT1 induite par de l'IFN- α exogène (Figure R9.B). Afin d'analyser l'implication éventuelle d'un flux calcique transitoire d'origine intracellulaire, nous avons étudié l'activation de STAT1 après stimulation des cellules GEN2.2 en présence ou non d'AIP II, (autocamide-2 related inhibitory peptide II) un inhibiteur de la kinase dépendante du calcium CamKII. Nous montrons alors que la phosphorylation de STAT1 induite par l'engagement des TLR7 et -9 n'est pas inhibée par AIP II (Figure R9.C). Ces résultats sont similaires à ceux observés pour les productions de CXCL10 induites par la stimulation des TLR des cellules GEN2.2 (Figure R9.D). De plus, la présence de cet inhibiteur n'altère pas la phosphorylation de STAT1 et la production de CXCL10 induites par de l'IFN- α exogène (Figure R9.D).

Ces résultats suggèrent donc que la signalisation calcique ne joue pas de rôle dans la phosphorylation de STAT1 après activation des cellules par des ligands de TLR7 et -9. L'activation de ces TLR implique néanmoins d'autres cations que Ca^{2+} . Enfin, la voie de phosphorylation de STAT1 utilisée après stimulation des TLR7 et -9 chez les cellules GEN2.2 semble être différente de celle engagée par l'IFNAR.

D) Discussion et perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence que la voie de signalisation induite par stimulation du TLR7 chez les pDC conduisant à l'expression de gènes ISG en absence d'IFN de type I décrite dans l'article 1 est également activée après engagement du TLR9. L'expression de ces gènes est contrôlée par le facteur STAT1 qui est phosphorylé dès 2 h après stimulation des cellules par les différents agonistes de TLR7 et -9. STAT1 est connu pour être activé en aval de l'engagement de récepteurs à cytokines comme l'IFNAR. Cependant, nous montrons que ni les IFN de type I ni aucun autre facteur extracellulaire n'est impliqué dans sa phosphorylation. Une voie alterne pouvant conduire à l'activation de STAT1 fait intervenir des kinases activées

par le flux calcique comme CamKII (Wang et al. 2008). Néanmoins, aucun flux calcique n'a pu être observé dans les cellules GEN2.2 stimulées par les différents agonistes. Une signalisation calcique pourrait tout de même avoir lieu par libération du calcium stocké dans les compartiments intracellulaires. Cependant, même si l'inhibition de cette source de calcium n'a pas été testée, nous avons observé que la CamKII, une kinase dépendante du calcium, n'est pas impliquée dans l'activation de STAT1.

Par ailleurs, la phosphorylation de STAT1 induite par l'engagement des TLR7 et -9 est altérée par les inhibiteurs AG17 et pyridone mettant en avant la participation de tyrosine kinases de type Pyk2 et JAK1 respectivement. Cependant, ces inhibiteurs chimiques ne sont pas strictement spécifiques et il est donc difficile de déterminer la nature exacte de la kinase responsable de cette phosphorylation.

Afin de définir les candidats possibles jouant dans cette nouvelle voie de signalisation, deux stratégies complémentaires ont été mises en place :

- Une analyse des protéines phosphorylées après stimulation du TLR7 par spectrométrie de masse appelée phosphoprotéome. Cette stratégie repose sur l'analyse différentielle de la fréquence de peptides phosphorylés entre des échantillons activés et non-activés. La distinction des échantillons étant possible par la mise en culture des cellules en milieu léger ou lourd. Cette approche sera décrite dans l'annexe 1.
- Une analyse des protéines associées au facteur STAT1 phosphorylé par spectrométrie de masse. Après une immunoprécipitation de STAT1 phosphorylé dans des échantillons activés par un ligand de TLR7 pendant différents temps, les protéines qui interagissent avec ce facteur sont analysées par spectrométrie de masse. Cette stratégie devrait permettre notamment de révéler quelle est la kinase qui phosphoryle directement STAT1. Cette stratégie expérimentale est en cours et ne sera pas présentée.

Article 3. Caractérisation des cellules dendritiques circulantes chez les patients porteurs de mélanome, rôle de CCR6 dans le recrutement des pDC à la tumeur

A) Introduction et objectifs

Le mélanome est un cancer dont l'incidence augmente régulièrement et dont le stade métastatique est de mauvais pronostic. Si l'exérèse chirurgicale est communément effectuée sur des tumeurs localisées, aucun traitement n'a prouvé son efficacité en contexte métastatiques. C'est pourquoi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques du mélanome est toujours en cours d'investigation. De par leur rôle clé dans l'initiation des réponses immunes, les DC constituent une cible thérapeutique potentielle. De plus, les pDC activées sont la principale source de production d'IFN- α et pourraient avoir une activité anti-tumorale. Cependant, leurs fonctions peuvent être altérées durant le développement tumoral. L'état fonctionnel des DC chez les patients porteurs de mélanome est encore mal défini.

Nous nous sommes donc intéressés à caractériser la fréquence, le phénotype et la fonctionnalité des DC circulantes chez des patients atteints de mélanome nouvellement diagnostiqués.

B) Matériels et méthodes

La caractérisation phénotypique des mDC et pDC circulantes a été établie à partir de prélèvements de sang total frais de patients porteurs de mélanome nouvellement diagnostiqués. Les analyses ont reposé sur l'évaluation par cytométrie en flux de l'expression de marqueurs de maturation et de récepteurs à chimiokines par un immunomarquage 4 couleurs.

La caractérisation fonctionnelle des DC a été évaluée en analysant l'augmentation de l'expression de molécules d'activation après culture de sang total en présence d'un ligand de TLR7 et TLR8 par cytométrie en flux et leur capacité de migration vers différentes chimiokines dans un test transwell.

Une analyse de la présence et du phénotype des pDC au sein des tumeurs de mélanome a été établie par immunohistochimie sur coupes tumorales.

C) Résultats

Nous montrons que les fréquences de mDC et pDC circulantes sont comparables entre les patients atteints de mélanome et des sujets sains. De plus, le phénotype des mDC et pDC circulantes est similaire pour les patients porteurs d'un mélanome et les sujets contrôles. Les deux sous-populations de DC ont été retrouvées dans un état au repos mais capables de s'activer ex vivo en présence de R848, un ligand de TLR7 et de TLR8, dans les deux groupes d'études.

De façon intéressante, nous montrons aussi que les pDC de patients atteints de mélanome expriment plus fortement le récepteur à chimiokine CCR6 que les pDC de donneurs sains. De plus, il a été retrouvé des pDC exprimant ce récepteur au niveau de la tumeur où il a été détecté une production de MIP3- α . Ceci suggère que CCR6 pourrait participer au recrutement des pDC dans le mélanome.

D) Conclusion et perspectives

Ce travail démontre que les mDC et pDC de patients porteurs de mélanome sont fonctionnelles au moment du diagnostic et que les pDC sont infiltrées au niveau de la tumeur primitive. L'axe CCR6/MIP3- α est constitutivement utilisé par les mDC pour gagner la peau et a également été décrit pour les LpDC qui s'accumulent de façon pathologique dans des lésions cutanées (Bendriss-Vermare et al. 2004b). Ici, nous montrons que ce mode de migration participe au recrutement des pDC depuis le sang vers le site tumoral chez les patients porteurs de mélanome. Cependant, le taux de

migration de ces cellules vers la chimiokine MIP3- α est faible et semble concorder avec leur faible niveau d'expression du récepteur CCR6. Il a été montré que le récepteur CXCR3 n'est actif qu'après engagement du récepteur CXCR4 avec son ligand CXCL12 (Vanbervliet et al. 2003). Nous n'avons cependant pas réussi à mettre en évidence une telle synergie avec d'autres chimiokines pour le récepteur CCR6 dans notre modèle (données non montrées). Ces expérimentations ont été effectuées avec des pDC de donneurs sains qui ont été induites pour l'expression de CCR6 par de l'IL-3. Ceci soulève la question de l'induction de l'expression de ce récepteur dans les pDC de patients porteurs de mélanome. L'implication de l'IL-3 dans ce processus n'a pas été testée par notre laboratoire mais a été démontrée par une autre équipe dont les données seront prochainement publiées (Bendriss-Vermare et al.).

Les pDC une fois recrutées sur le site tumoral par MIP3- α devraient diminuer l'expression du récepteur CCR6. Ceci pourrait alors expliquer la difficulté que nous avons eue à observer des pDC CCR6⁺ *in situ*. Il reste désormais à déterminer le rôle du recrutement de ces cellules dans la tumeur. Soit un rôle local par la production d'IFN de type I soit la mise en place d'une immunité adaptative après migration des pDC vers les ganglions lymphatiques et activation des lymphocytes T spécifiques par présentation d'antigènes capturés sur le site tumoral.

Enfin, les pDC circulantes de patients porteurs de mélanome ont montré leur capacité à s'activer en réponse à un ligand de TLR7. Ces cellules seraient alors mobilisables dans le cadre de traitements immunothérapeutiques reposant sur l'induction de réponses immunes anti-tumorales à partir d'agonistes de TLR.

Title:

Characterization of circulating dendritic cells in melanoma, role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor†

Authors:

Julie Charles^{1,2,3} *, **Jérémy Di Domizio**^{1,2} *, Dimitri Salameire^{1,4}, Nathalie Bendriss-Vermare⁵, Caroline Aspod^{1,2}, Ramzan Muhammad⁶, Christine Lefebvre⁷, Joël Plumas^{1,2}, Marie-Thérèse Leccia^{1,3} and Laurence Chaperot^{1,2}.

From :

1- Inserm, U823, Centre de Recherche Albert Bonniot, Immunobiologie et Immunothérapie des Cancers, La Tronche, F-38706 France ; Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38041 France

2- EFS Rhône-Alpes, Laboratoire R&D, La Tronche, F-38701 France ;

3- CHU Grenoble, Hôpital Michallon, Dermatologie, Pôle Pluridisciplinaire de Médecine, Grenoble, F-38043 France

4- CHU Grenoble, Hôpital Michallon, Pôle de Biologie, Département d'Anatomocytopathologie, Grenoble, F-38043 France

5- Inserm U590, Centre Léon Bérard, Equipe Cytokines et Cancers , Université Lyon 1, ISPB, IFR62, Lyon, F-69373, France

6- Inserm, U823, Centre de Recherche Albert Bonniot, Immunologie Analytique des Pathologies Chroniques, La Tronche, F- France ; Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38041 France ;

7- Inserm, U823, Centre de Recherche Albert Bonniot, Voies oncogéniques des hémopathies malignes, La Tronche, F- France ; Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38041 France ;

† This work was supported in part by the grant Cancéropole National 2004-5 from the Institut National du Cancer and other from the Société Française de Dermatologie. Julie Charles was a recipient of the grants from the Académie Nationale de Médecine and Canceropole National 2004-5 (Institut National du Cancer). Jérémy Di Domizio was granted by the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie.

*These two authors contributed equally to this work

Corresponding Author

Laurence Chaperot

R&D Laboratory, EFS Rhône-Alpes

29 Av Maquis du Gresivaudan, BP 35

38701 La Tronche FRANCE

Tel : +33 (0) 4 76 42 94 16

e-mail : laurence.chaperot@efs.sante.fr

Short Title : Circulating DC in melanoma

Abbreviations :

DC: dendritic cell

MDC : myeloid dendritic cell

PDC : plasmacytoid dendritic cell

Type I IFN : Type I interferon

IFN-alpha : Interferon alpha

TLR : Toll-like receptor

PBMC : peripheral blood mononuclear cells

Abstract

Dendritic cells (DC) are central cells in the development of antitumor immune responses, but the number and function of these cells can be altered in various cancers. Whether these cells are affected during the development of melanoma is not known.

We investigated the presence, phenotype, and functionality of circulating myeloid DC (MDC) and plasmacytoid DC (PDC) in newly diagnosed melanoma patients, compared to controls.

The frequencies of PDC and MDC were equivalent in melanoma patients as compared with normal subjects. Both circulating DC subsets were immature, but upon *ex vivo* stimulation with R848 they efficiently up-regulated their expression of costimulatory molecules. We found that circulating DC from melanoma patients and controls displayed similar pattern of expression of the chemokine receptors CXCR3, CXCR4, CCR7, and CCR10. Strikingly, PDC from melanoma patients expressed higher levels of CCR6 than control PDC, and were able to migrate towards CCL20. Further data showed that CCR6-expressing PDC were present in melanoma primary lesions, and that CCL20 was produced in melanoma tumors.

These results suggest that PDC and MDC are fully functional in melanoma patients at the time of diagnosis, and that CCL20 may participate to their recruitment from the blood to the tumor.

Introduction

During the past decades, there has been a huge increase in the incidence of cutaneous malignant melanoma among all the caucasian populations as well as in the number of death due to this cancer throughout the world. Overall 5-year survival is superior to 95% for the patients with localized tumors of less than 0.75 mm in depth while it drops below 40% for localized melanomas with Breslow index superior to 4 mm. Such a poor outcome highlights the need to further develop new therapeutic strategies, among which immunotherapy is a promising one.

Melanoma cells are sensitive to lysis by cytotoxic T lymphocytes (CTL) because they express immunogenic tumor-associated antigens (TAA) such as Melan A, gp100, tyrosinase and Mage3 (Boon et al. 2006) and this property provides basis for vaccine development. Besides vaccination with TAA (with or without dendritic cells) (Rosenberg et al. 2004) and innovative treatments based on adoptive transfer of antitumor CTL (Rosenberg and Dudley 2004), the most common immunotherapy used in melanoma is the injection of Interferon (IFN) alpha. Therapeutic efficiency of IFN-alpha relies both on its direct antitumor effect and its ability to enhance the immune responses. IFN-alpha can be proposed as an adjuvant for the treatment of malignant melanoma but its use remains controversial. However, the latest study by the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) shows that the adjuvant therapy with pegylated IFN-alpha-2b has a beneficial effect on recurrence free-survival in melanoma patients especially in patients at stage IIIa (Eggermont et al. 2008). Another way to take advantage of Type I IFNs antitumor effects could be to induce their endogenous production by plasmacytoid dendritic cells (PDC) that represent a major source of IFN-alpha *in vivo*. Indeed, these cells secrete huge amounts of IFN-alpha upon recognition of ssRNA and ssDNA viruses by Toll-like receptor (TLR)7 and TLR9 respectively (Cella et al. 1999b; Siegal et al. 1999b). PDC are usually detected in the peripheral blood (O'Doherty et al. 1994) and lymphoid organs, (Cella et

al. 1999b) in the normal humans while in pathological situations such as lupus or psoriasis they have been found in the inflamed skin producing type I IFNs (Farkas et al. 2001; Nestle et al. 2005). Besides producing IFN- α , activated PDC also express costimulatory molecules and secrete other cytokines and chemokines, such as CXCL10, thus participating in the recruitment of effector cells of the innate and adaptive immunity (Colonna et al. 2004; Bendriss-Vermare et al. 2005). Moreover, PDC like MDC are able to prime Th1, Th2, and regulatory T cells (Kadowaki et al. 2000; Moseman et al. 2004) and can also efficiently stimulate CD8⁺ T lymphocytes upon appropriate activation (Fonteneau et al. 2003a).

In the context of cancer immunotherapy, these properties suggest that it could be relevant to target PDC in order to induce an endogenous secretion of Type-I IFNs as well as an activation of innate and adaptive immunity. Among the new adjuvants developed for cancer treatment, CpG ODN and imiquimod are known to activate PDC via TLR9 and TLR7 respectively, demonstrating antitumor effects in clinical trials (Krieg 2008; Schon and Schon 2008). Moreover, we and others have demonstrated that activated PDC can acquire cytotoxic functions by expressing the death-inducing ligand TRAIL on their surface (Chaperot, I et al. 2006; Stry et al. 2007). This killer activity may participate in the antitumor effect of therapeutic TLR7 or TLR9 agonists. Indeed, the few studies analyzing the immunological effects of these therapies have shown PDC activation (Pashenkov et al. 2006; Molenkamp et al. 2007; Molenkamp et al. 2008), local secretion of IFN- α (Urosevic et al. 2005) and TRAIL expression at the treated site (Stry et al. 2007). The most impressive clinical results have been obtained in the superficial basal cell carcinoma with complete histological clearance of the treated tumors in almost 80 % of the cases after topical treatment with imiquimod (Geisse et al. 2004). In the pilot studies performed in melanoma, such treatment has resulted only in limited regression or stabilization of lentigo malignant melanoma (Naylor et al. 2003) or cutaneous melanoma metastasis (Wolf et al. 2003; Zeitouni et al. 2005). However, in order to improve the efficiency of these new TLR agonists-based treatments in melanoma, it is necessary to improve

the knowledge of DC functionality and ability to respond to TLR ligands in this cancer.

The purpose of this study is to characterize circulating MDC and PDC in melanoma patients and to evaluate whether they are altered or not either quantitatively or qualitatively. We demonstrate the ability of MDC and PDC isolated from melanoma patient's blood to mature upon TLR7/8 triggering in vitro. We also describe the expression of chemokine receptors by circulating DC, showing that CCR6 expressed at higher level on PDC from melanoma patients at the time of diagnosis compared to healthy individuals could participate to their migration to the tumor site where CCL20 was produced.

Results

The frequency of circulating PDC and MDC is intact in melanoma patients

Circulating MDC or PDC numbers are modified in various kinds of pathologies. We first asked whether it could be the case in melanoma at the time of diagnosis. We analyzed the frequency of the two main subsets of blood DC in 22 healthy donors and 43 melanoma patients. A multicolour staining of MDC and PDC by flow cytometry allows the identification and counting of both DC subsets among the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (Fig.1A). After gating to exclude debris and most polynuclear cells (Fig 1A, left dot plot), a selection of lineage (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 and CD56) negative (lin^{neg}) cells was performed (Fig 1A, middle dot plot). Among these lin^{neg} cells, PDC and MDC were identified as $BDCA4^+CD11c^-$ and $BDCA4^+CD11c^+$ cells respectively (Fig 1A, right dot plot) and their respective percentages in PBMC were determined. We checked that both subsets of DC expressed high levels of HLA-DR molecules and PDC were $BDCA2^+$ and $CD123^{hi}$ whereas MDC were $BDCA2^-$ and $CD123^{low}$ (Fig 1B). As shown in figure 1C, the mean percentage of circulating MDC and PDC in the control individuals was $0.49\pm 0.18\%$, and $0.30\pm 0.17\%$ respectively. Among PBMC from melanoma patients, MDC represent $0.50\pm 0.23\%$ and PDC $0.29\pm 0.20\%$. Altogether, these data show that the frequencies of circulating DC subsets are equivalent in healthy controls and melanoma patients.

Blood PDC and MDC display an immature phenotype in melanoma patients

In order to determine whether the quality of DC could be altered in the context of melanoma, a detailed phenotypic analysis of circulating MDC and PDC was then performed in the melanoma patients and healthy controls. A typical expression of costimulatory molecules by MDC and PDC is shown in the figure 2A (for a control healthy volunteer). Both subsets of DC expressed neither CD80 nor CD83 whereas they both expressed CD40 and CD86 (Fig 2B). MDC expressed higher levels of CD40 and CD86 (MFI= 34 ± 13 and 37 ± 10 ,

respectively) than PDC (MFI = 27 ± 13 and 10 ± 3), and both subsets expressed high levels of CD62L (data not shown). There were no obvious differences in costimulatory molecules expression by circulating DC between healthy controls and melanoma patients at the time of diagnosis. As in healthy subjects, both PDC and MDC displayed an immature phenotype in the blood from melanoma patients.

The maturation potential of circulating DC is maintained in melanoma patients

In order to determine whether the ability of immature DC to mature in melanoma patients remains intact, original cell culture experiments were performed by adding R848 in the whole blood samples to activate both PDC and MDC via TLR7 and TLR8, respectively. After 24-hour incubation, we evaluated the up-regulation of molecules associated with DC maturation on both MDC and PDC by multicolor flow cytometry. As illustrated in figure 3, both MDC and PDC highly up-regulated their expression of CD40, CD80, CD83, CD86, and CCR7 after activation with R848. Moreover, table 1 shows that MDC and PDC from melanoma patients and healthy controls matured to the same extent upon activation by TLR-7/8 ligand, indicating that circulating DC retain their ability to mature in melanoma.

Blood PDC from melanoma patients express CCR6, a skin homing receptor and migrate towards CCL20

To further characterize DC in the context of melanoma and try to understand their recruitment in the tumor site, we analyzed their chemokine receptors expression profile. As illustrated in figure 4A (for a healthy donor), both MDC and PDC expressed high levels of CXCR4 and intermediate levels of CCR10. As already described, PDC expressed high levels of CCR7 and CXCR3 whereas MDC were CCR7^{low} and CXCR3^{low}. As shown in figure 4B, there were no differences between circulating MDC and PDC regarding CXCR3, CXCR4, CCR7, and CCR10 expression between the healthy controls and melanoma patients.

Strikingly, while analyzing CCR6 expression, we found that circulating PDC from some melanoma patients expressed higher levels of CCR6 as compared to PDC from healthy donors (Fig 5A). To go further, we increased the number of melanoma patients in our study for CCR6 expression by PDC in the two defined groups. As shown in figure 5B, significantly higher CCR6 levels ($p < 0.005$, Mann-Whitney U test) were detected on circulating PDC from melanoma patients (mean: $34 \pm 21\%$ of positive cell) as compared to healthy controls ($16 \pm 8\%$). CCR6 was expressed by more than 40% of circulating PDC in 15 out of 41 melanoma patients (36%), which was never the case in the control group. There was no significant difference between stage I-II and stages III-IV and in both groups, the level of CCR6 expression on PDC was higher compared to healthy donors group (data not shown). In contrast, no difference was observed in the expression levels of CCR6 on MDC in the two groups ($52 \pm 17\%$ and $55 \pm 18\%$). These results suggest that CCR6 is specifically up-regulated on circulating PDC in melanoma patients.

In order to evaluate the capacity of CCR6 expressing PDC from melanoma patients to migrate in response to CCL20, migration experiments were performed. Whole PBMC from 5 patients and 7 healthy donors were used in transwell assays. The cells that were recovered in the lower chamber were counted by flow cytometry to precisely determine the number of PDC and MDC responding to CCL20 or CXCL12. As expected and shown in Figure 5C, both PDC and MDC highly migrated towards CXCL12, with more than 70% of the cells initially put in the upper chamber of the well migrating in the lower chamber. MDC from healthy donors and melanoma patients migrated in response to CCL20, with respectively $18 \pm 2\%$ and $20 \pm 5\%$ of the MDC migrating. PDC from healthy donors that expressed low levels of CCR6 (mean = $16 \pm 6\%$, data not shown) did not migrate towards CCL20. Conversely, PDC from melanoma patients chosen for their high expression of CCR6 (mean = $55 \pm 15\%$, data not shown) displayed a slight but statistically significant ($p < 0.05$) migration in response to CCL20, with $8 \pm 3\%$ of the PDC initially put in the well migrating, compared to $3 \pm 2\%$ in the control condition. These experiments demonstrate the functionality of CCR6 expressed by

circulating PDC from melanoma patients. CCR6⁺ PDC infiltrate melanoma tumors where CCL20 is produced by melanoma cells

We investigated by immunohistochemistry and immunofluorescence whether CCR6⁺ PDC could be detected in the primary melanoma tumors. By using BDCA2 a specific marker for PDC, we detected PDC in 10 cases (37 %) out of 27. BDCA2⁺ PDC were located close to the tumor within the peritumoral leukocyte infiltrate, representing 2 to 5% of these cells (data not shown). In 6 of these cases, we identified BDCA2 positive cells co-expressing CCR6 (representative immunohistochemical and immunofluorescence data shown in fig 6A (one case) and 6B (two cases), see arrows). Interestingly, we were able to detect CCL20 in 7 out of 12 fresh melanoma metastasis supernatants (Fig 7A). This secretion was not an artifact due to the 24h culture, since mRNA coding for CCL20 was detected in fresh melanoma tumors by RTqPCR (Fig 7B). We also investigated the expression of CCL20 on cryosections from primary melanomas specimens. CCL20 was produced by melanoma cells in 5 out of 6 analyzed samples (representative staining Fig 7C). Altogether these data suggest that CCL20 is produced in the tumor microenvironment and might be involved in the recruitment of CCR6⁺ PDC in the melanoma tumors.

Discussion

Dendritic cells are central cells in the development of antitumor T cell responses. However, the relative contribution of PDC and MDC to antitumor immune responses is still a matter of debate. New cancer immunotherapeutic strategies targeting DC *in vivo* are currently under development, but their efficacy will directly rely on the availability of functional dendritic cells. This study focused on phenotype and functionality of the circulating dendritic cell in melanoma patients.

Equivalent frequencies of circulating MDC and PDC were found in the healthy controls and melanoma patients, contrarily to what has been described in other pathologies including cancers. Indeed, a decrease in the blood MDC and PDC frequencies has been described during the course of various kinds of haematological malignancies (Mohty et al. 2002; Ratta et al. 2002; Boissel et al. 2004; Mami et al. 2004). In these cases low DC counts might be due to an alteration of "dendritopoiesis" during the disease progression. Elsewhere, in advanced solid tumors (van Cruijssen et al. 2007) such as breast cancers (Pinzon-Charry et al. 2007) or hepatocellular carcinomas (Beckebaum et al. 2004), reduced frequencies of circulating DC or their absolute numbers have also been reported. In these advanced cancers, it has been suggested that decreased DC numbers are due to systemic tumor-induced immunosuppression. Our results show that the frequencies of circulating PDC and MDC are not affected in melanoma patients, suggesting that these cells could be targeted to stimulate immune responses in these patients.

We next analyzed the functionality of circulating DC in melanoma patients. Indeed, abnormalities in the maturation of MDC have been found in many kinds of cancers (review (Gabrilovich 2004)) but very few data is available regarding the functionality of PDC. By analyzing the expression of costimulatory molecules, we found that the circulating MDC and PDC from melanoma patients were very similar to that of healthy donors and were immature. Furthermore, upon *in vitro* activation with R848, a TLR7/8 agonist,

both MDC and PDC from melanoma patients matured as efficiently as MDC and PDC from healthy volunteers. These data show that the circulating DC in melanoma patients have retained their ability to respond to TLR-ligands which is encouraging for the development of alternative treatments based on TLR7 or TLR9 agonists. Although these molecules are still early in their clinical development (Krieg 2008; Schon and Schon 2008), they seem efficient regarding skin cancers. We have recently demonstrated that PDC produce IFN- α and express TRAIL upon activation (Chaperot, I et al. 2006), suggesting that they may participate in the efficacy of imiquimod. In the basal cell carcinomas treated by topical application of imiquimod, it has been shown that PDC are recruited in the tumor site (Urosevic et al. 2005; Stary et al. 2007) along with other immune cells. The mechanisms leading to this recruitment are still poorly understood.

MDC are constitutively recruited into the skin epithelium *via* CCR6 while PDC are not found in this peripheral tissue under steady state conditions. However, PDC accumulate in the cutaneous lesions of systemic lupus erythematosus (Farkas et al. 2001) or psoriasis (Nestle et al. 2005) where they secrete IFN- α . The recruitment of PDC in such inflammatory contexts has been suggested to depend on CXCR3 in synergy with CXCR4 (Vanbervliet et al. 2003; Lande et al. 2004) or on ChemR23 (Vermi et al. 2005). PDC have also been found in the infiltrate of some kinds of tumors including carcinomas of the head and neck (Hartmann, E. et al. 2003), breast (Treilleux et al. 2004), lung (Perrot et al. 2007), and ovarian cancers (Zou et al. 2001b; Curiel et al. 2004). Our observation confirms the presence of tumor-infiltrating PDC in melanoma (Salio et al. 2003; Vermi et al. 2003). It has been proposed that melanoma cells attract PDC *via* CXCL12 (Zou et al. 2001b; Vermi et al. 2003; Curiel et al. 2004). We have analyzed the expression of chemokine receptors by the circulating PDC and as expected PDC expressed CXCR4 that could be involved in their recruitment to tumor site. Strikingly, circulating PDC from melanoma patients expressed higher levels of CCR6 as compared to healthy volunteers, and were able to migrate towards CCL20. Moreover, PDC expressing CCR6 were detected in primary tumors, and CCL20, a ligand for

CCR6, is expressed by keratinocytes in the skin and also by melanoma cells (Lee et al. 2003; Movassagh et al. 2004; Hasan et al. 2006) (Figure 8), suggesting that CCR6/CCL20 could participate in the migration of PDC from the blood to the tumor. We thus propose that this CCR6-/CCL20 interaction could constitute a new way of PDC recruitment to primary melanoma. Interestingly, we have already described the expression and functionality of CCR6 on leukemic PDC (LPDC), a kind of malignancy that frequently develops into the skin (Bendriss-Vermare et al. 2004a). The question of the induction of CCR6 on PDC has to be further investigated. In this context, Bendriss-Vermare *et al.* recently demonstrate that IL-3 is able to up-regulate CCR6 expression on primary human PDC (submitted manuscript). It remains to determine whether the mechanism responsible for CCR6 expression by blood PDC from melanoma patients involves IL-3 or other factors that could be produced either by the tumor or by other cells during the development of melanoma.

In the context of melanoma, TLR7 or TLR9 agonist mono-therapies have been used (Pashenkov et al. 2006; Molenkamp et al. 2007; Dummer et al. 2008). Other studies have also tested topical application of imiquimod (R837) (Adams et al. 2008) or subcutaneous injection of PF-3512676 (CpG 7909) (Speiser et al. 2005) as adjuvant for vaccination to improve T cell responses. Altogether, our data encourage the development of such therapeutic strategies based on the activation of DC to induce antitumor immune responses. Indeed, we demonstrate here that both MDC and PDC are available, functional, and mobilizable in the early phases of melanoma development.

Materials and methods

Patients

71 patients (43 men and 28 women) diagnosed as cutaneous melanoma were enrolled in the study. Fresh blood samples were obtained from 43 patients in the 3 weeks following the initial diagnosis of melanoma before the wide local excision of the primary lesion and any complementary surgical or medical treatment. 33 patients were at stage I to II according to the American Joint Committee on Cancer classification (Balch et al. 2001), 9 patients were in stage III (according to lymph node analysis) and one patient was at stage IV (pulmonary metastasis were present at the time of initial staging). Fresh blood samples of 22 healthy controls were also studied. 29 confirmed primary cutaneous melanoma samples were screened for immuno-histology analysis. Tumor supernatants were obtained from 12 fresh metastatic tumor samples. The mean age of the patients at sampling time was 58 years (ranging from 21 to 87). The written informed consent was obtained from each subject.

Antibodies and flow cytometry

Immunophenotyping was performed by flow cytometry on a FACScan or FACScalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA), using direct and indirect labeling. Monoclonal antibodies (mAbs) conjugated with biotin, FITC, PE, PECy-5 or APC were used. Anti-lineage Cocktail 1 (Lin1, a mix of CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 and CD56), -CD11c, and -CD123 (9F5) antibodies were obtained from Becton Dickinson (San Jose, CA USA). Anti-BDCA2 (AC144) and anti-BDCA-4 (AD5-17F6) were purchased from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). PE-conjugated Control IgG1 (679.1Mc7), anti-HLA-DR (B8.12.2), streptavidin, CD40 (HIT2), CD45RO (UCHL1), CD62L (Dreg46), CD80 (MAB104), CD83 (HB15A), CD86 (HA5.2B7), Goat F(ab')₂ Fragment anti-mouse IgM, and purified IgM (GC323) were obtained from Immunotech (Marseille, France). Goat F(ab')₂ anti-rabbit IgG

antibodies(GAR) was purchased from CALTAG Laboratories (USA), PE-conjugated-anti-CCR6 (11A9), anti-CXCR3 (1C6), anti-CXCR4 (12G6) and purified anti-CCR7 (2H4) antibodies were purchased from Pharmingen (San Diego, CA USA). Purified anti-CCR10 antibody was from IMGENEX Corporation (San Diego, USA).

Enumeration and phenotyping of dendritic cells.

Blood dendritic cells were identified by multicolour staining performed on whole blood. Briefly, 200 μ L heparinized blood was used for each staining tube. Cells were incubated for 20 min at room temperature with FITC-Lin1, APC-CD11c, and biotinylated-anti-BDCA4, washed, then further incubated for 20 min with PeCy-5-streptavidin. Red cell lysis was performed by the addition of 2 mL of FACSLysing solution (Becton Dickinson) for 10 min according to manufacturer's instructions. After washing with PBS, cells were acquired by flow cytometry. At least 2×10^5 PBMC were acquired according to the forward light scatter (FSC) versus side light scatter (SSC) profile. Among Lin^{neg} cells, MDC were recognized as CD11c⁺ BDCA4^{neg} cells whereas PDC were CD11c^{neg} BDCA4⁺ and their respective percentages among PBMC were determined. For surface marker analysis of costimulatory molecules or chemokine receptor expression, PE-conjugated mAbs were added to the previously described cocktail that allowed the differential analysis of PDC and MDC phenotype.

Activation of PBMCs

Whole blood samples (2ml) from healthy donors and melanoma patients were cultured for 24 h with or without 1 μ g/mL of R848 (TLR7/8 ligand), (Invivogen, San Diego, CA USA). Blood samples were then handled as previously described and immunostained for the following activation markers: CD40, CD80, CD83, CD86 or CCR7. Each marker was associated with PE-labeling and the cocktail of FITC-Lin, biotinylated-BDCA-2+ biotinylated-BDCA-4, APC-CD11c, followed by labeling with PeCy-5-streptavidin. At least $2 \cdot 10^5$ PBMC were acquired by flow cytometry. Among Lin^{neg} cells, MDC were

recognized as CD11c⁺ cells whereas PDC were CD11c^{neg} BDCA2⁺ BDCA4⁺ and their respective expression of activation markers was determined.

Chemotaxis assay in transwells

Migration assays were carried out using transwells (6.5mm diameter, COSTAR, Cambridge, MA, USA) with 5.10⁵ cells/well. Fresh PBMCs were washed, preincubated for 1 h at 37°C in RPMI medium FCS 2 % with Interleukin (IL)-3 (10 ng/ml) and then placed for 2 h in 5 µm pore size inserts at 37°C. The migrating cells were harvested, immunostained with Lin-FITC/BDCA4-PE/HLA-DR-PC5 and counted by flow cytometry. The results are expressed as the percentage of MDCs (Lin^{neg} / BDCA4^{neg} / HLA-DR⁺) and PDCs (Lin^{neg} / BDCA4⁺ / HLA-DR⁺) which have migrated related to the input number of DCs. The chemokines used were CCL20, and CXCL12 at 1000 ng/mL (R&D systems, MN, USA).

Histology

Immunohistochemistry: Alcohol-formalin-acetic acid (AFA)-fixed and paraffin embedded surgical specimens from 13 cases of confirmed melanoma were cut at 3 µm, deparaffinized, and pretreated in Tris citrate Buffer (pH=8, 100°C, 30min). A double immuno-staining was performed. In brief, non-specific sites were blocked by donkey serum (2%, 30 min, room temperature). The first anti-BDCA2 antibody (Clone 104C12, Dendritics, Dardilly, France) was incubated at room temperature overnight at the dilution of 1:25. The sections were incubated with biotinylated-donkey anti-mouse IgG for 60 min, then treated with peroxydase–conjugated avidin-biotin complex (ZYMED Laboratories, Histostain Plus Bulk Kit, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) and followed by immunodetection with diaminobenzidine (DAB). After heating antigen retrieval with citrate buffer (pH=6, 30 min, 100°C), the sections were sequentially incubated with the second anti-CCR6 antibody (Clone 53103, R&D System, Mineapolis, MN, USA) at the dilution of 1:200 for overnight at room temperature, followed by secondary staining with biotinylated-donkey anti-mouse IgG for 60 min, peroxydase–conjugated avidin-biotin complex

and revealed by Histogreen Peroxydase Substrate (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). Control included the omission of the first primary antibody in the second immunolabelling step.

Immunofluorescence: AFA-fixed and paraffin embedded surgical specimens cut at 3 μ from 4 cases of confirmed melanoma were used. Double immunostaining with BDCA2 and CCR6 were performed. The anti BDCA2-Alexa-Fluor® 546 antibody (Clone 104C12, Dendritics, Dardilly, France; dilution 1:25) and the CCR6-FITC antibody (clone 53103, R&D System, Minneapolis, MN, USA; dilution 1:100) were incubated at room temperature overnight after a pretreatment in Tris citrate Buffer (pH=8, 100°C, 30min). The sections were counterstained with DAPI and observed on a Zeiss Axioimager M1 microscope.

Detection of CCL20 chemokine in tumors

ELISA: Melanoma supernatants were obtained from 12 cutaneous or nodal metastasis. In brief, fresh tumor samples were dilacerated and digested in collagenase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany). The cell suspension was seeded at the concentration of 1x10⁶ cells per ml. Then, the supernatant was recovered after 24 h. The concentrations of CCL20 were measured by ELISA (R&D Systems).

Quantitative RT-PCR: in 4 cases, a part of the fresh cell suspension was frozen and used for RTqPCR detection of CCL20 mRNA. Total RNA was isolated using RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Reverse transcription to cDNA was carried out by standard methods using reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Meylan, France) and dNTP (Roche). These cDNA were amplified using naked primers, LightCycler TaqMan Master mix and Universal Probelibrary probe (Roche). Polymerase Chain Reactions (PCR) were conducted in a LightCycler instrument (Roche). Primers were synthesized by Roche, their sequences were as follows (listed 5'-3') : G6PDH (F: AACAGAGTGAGCCCTTCTCA, R: GGAGGCTGCATCATCGTACT) ; human CCL20: (F: GCTGCTTTGATGTCAGTGCT, R: TCAAAGTTGCTTGCTGCTTC).

Relative threshold cycle (Ct) values for each gene were normalized to the housekeeping gene G6PDH using the equation $2^{-(dCp)}$ where Cp is the mean cross point of duplicate runs calculated by Lightcycler software and $dCp = \text{gene Cp} - \text{G6PDH Cp}$.

Immunohistochemistry: Cryopreserved surgical specimens of primary cutaneous melanoma (6 samples) were used to evaluate CCL20 expression. Frozen 8 μm tissue sections were i) fixed with acetone and 4% paraformaldehyde, ii) preprocessed with 0.3% H₂O₂ (Sigma) followed by an avidin and biotin blocking step (Blocking kit, Vector Laboratories), iii) incubated with blocking rabbit serum for 30 min, iv) stained with polyclonal goat anti- CCL20 IgG (R&D Systems) for 1 h, and v) revealed by biotinylated rabbit anti-goat IgG (Vector Laboratories) and Extravidin-Peroxidase (Sigma) with the AEC substrate (Vector Laboratories).

Statistical analysis

The Mann-Whitney U test was used for the comparisons between independent groups. The student's t test was used to compare the average migrations of DC towards chemokines.

Acknowledgments

Our special thanks for Pr Jean-Claude Béani, Pr Marie Favrot and Dr Marie-Jeanne Richard for their helpful support during this study as well as all the medical staff of Dermatologie and Chirurgie de la Main departments (CHU de Grenoble).

We are also thankful to Christiane Guillermet and to Jean-Paul Molens, for their technical assistance in immunohistology , and RT-PCR, respectively.

References

- Adams S, O'Neill DW, Nonaka D, Hardin E, Chiriboga L, Siu K, et al. (2008) Immunization of Malignant Melanoma Patients with Full-Length NY-ESO-1 Protein Using TLR7 Agonist Imiquimod as Vaccine Adjuvant. *Journal of Immunology* 181:776-784.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. (2001) Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:3635-3648.
- Beckebaum S, Zhang X, Chen X, Yu Z, Frilling A, Dworacki G, et al. (2004) Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin Cancer Res* 10:7260-7269.
- Bendriss-Vermare N, Burg S, Kanzler H, Chaperot L, Duhon T, de Bouteiller O, et al. (2005) Virus overrides the propensity of human CD40L-activated plasmacytoid dendritic cells to produce Th2 mediators through synergistic induction of IFN- γ and Th1 chemokine production. *J Leukoc Biol* 78:954-966.
- Bendriss-Vermare N, Chaperot L, Peoc'h M, Vanbervliet B, Jacob M-C, Briere F, et al. (2004) In situ leukemic plasmacytoid dendritic cells pattern of chemokine receptors expression and in vitro migratory response. *Leukemia* 18:1491-1498.
- Boissel N, Rousselot P, Raffoux E, Cayuela JM, Maarek O, Charron D, et al. (2004) Defective blood dendritic cells in chronic myeloid leukemia correlate with high plasmatic VEGF and are not normalized by imatinib mesylate. *Leukemia* 18:1656-1661.
- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P (2006) Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24:175-208.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5:919-923.
- Chaperot I, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens J, et al. (2006) Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxicity of plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Immunology* 176:248-255.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5:1219-1226.

Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, Alvarez X, Moons L, Evdemon-Hogan M, et al. (2004) Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* 64:5535-5538.

Dummer R, Hauschild A, Becker JC, Grob JJ, Schadendorf D, Tebbs V, et al. (2008) An Exploratory Study of Systemic Administration of the Toll-like Receptor-7 Agonist 852A in Patients with Refractory Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 14:856-864.

Eggermont AM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J, et al. (2008) Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet* 372:117-126.

Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL (2001) Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 159:237-243.

Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, et al. (2003) Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2:2.

Gabrilovich D (2004) Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4:941-952.

Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M (2004) Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol* 50:722-733.

Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, et al. (2003) Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 63:6478-6487.

Hasan L, Mazzucchelli L, Liebi M, Lis M, Hunger RE, Tester A, et al. (2006) Function of liver activation-regulated chemokine/CC chemokine ligand 20 is differently affected by cathepsin B and cathepsin D processing. *Journal of Immunology* 176:6512-6522.

Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ (2000) Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192:219-226.

Krieg AM (2008) Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene* 27:161-167.

Lande R, Giacomini E, Serafini B, Rosicarelli B, Sebastiani GD, Minisola G, et al. (2004) Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in

synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *Journal of Immunology* 173:2815-2824.

Lee JR, Dalton RR, Messina JL, Sharma MD, Smith DM, Burgess RE, et al. (2003) Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. *Lab Invest* 83:1457-1466.

Mami NB, Mohty M, Chambost H, Gaugler B, Olive D (2004) Blood dendritic cells in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 126:77-80.

Mohty M, Isnardon D, Vey N, Briere F, Blaise D, Olive D, et al. (2002) Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34+/CD38- primitive haematopoietic progenitors. *Br J Haematol* 119:115-118.

Molenkamp BG, Sluijter BJ, van Leeuwen PA, Santegoets SJ, Meijer S, Wijnands PG, et al. (2008) Local administration of PF-3512676 CpG-B instigates tumor-specific CD8+ T-cell reactivity in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 14:4532-4542.

Molenkamp BG, van Leeuwen PA, Meijer S, Sluijter BJ, Wijnands PG, Baars A, et al. (2007) Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 13:2961-2969.

Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, et al. (2004) Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Immunology* 173:4433-4442.

Movassagh M, Spatz A, Davoust J, Lebecque S, Romero P, Pittet M, et al. (2004) Selective accumulation of mature DC-Lamp+ dendritic cells in tumor sites is associated with efficient T-cell-mediated antitumor response and control of metastatic dissemination in melanoma. *Cancer Res* 64:2192-2198.

Naylor MF, Crowson N, Kuwahara R, Teague K, Garcia C, Mackinnis C, et al. (2003) Treatment of lentigo maligna with topical imiquimod. *Br J Dermatol* 149 Suppl 66:66-70.

Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. (2005) Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 202:135-143.

O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, et al. (1994) Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82:487-493.

Pashenkov M, Goess G, Wagner C, Hormann M, Jandl T, Moser A, et al. (2006) Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24:5716-5724.

Perrot I, Blanchard D, Freymond N, Isaac S, Guibert B, Pacheco Y, et al. (2007) Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *Journal of Immunology* 178:2763-2769.

Pinzon-Charry A, Ho CS, Maxwell T, McGuckin MA, Schmidt C, Furnival C, et al. (2007) Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br J Cancer* 97:1251-1259.

Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, et al. (2002) Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 100:230-237.

Rosenberg SA, Dudley ME (2004) Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14639-14645.

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10:909-915.

Salio M, Cella M, Vermi W, Facchetti F, Palmowski MJ, Smith CL, et al. (2003) Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *European Journal of Immunology* 33:1052-1062.

Schon MP, Schon M (2008) TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* 27:190-199.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837.

Speiser DE, Lienard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, et al. (2005) Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 115:739-746.

Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G (2007) Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 204:1441-1451.

Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, et al. (2004) Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:7466-7474.

Urosevic M, Dummer R, Conrad C, Beyeler M, Laine E, Burg G, et al. (2005) Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid

predendritic cells following imiquimod treatment. *J Natl Cancer Inst* 97:1143-1153.

van Crujisen H, Hoekman K, Stam AG, van den Eertwegh AJ, Kuenen BC, Scheper RJ, et al. (2007) Defective differentiation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in advanced cancer patients is not normalized by tyrosine kinase inhibition of the vascular endothelial growth factor receptor. *Clin Dev Immunol* 2007:17315.

Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, De Bouteiller O, Briere F, et al. (2003) The Inducible CXCR3 Ligands Control Plasmacytoid Dendritic Cell Responsiveness to the Constitutive Chemokine Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med* 198:823-830.

Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, et al. (2003) Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 200:255-268.

Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, Gentili F, Luini W, Marrelli S, et al. (2005) Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* 201:509-515.

Wolf IH, Smolle J, Binder B, Cerroni L, Richtig E, Kerl H (2003) Topical imiquimod in the treatment of metastatic melanoma to skin. *Arch Dermatol* 139:273-276.

Zeitouni NC, Dawson K, Cheney RT (2005) Treatment of cutaneous metastatic melanoma with imiquimod 5% cream and the pulsed-dye laser. *Br J Dermatol* 152:376-377.

Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, et al. (2001) Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7:1339-1346.

Table 1. R848-induced activation and maturation of PDC and MDC in melanoma patients and healthy donors¹.

| | | Controls (N=7) | | Melanoma Patients (N=12) | |
|------|------------|----------------|----------------|--------------------------|----------------|
| | | PDC | MDC | PDC | MDC |
| | T0 | 86 (8) | 67 (13) | 77 (10) | 71 (13) |
| CD40 | 24h medium | 79 (3) | 94 (2) | 75 (20) | 97 (4) |
| | 24h R848 | 94 (9) | 98 (3) | 87 (13) | 96 (12) |
| | T0 | 6 (6) | 5 (3) | 7 (5) | 9 (5) |
| CD80 | 24h medium | 14 (11) | 39 (11) | 22 (11) | 37 (16) |
| | 24h R848 | 72 (18) | 89 (10) | 65 (19) | 75 (18) |
| | T0 | 8 (9) | 5 (4) | 7 (2) | 7 (2) |
| CD83 | 24h medium | 14 (11) | 46 (19) | 22 (9) | 31 (16) |
| | 24h R848 | 77 (19) | 86 (10) | 63 (16) | 65 (19) |
| | T0 | 56 (16) | 96 (2) | 53 (16) | 83 (5) |
| CD86 | 24h medium | 43 (17) | 95 (6) | 33 (9) | 71 (24) |
| | 24h R848 | 70 (22) | 98 (2) | 72 (13) | 95 (14) |
| | T0 | 74 (23) | 26 (24) | 65 (22) | 36 (6) |
| CCR7 | 24h medium | 86 (4) | 74 (5) | 68 (25) | 53 (14) |
| | 24h R848 | 98 (3) | 72 (29) | 81 (24) | 77 (9) |

1 Whole blood cells were cultured in the presence of R848 to activate both MDC and PDC. The mean (standard deviation) percentage of positive cells for each marker was analyzed for MDC and PDC in melanoma patients and controls.

Figure legends

Figure 1. Frequencies of circulating PDC and MDC in melanoma patients and healthy donors are equivalent.

Dendritic cell subsets were identified and quantified by flow cytometry. A) Identification of MDC (CD11c⁺ BDCA4^{neg}) and PDC (CD11c⁻ BDCA4⁺) (right dot plot) within whole blood mononuclear (left dot plot) lineage negative (middle dot plot) cells. Numbers indicate the percentages of PDC and MDC within peripheral blood mononuclear cells. B) Representative phenotype of MDC and PDC taken from one of the control healthy volunteer. C) The frequencies of MDC (left panel) and PDC (right panel) in the peripheral blood of melanoma patients and healthy controls are shown. (Horizontal bars represent mean percentages).

Figure 2. Circulating dendritic cells from melanoma patients display an immature phenotype

A) Representative comparative phenotype of MDC (CD11c⁺, upper row of dot plots) and PDC (BDCA4⁺, lower row of dot plots) from one of the healthy control. B) Expression of the activation/maturation markers by MDC and PDC from melanoma patients (black bars, n=34) and healthy controls (white bars, n=15). Mean percentages and standard deviation are shown.

Figure 3. Activation profiles of circulating MDC and PDC in response to TLR7/8 ligand.

Evaluation of activated MDC (lin^{neg}, CD11c⁺) and PDC (lin^{neg}, BDCA2/BDCA4⁺, CD11c⁻) after 24 hours culture of whole blood with R848. The expression of CD40, CD80, CD83, CD86, and CCR7 is increased on both DC subsets after culture with R848 (dark grey) as compared to control culture (light grey). Representative graph was taken from a healthy control.

Figure 4. Expression of chemokine receptors by circulating dendritic cells from melanoma patients.

A) Representative expression of chemokine receptors by MDC (CD11c⁺, higher dot plots) and PDC (BDCA4⁺, lower dot plots) (taken from one of the healthy donor). B) Expression of chemokine receptors CXCR3, CXCR4, CCR7 and CCR10 by MDC and PDC from melanoma patients (black bars, n=16) and healthy controls (white bars, n=14). Mean percentages and standard deviation are shown.

Figure 5. Expression of CCR6 by PDC from melanoma patients and their migration

A) Representative CCR6 expression for MDC (CD11c⁺, upper row of dot plots) and PDC (BDCA4⁺, lower row of dot plots) from two melanoma patients (Mel D1 and Mel D2, middle and right dot plots) and a healthy donor (control, left). B) Frequencies of MDC (left panel) and PDC (right panel) expressing CCR6 were determined by flow cytometry in the peripheral blood from melanoma patients and healthy donors. Horizontal bars represent the mean percentage of positive cells. The statistical significance was calculated by a Student's t test. C) Migrations of PDC and MDC towards CCL20 and CXCL12 were analyzed by flow cytometry. PBMC were added in transwells, and the migrating PDC and MDC were recovered in the lower chamber and counted. The percentages of migrating cells were calculated related to the input number of DCs. Mean percentages and standard deviation are shown, for N=7 healthy donors and N=5 melanoma patients, * : p<0.05, and **: p<0.005, Student's t test.

Figure 6. Detection of CCR6-expressing PDC in melanoma microenvironment.

A) BDCA-2⁺ PDC (brown) can be seen in the peritumoral area among the infiltrating leucocytes in melanoma (original magnification: x20). High magnification of the 3 insets show CCR6-expressing PDC (green) (original magnification: x64). B) BDCA2⁺ PDC (red) were also detected by immunofluorescence in primary melanoma, and in two cases, these cells

stained also positive for CCR6 (green), see arrows (original magnification: x40).

Figure 8. Detection of CCL20 in melanoma tumors

A) Measurement of CCL20 secretion in 12 supernatants of melanoma metastasis taken after 24 hours of culture. B) Detection of CCL20 mRNA by quantitative RT-PCR in fresh melanoma tissues samples. C) Sections of frozen melanoma tumors stained with anti-CCL20 (red) showing its production in the tumor (2 representative sections of 5 positive tumors out of 6 analyzed) (original magnification: x20).

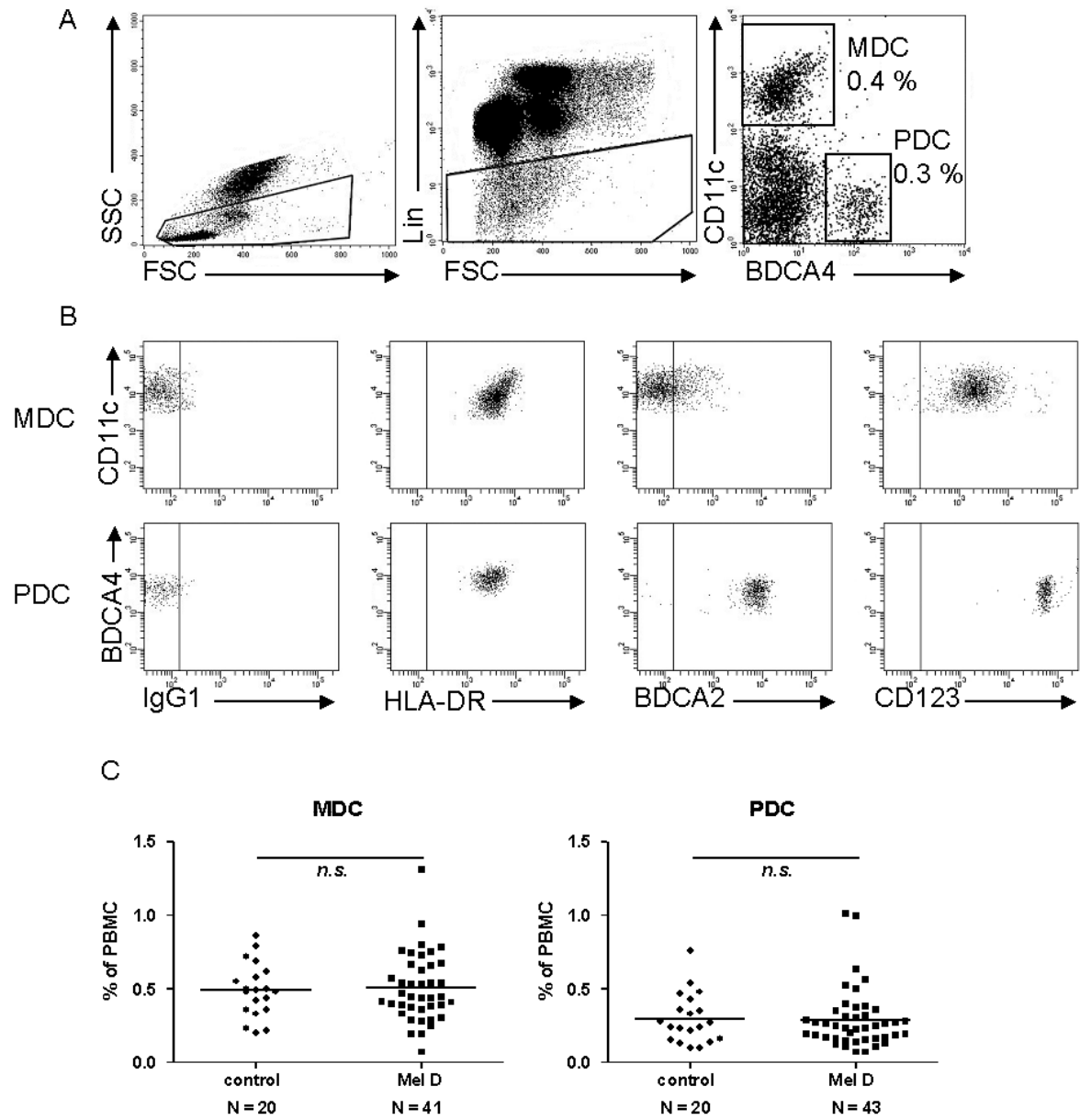


Figure 1

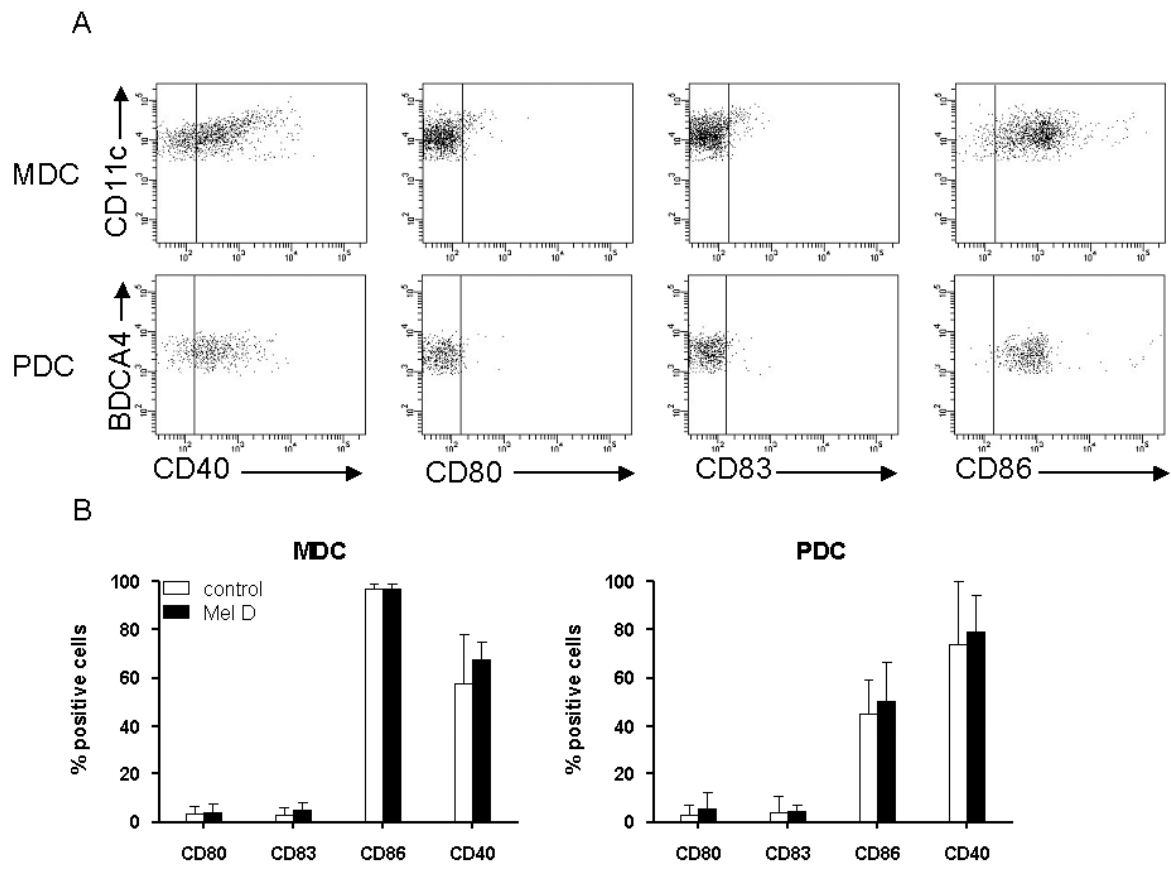


Figure 2

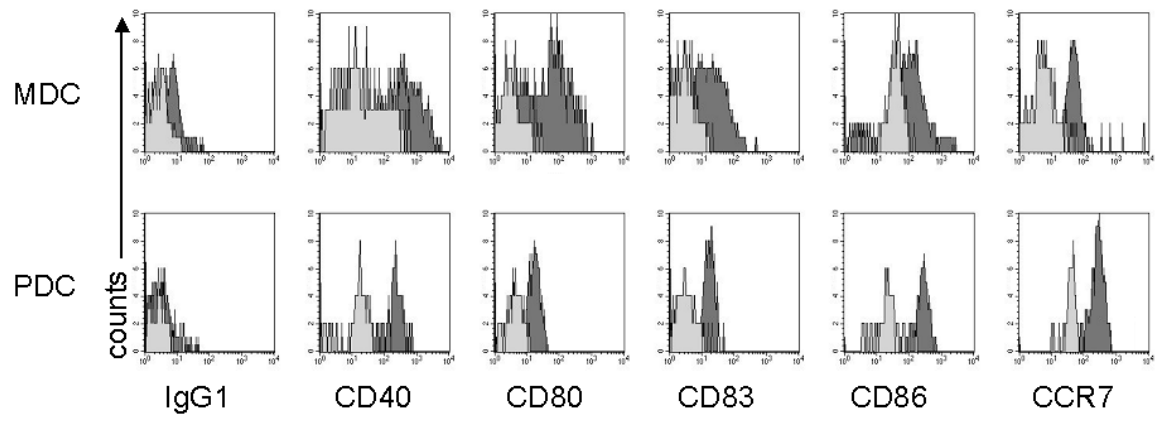


Figure 3

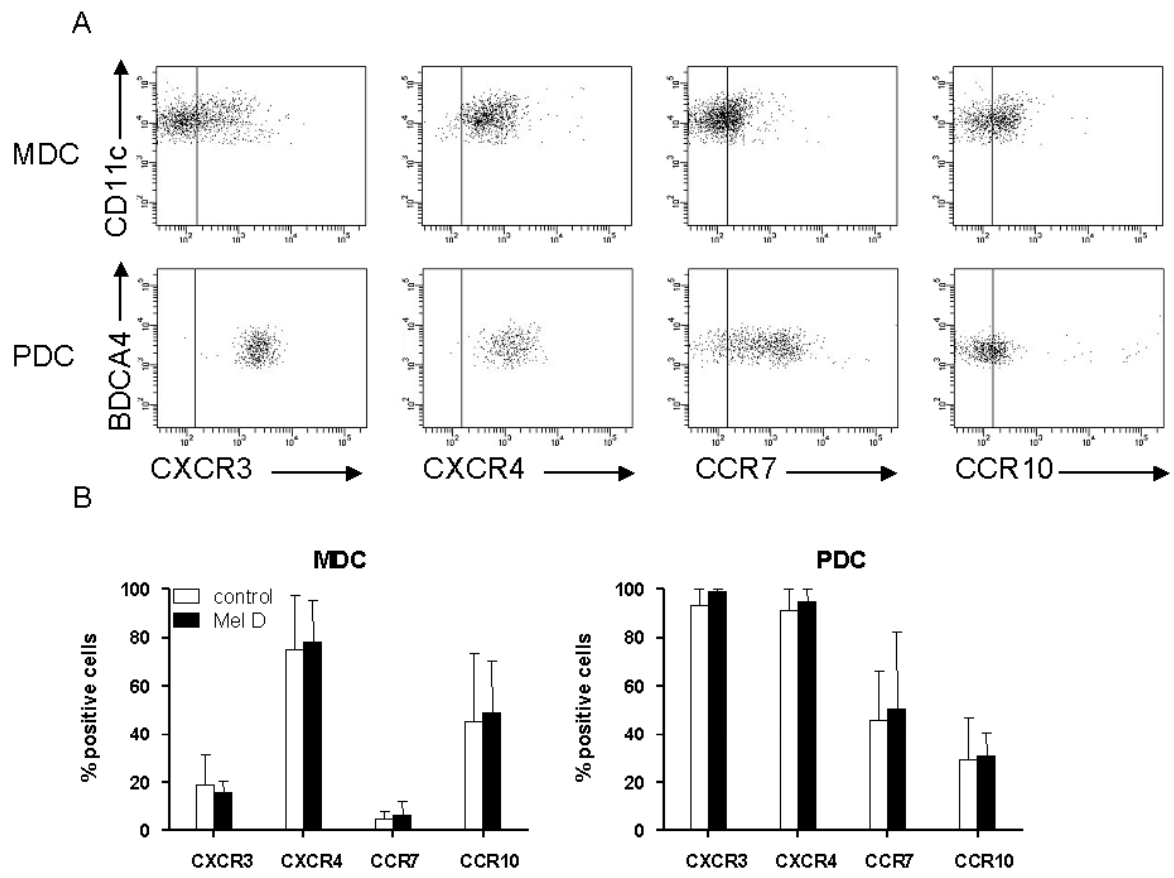


Figure 4

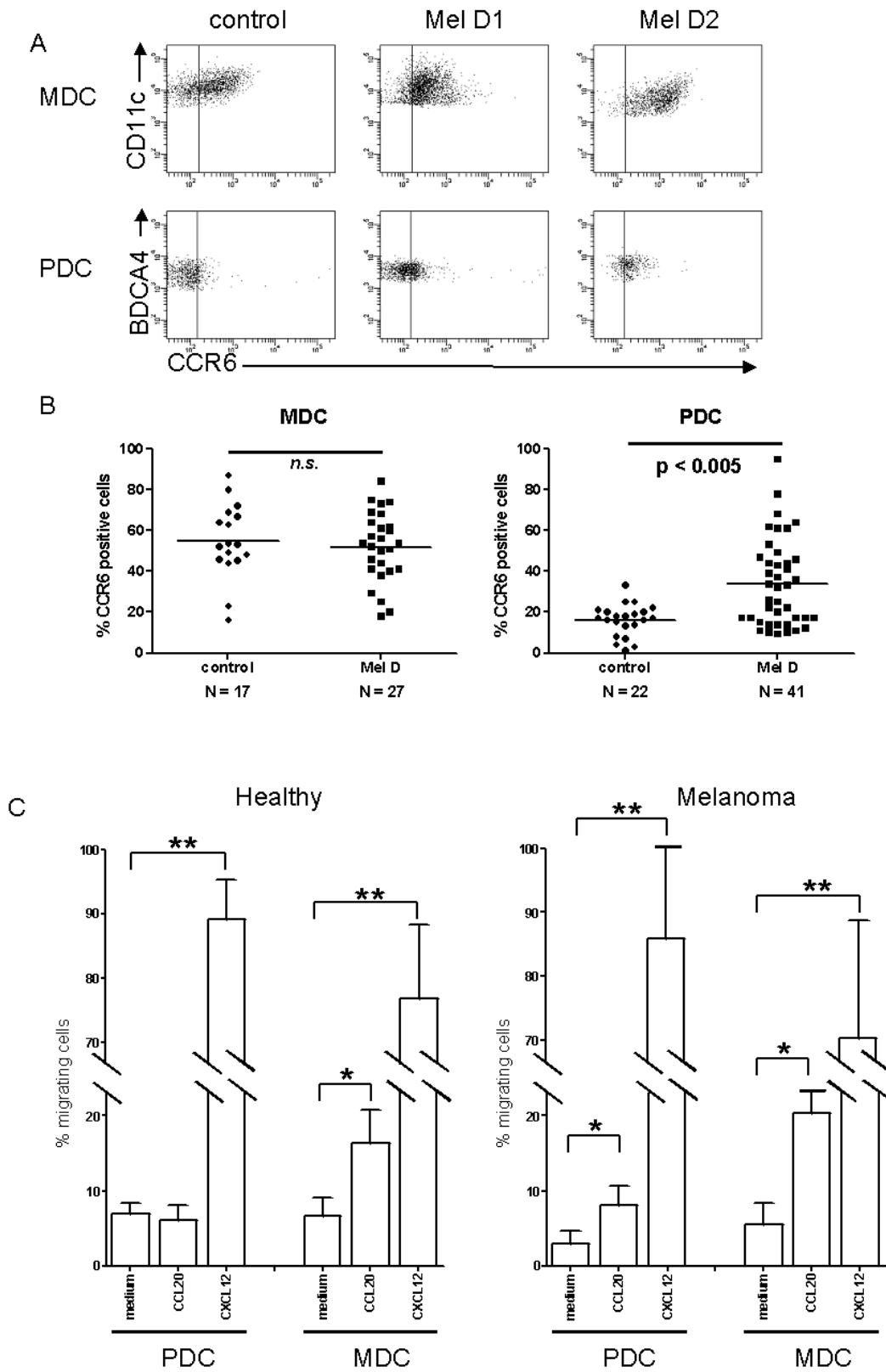
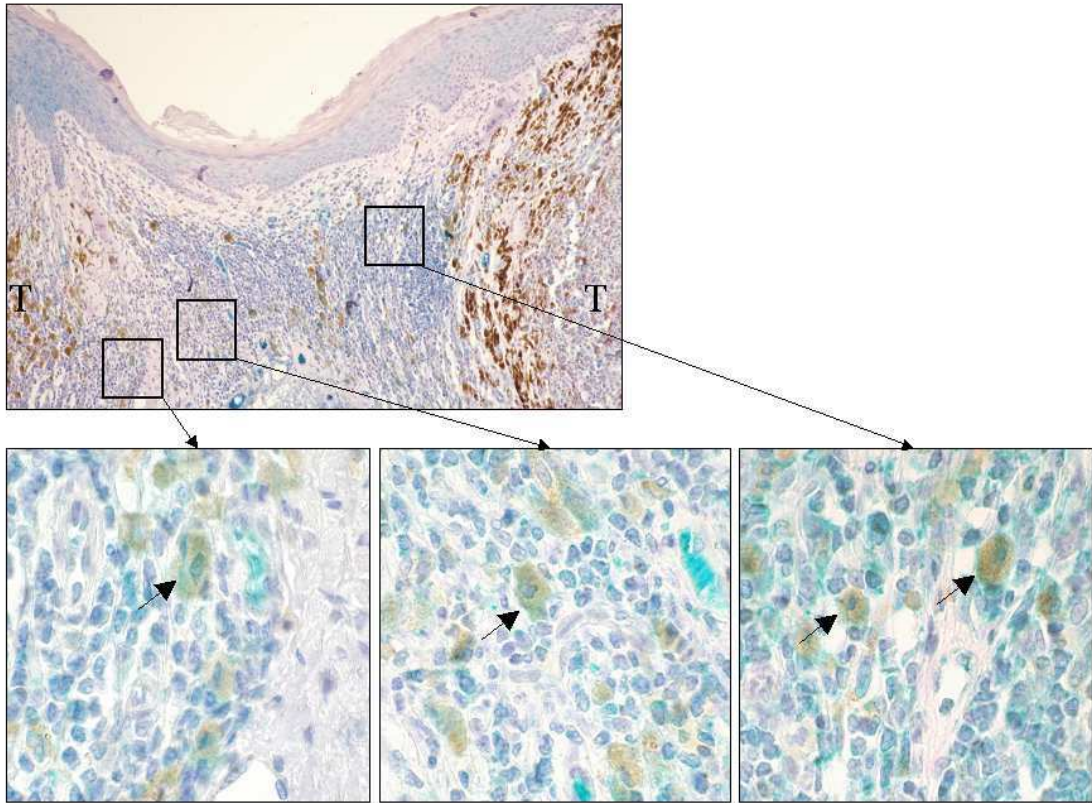


Figure 5

A



B

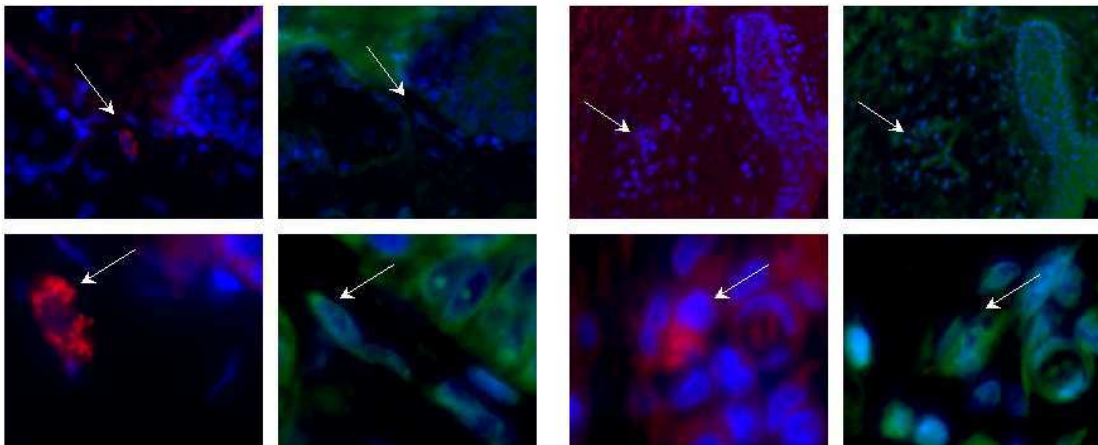


Figure 6

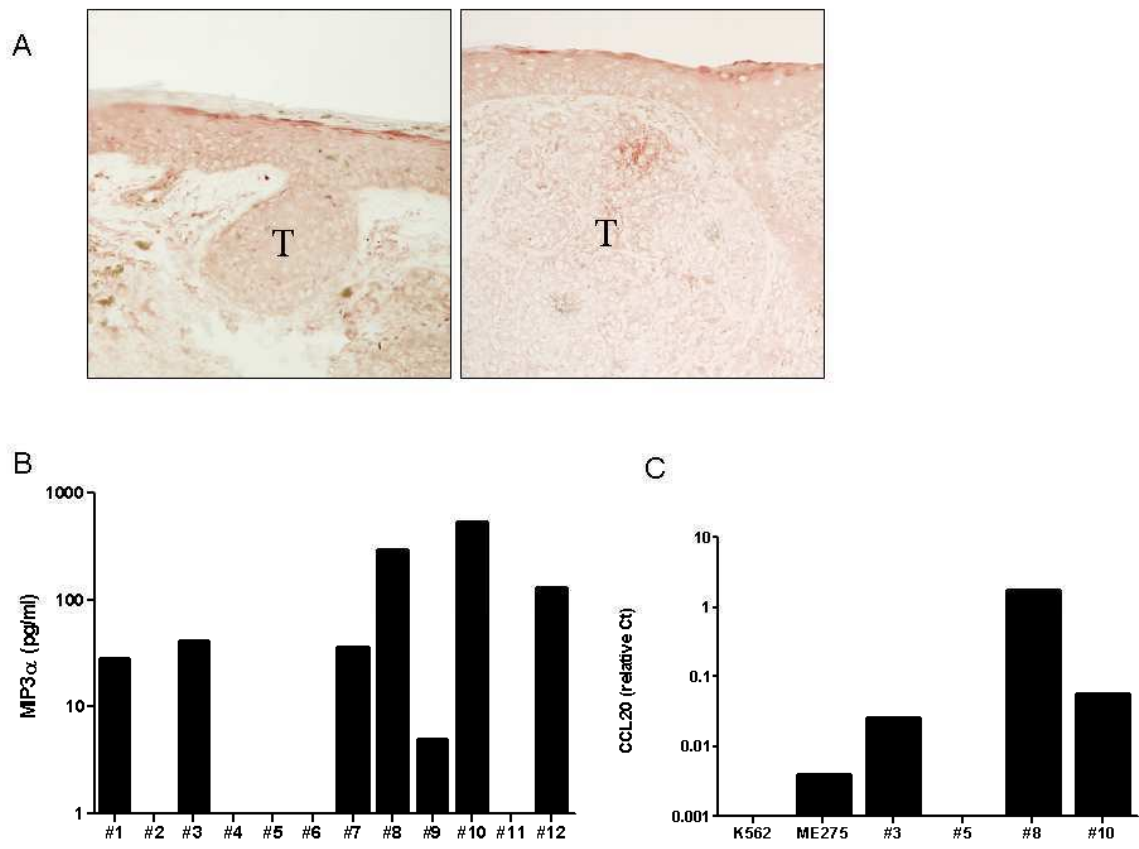


Figure 7

Annexe 1. Méthode d'analyse du phosphoprotéome des pDC activées par un ligand de TLR7

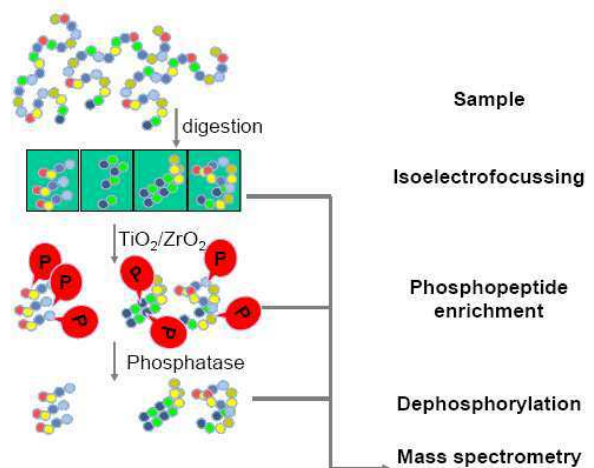
A) Introduction et objectifs

Dans les articles 1 et 2, nous avons décrit une nouvelle voie de signalisation dans les pDC en aval de la stimulation des TLR7 et -9 qui conduit à l'expression des gènes ISG en absence d'IFN de type I via la phosphorylation du facteur de transcription STAT1. Il a été montré que cette voie implique d'une part les kinases PI3K et p38MAPK (article 1) et d'autre part une kinase de type Pyk2 dont l'activité est indépendante du calcium (article 2). Les outils classiques permettant de décrire les différents acteurs d'une voie de signalisation, comme les inhibiteurs chimiques ou l'utilisation de siRNA, ne constituent pas une méthode simple pour définir tous les intermédiaires signalétiques jouant entre les TLR7 et -9 et STAT1. Afin de soulager cette investigation fastidieuse, nous avons mis en place une méthode d'analyse par spectrométrie de masse qui permet de lister les protéines phosphorylées après stimulation des pDC avec des ligands de TLR. Cette stratégie expérimentale appelée PhEOSS (Phosphatase after Enrichment of OFFGEL Separated SILAC) a été élaborée en collaboration avec le laboratoire d'étude de la dynamique des protéomes du CEA de Grenoble.

B) Méthode

- *Culture SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture)* : deux cultures de cellules GEN2.2 sont effectuées, une en milieu léger (Arg ¹²C, Lys ¹²C) et l'autre en milieu lourd (Arg ¹³C, Lys ¹³C). Après une semaine d'incorporation des différents isotopes, les cellules d'une des deux cultures sont activées avec le CL097 pendant 1 h, les autres ne sont pas stimulées.

- *Fractionnement peptidique OFFGEL* : les cellules d'isotopes différents sont mélangées en ratio 1 :1 puis sont lysées. Les différents compartiments subcellulaires sont séparés (membranes, cytosols, noyaux) et le compartiment cytosolique est digéré en solution. L'extrait protéique est ensuite fractionné par isoélectrofocalisation.



- *Enrichissement en phosphopeptides* : les différentes fractions protéiques sont enrichies en phosphopeptides par passage sur colonne mixte TiO_2/ZrO_2 et les phosphates sont éliminés par un traitement à la phosphatase alcaline.
- *Analyse par spectrométrie de masse* : les fractions de peptides sont enfin analysées par spectrométrie de masse. Chaque peptide issu d'une protéine donnée entraînera alors deux pics de masse : un pic correspondant à la masse du peptide avec isotopes légers et un autre à celle avec isotopes lourds. L'analyse différentielle de la fréquence des peptides permet donc de définir quelles sont les protéines phosphorylées qui sont présentes dans les cellules activées.

C) Résultats

La méthode PhEOSS a permis l'identification :

- de phosphorylations précédemment décrites ou non sur des acteurs connus de la voie de signalisation TLR7 (ex : IRAK1 et TAK1)
- de nouveaux partenaires signalétiques non-associés à cette signalisation
 - parmi eux, des régulateurs du remodelage du cytosquelette, un phénomène connu jouant dans la différenciation des cellules dendritiques après activation (ex : cofiline, LSP1)

Ces données ont été validées par la méthode SRM (Selected Reaction Monitoring), qui a permis :

- de confirmer les phosphorylations et/ou expressions différentielles
- d'identifier le site de phosphorylation

D) Conclusion et Perspectives

- La méthode PhEOSS permet de traiter de grands échantillons protéiques de façon efficace pour une identification à haut-débit d'événements rares de phosphorylation
- La technique SRM permet de vérifier la phosphorylation différentielle des protéines en utilisant des échantillons non-enrichis et/ou non-fractionnés
- Combiner les techniques PhEOSS et SRM est idéal pour l'étude des voies de signalisation, permettant la découverte de nouveaux acteurs signalétiques et leur fréquence. L'étude des cinétiques de signalisation devient alors possible.

PhEOSS: a workflow for the high-throughput, reliable identification of phosphoproteins

Maighread Gallagher-Gambarelli¹, Alexandra Kraut¹, **Jeremy Di Domizio**², Mathilde Louwagie¹, Laurence Chaperot², Joel Plumas², Alain Dupuis¹, Jérôme Garin¹, and Michel Jaquinod¹

1: Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Proteomes, INSERM U880, UJF, CEA Grenoble, 38054 Grenoble, France

2: Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers, INSERM U823, UJF, EFS, 38701 La Tronche, France

Summary

In this article we tested the feasibility of a workflow combining a Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture (SILAC) quantitative proteomics approach, OFFGEL peptide fractionation and phosphopeptide enrichment on mixed bed $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2$ columns. PhEOSS (for Phosphatase after Enrichment of OFFGEL Separated SILAC) could treat large protein samples efficiently for high throughput identification of rare phosphorylation events. We applied PhEOSS to a preliminary study of signalling in plasmacytoid dendritic cells following stimulation of TLR7.

Introduction

Proteomics was once a purely descriptive science, aiming to establish exhaustive (or as exhaustive as possible at the time of going to press) lists of proteins present in biological samples. Then comparative proteomics was used to identify the proteins that changed between samples in different conditions (e.g. stress, hormone treatment etc.). Nowadays, proteomics is quantitative, either relatively or absolutely depending on the quantification method used. One of the most robust and widely used quantitative proteomics approaches was first described as Amino Acid Coded mass Tagging by Oda et al. (Oda et al. 1999), since then the technique has been repabltised as Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell culture (SILAC) (Ong, S. E. et al. 2002). This technique is ideally suited to relative quantitative proteomics studies carried out on cells that can be maintained in culture. It involves the incorporation of isotopically labelled amino acids via the cell culture medium, resulting in metabolic labelling of proteins. Cells having incorporated the isotopic label can be mixed with unlabelled cells and the combined proteome can be studied, information regarding the origin of peptides is conserved due to the isotopic label and peptides common to both samples are present as pairs of isotopic patterns. Because labelling takes place early in the experimental setup, samples can be mixed early and biases due to inhomogeneous sample treatment are avoided. This is particularly important when a large number of purification or treatment steps, not all of which can be relied upon to be completely reproducible, are required prior to the final proteomics analysis. For complex proteomes, some decomplexification steps are always necessary in order to avoid being constrained to the identification of only the most abundant proteins in the mixture. Proteome decomplexification can be achieved through one or a number of combined strategies.

Intracellular signalling involves the transmission of a signal received at a receptor, on the cell surface or in an intracellular compartment, to the

nucleus where the signal can be acted upon by activating or inactivating the transcription of responsive genes. The transmission of the signal between receptor and nucleus is often regulated by post-translational modification of proteins. The most common post-translational modification encountered in this context is phosphorylation. Protein phosphorylation is highly dynamic, can induce activation or inactivation of proteins, can promote protein-protein interactions and can result in protein translocations. While a large number of proteins within the cell are potentially phosphorylated, at any given time the pool of phosphoproteins represents a very small proportion of the total proteins within the cell. In addition, stoichiometrically, a phosphoprotein's non-phosphorylated counterpart is nearly always present in greater abundance than the phosphoprotein. In order to target these rare events, several methods for enriching phosphoproteins or phosphopeptides have been described. For specific phosphoproteins, antibodies may be available, however, for the enrichment of all phosphoproteins no general strategy has been devised. Antibodies directed against phospho-Tyr residues have been developed and have been used with success in some studies, but proteins phosphorylated on Tyr residues represent ~5 % of phosphoproteins. Antibodies directed against phospho-Ser and phospho-Thr residues tend to be specific for subsets of phosphoproteins, and thus are not applicable in global phosphoprotein enrichment strategies. Phosphopeptides are a more homogeneous population than phosphoproteins, making biochemical approaches to their enrichment easier to design. There are two general strategies used for the enrichment of phosphopeptides: immobilised metal affinity columns and metal oxide affinity columns. The latter appear to give better results in terms of phosphopeptide purity and enrichment of both mono- and multiply-phosphorylated species.

Because protein phosphorylation is a rare event, in order to get as full a view as possible of the phosphorylation events occurring within the cell it is necessary to start with a sufficiently abundant protein sample. Decomplexification of samples in the milligram range is not feasible using gel-based methods. OFFGEL fractionation, an adaptation of isoelectrofocussing

on immobilised pH gradients, is capable of fractionating samples up to 5 mg. If this technique could be combined with phosphopeptide enrichment it would have the capacity to allow the identification of rare phosphoproteins.

In this article we tested the feasibility of a workflow combining a SILAC quantitative proteomics approach, subcellular fractionation, OFFGEL peptide fractionation and phosphopeptide enrichment on mixed bed $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2$ columns. We applied the workflow (illustrated in Fig. 1) to a preliminary study of TLR7 signalling in plasmacytoid dendritic cells (Chaperot et al. 2001; Chaperot, L. et al. 2006). Results for selected phosphoproteins were verified using Selected Reaction Monitoring and western blot analysis.

Materials and methods

Cell cultures and SILAC labelling

GEN2.2 cells were maintained in RPMI medium containing 10 % FBS on a layer of irradiated MS5 feeder cells. For SILAC labeling, aliquots of Gen2.2 cells were propagated for at least six doublings (~6 days) in SILAC-compatible RPMI medium containing 10 % dialyzed FBS and supplemented with either light L-lysine (20 mg/L) and light L-arginine (40 mg/L) (light medium); or heavy [U-¹³C₆] L-lysine (20 mg/L) and heavy [U-¹³C₆,¹⁵N₄] L-arginine (40 mg/L) (heavy medium). Half of the cells from each culture were stimulated via TLR7 for 1 h at 37 °C using CL-097 (150 ng/mL). Control cells, the other half of each cell culture, were maintained at 37 °C for 1 h. Stimulated and unstimulated cells were washed once in PBS, resuspended in ice cold lysis buffer (sucrose 250 mM, HEPES 1 mM, MgCl₂ 2 mM, Na₃VO₄ 0.2 mM, NaF 10 mM, Na₄P₂O₇ 2 mM, □-glycerophosphate 2mM, Imidazole 2mM and protease inhibitor cocktail) and mixed 1:1 (L:H) on the basis of cell count before lysis.

Subcellular fractionation

Cell lysis was carried out in a Cell disruptor (Constant systems, UK) at 0.4 kbar. Nuclei and large cellular debris were eliminated by centrifugation 1,000 g, 10 min, 4 °C. The post-nuclear supernatant was further centrifuged at 100,000 g, 1 h, 4 °C to separate cytosolic and membrane fractions. Proteins in the cytosolic fraction were precipitated with acetone at – 20 °C. Protein concentrations were determined by μBCA assay (Sigma).

Other protein samples

β- and α-casein were from Sigma.

Trypsin digestion for mass spectrometry analyses

For in-solution digestion, PDC cytosol fraction, β - and α -casein were re-suspended in digestion buffer (25 mM NH_4HCO_3 , pH 8.1). Digestion was carried out overnight at 35 °C, with an enzyme/substrate ratio of 1:100 (w/w). TCEP was added, at a final concentration of 10 mM, and reduction was carried out at 35 °C for 30 min before drying down peptides.

Peptide liquid Isoelectric focusing

Agilent 3100 OFFGEL Fractionator and 3100 OFFGEL High Res and Low Res Kits, pH 3-10 were from Agilent (Germany).

Peptides obtained from the trypsin digestion of 1 mg protein were focused using the Agilent 3100 OFFGEL Fractionator and the 3100 OFFGEL Low Res Kit, pH 3-10 (12-fractions). Peptides obtained from the trypsin digestion of 2.5 mg protein were focused using the Agilent 3100 OFFGEL Fractionator and the 3100 OFFGEL High Res Kit, pH 3-10 (24-fractions). All fractionations were carried out according to the manufacturer's protocol. All fractions were collected in low adsorption tubes (Multi, Dutscher, France) and dried under vacuum prior to MS-analysis or phosphopeptide enrichment.

Phosphopeptide enrichment using mixed bed TiO_2 / ZrO_2 spin columns.

TiO_2 and ZrO_2 particles (8 mg each) were conditioned with 100 μl ACN / 2 % FA 60/40 (v/v) in a microspin tube (Mobitec, Goettingen, Germany). The suspension was vortexed for 5min and spun down at 10,000 g for 30 s. All subsequent centrifugations were performed in the same manner. Peptides were resuspended in loading buffer (FA 5 %, ACN 50 % (v/v) TCEP 10 mM) before loading onto the spin column. After 2 h incubation under rotation, spin columns were washed twice with 200 μl wash buffer I (FA 5 %, NaCl 100 mM), followed by 200 μl wash buffer II (FA 5 %, TCEP 10 mM), then twice with 200 μl wash buffer III (ACN 40 %, FA 3 %). Phosphopeptides were eluted in 400 mM NH_4OH . An aliquot (1/10) of eluate was dried down prior to LC-MS/MS analysis.

Alkaline phosphatase treatment.

Alkaline phosphatase (AP) immobilised on agarose (Sigma, France) was equilibrated in NH_4OH 400 mM. The remaining 9/10 of the enriched phosphopeptide fraction were mixed with 20 units of AP. Following 2 h incubation at 37 °C with agitation on a Thermomixer (Eppendorf) dephosphorylated peptides were harvested by centrifuging the beads in RPM spin column supports (Bio 101) and collecting the flow through. Beads were washed once with acetonitrile, this wash was pooled with the flow through. Peptides were dried down in low adsorption tubes (Multi) before mass spectrometry analysis.

NanoLC-ESI-MS/MS

All peptide mixtures were separated by on-line nanoLC and analyzed by electrospray tandem mass spectrometry. The experiments were performed on a Dionex Dual nanoflow system connected to an LTQ Orbitrap mass spectrometer (Thermo Electron, Bremen, Germany) equipped with a nanoelectrospray ion source. Injected samples (6 μl) were first trapped and desalted isocratically on a PepMap μC_{18} precolumn cartridge 65 mm (300 μm id, 5 μm and 100 Å, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Chromatographic separation was accomplished by loading 0.15 μg peptide mixture onto a 15 cm fused silica C_{18} column (75 μm id, 3 μm , 100 Å and 360 μm od; Dionex) using an autosampler. Peptide elution was achieved using the following linear gradient: (i) from 10 % to 40 % solvent B [ACN/Water 90/10 (v/v) containing 0.1 % FA] for 40 min, (ii) from 40 % to 90 % solvent B for 5 min, (iii). The remaining percentage of the elution solvent was made of solvent A [Water/ACN 95/5 (v/v) containing 0.1 % FA]. Flow rate through the column was 200-300 nL/min. The mass spectrometer was operated in data-dependent mode to automatically switch between Orbitrap-MS and Orbitrap-MS/MS (MS^2) acquisition. Survey full scan MS spectra (m/z range 460–1600) were acquired in the Orbitrap with resolution $r = 60,000$ at m/z 400 (after accumulation to a target value of 1,000,000 charges in the linear ion trap). The most intense ions

(up to five, depending on signal intensity) were sequentially isolated for fragmentation in the linear ion trap using collision induced dissociation (CID). The resulting fragment ions were recorded in the Orbitrap with resolution 15,000 at m/z 400.

Data treatment

Peptide identification from the MS/MS datasets was carried out using MASCOT (version 2.2) (Matrix Sciences, London, UK). Each analysis was submitted to search against the combined SwissProt-Trembl database (SwissProt release 54.8, TrEMBL release 37.8, total 5678599 sequences) restricted to human taxonomy (72599 sequences) or against our in-house casein database which contains the sequences of all the proteins identified in the □ and □ casein sample used as internal phospho-peptide standard. Search parameters used with MS/MS data were: enzyme = trypsin/P, one missed cleavage allowed, peptide tolerance 30ppm, MS/MS tolerance 1Da, peptide charge 2+/3+ and variable modifications acetyl-Nter, oxidized methionine, phospho-ser, -thr and -tyr, labelled Arg (+10) and Lys (+6).

Mascot results were parsed using in-house software IRMa (v 1.19.2) with the following parameters: Report top: Auto protein hits ($p < 0.05$), Peptide score cutoff: 10, Subset Threshold: 0.5. A Score & Rank filter was then applied: Score Threshold: average identity threshold $p < 0.05$, Rank threshold: Rank ≤ 1 . Proteins and peptides meeting these stringent criteria were exported to a database without further manual validation.

Database entries were parsed using in-house software hEIDI (v 0.1.0).

Data from SILAC experiments were quantified using MaxQuant (v 1.0.12.31) specifying the heavy labels used, no fixed modifications were defined, variable modifications were defined as: acetyl-Nter (protein), oxidized methionine, phospho-ser, -thr and -tyr, other parameters were left as default. A decoy database created from the IPI_human database (release 20080911) was used for Mascot searches.

Results and Discussion

MS analysis of IEF fractionated samples

The results of nanoLC-MS/MS analysis of each of the 108 IEF fractions (1 x 12 fractions + 4 x 24 fractions) were combined in a database following automated validation. Parsing this database for proteins identified by at least 2 peptides, or by a single peptide with a score > 60, revealed proteome coverage to a level of 393 non-redundant proteins identified by a total of 3678 peptides meeting our validation criteria. Of these proteins, 252 are localised in the cytosol, 73 are nuclear and 66 are localised to other compartments. This indicates good subcellular fractionation with low contamination of the cytosol fraction by proteins from subcellular compartments. We then examined peptide labelling, 1210 labelled peptides and 2468 unlabelled peptides were identified. This ratio of 2:1 (Light:Heavy) peptides in the overall sample was close to independent measurements of labelling levels in both an unfractionated sample (average ratio 1.4:1) and the individual fractions carried out by MS trace analysis (average ratio 1.6:1). This ratio was consistent across all 12 fractions, giving a good indication that labelled and unlabelled peptides co-focalised. The ratio of cells mixed, based on cell count, was 1.5:1 (L:H), thus all results were consistent, with MS trace analysis agreeing more closely with cell count than peptide count data.

Co-focalisation of pairs of peptides was further verified using the most abundant protein in the mixture as a reference: Actin B, identified by 132 spectra, of which 46 matched to labelled peptides (28 unique peptide sequence, fraction number, peptide modification combinations) and 86 to unlabelled peptides (40 unique peptide sequence, fraction number, peptide modification combinations). Of the unique combinations, 23 were sequenced in both labelled and unlabelled forms in the same fractions. For the remaining 22 peptides, extracted ion chromatograms were generated for both heavy and light forms, all pairs were found and the ratio of heavy to light was ~1.6 (Fig. 2), indicating perfect co-focalisation. Thus OFFGEL fractionation is

applicable to SILAC-labelled samples, and quantification can be reliably performed on samples fractionated by this method.

Phosphopeptide enrichment of IEF fractionated samples

Phosphopeptide enrichment following IEF fractionation using mixed bed $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2$ columns was highly efficient. In Mascot searches against appropriate databases, fractions analysed before enrichment presented few or no phosphopeptides (< 1 % of peptides were labelled phosphorylated) while after enrichment > 50 % of peptides were attributed by Mascot as phosphorylated. This value may appear somewhat low, but it must be taken into account that phosphopeptide fragmentation often generates low-quality spectra that are difficult to interpret. Thus, any remaining non-phosphorylated peptides in the mixture will be much better identified by Mascot than the phosphorylated peptides. The main common attribute of spectra resulting from phosphopeptide fragmentation is the large peak having undergone neutral loss (-98 Da) corresponding to loss of the phosphate group by the parent ion. Visual inspection of spectra from samples having undergone phosphopeptide enrichment revealed a much higher representation of phosphopeptides (~95 %). For example, for fraction 6, 720 queries were submitted to Mascot from 304 distinct monoisotopic parent ions. Of these, 7 were confidently attributed to non-phosphorylated peptides by Mascot, 111 queries could be confidently assigned to phosphopeptide sequences, either based on the Mascot score attributed to the match [7 queries] (for this search against Sp-trEMBL human, the average identity score necessary for a confident match was 29) or based on Mann-type validation of phosphopeptide sequences for peptides with scores between 15 and 29 [104 queries] (neutral loss and 3 consecutive ion fragments). Manual inspection of the remaining 528 queries revealed 333 phosphopeptides showing typical neutral loss fragmentation, two examples of this type of fragmentation are shown in Fig. 3. OFFGEL fractionation is therefore compatible with phosphopeptide enrichment without the necessity

for intermediate steps other than drying down the OFFGEL fractions prior to resuspension in a buffer appropriate for phosphopeptide enrichment.

Alkaline phosphatase treatment

To overcome the difficulties associated with phosphopeptide analysis by mass spectrometry we decided to adopt a dephosphorylation approach similar to that described by Marcantonio et al. (Marcantonio et al. 2008). Following phosphopeptide enrichment, samples were split in two: one tenth of the sample for direct mass spectrometry analysis; 9 tenths for dephosphorylation. Peptide fragmentation in the dephosphorylated sample was improved compared to the untreated sample and allowed the identification and quantification of many more peptides than was possible in the enriched but untreated samples (Table 1). Correlation between spectra before and after dephosphorylation was not always simple – the most abundant peptides were easily found in both samples. In all but 5 of 61 cases, Mascot scores in the dephosphorylated sample were higher (up to 60 points) than for the equivalent phosphopeptide in the untreated sample. This was true even in cases of incomplete dephosphorylation. This enhanced fragmentation following dephosphorylation allowed the identification of additional peptides. These were correlated with their phosphorylated counterparts using extracted ion chromatograms and allowing a retention time shift of ± 5 min between phosphorylated and dephosphorylated peptides, as was used by Marcantonio et al. (Marcantonio et al. 2008). Combining results from this search with matched Mascot results, we could confirm the loss of one or more phosphate groups (mass: 79.97) following dephosphorylation for the peptides shown in Table 1. Ratios of heavy to light peptides were the same before and after dephosphorylation.

TLR7 signalling partners

The phosphopeptides that could be identified were quantified by extracting ion chromatograms for heavy and light forms of the peptides, results are shown in table 1. The identification of known actors of the TLR7 signalling

pathway: IRAK1 (Fig.4A), with a relative abundance of 6 (i.e. the phosphopeptide was 7 times more abundant in the activated sample than in the non-activated sample) and TAK1 or M3K7 (Fig. 4B), only detected in the non-activated sample, validated the activation approach. IRAK1 was identified in a phosphopeptide-enriched sample without the need for alkaline phosphatase treatment. The TAK1 peptide pSQQQKRQGTS was identified only after partial dephosphorylation, the N-terminal phospho-Ser residue was not dephosphorylated by alkaline phosphatase. In the fraction untreated by alkaline phosphatase, a signal could be detected for both peptides with one or two additional phosphorylations at retention times of ± 1 min.

The identification of these two early players in the TLR7 signalling cascade (Kawai and Akira 2007) along with a number of other proteins whose phosphorylation levels were modified following TLR7 stimulation indicates that the PhOSPh-QMS workflow has the potential to identify novel signalling partners and alternative pathways.

Table 1 Peptides detected in both phosphorylated and dephosphorylated samples and their relative abundance ratio between activated and unactivated samples.

| Accession | sequence | m/z | score | RT (NT-AF) | Int (L) | Int (H) | Activé/NA |
|-------------|-------------------------|-------|-------|------------|----------|----------|-----------|
| AHNK_HUMAN | LPSGSGAASPTGSAVDIR | 39.98 | | 1.42 | 1.04E+05 | 1.61E+05 | 1.548077 |
| BCLF1_HUMAN | YSPSQNSPIHHIPSR | 39.98 | | -3.13 | 1.14E+05 | 1.18E+05 | 1.035088 |
| COF1_HUMAN | ASGVAVSDGVIK | 39.98 | 24.30 | 0.74 | 1.68E+05 | 8.48E+04 | 0.504762 |
| FUSIP_HUMAN | SRSFDYNYR | 39.98 | | 1.07 | 1.35E+05 | 1.38E+05 | 1.022222 |
| HDGF_HUMAN | GNAEGSSDEEGKLVIDEPAK | 79.97 | | 1.74 | 8.52E+04 | 1.15E+05 | 1.349765 |
| HS90B_HUMAN | IEDVGSDEEDDSGKDK | 39.98 | 31.43 | 0.33 | 2.09E+05 | 2.39E+05 | 1.143541 |
| HS90B_HUMAN | EISDDEAEEEK | 39.98 | | 0.88 | 3.11E+05 | 2.95E+05 | 0.948553 |
| HS90B_HUMAN | IEDVGSDEEDDSGK | 39.98 | 49.63 | -0.11 | 2.22E+05 | 2.25E+05 | 1.013514 |
| LSP1_HUMAN | TPSPLVLEGTIEQSSPPLSPTTK | 79.97 | 13.00 | 6.4 | 3.74E+05 | 4.17E+05 | 1.114973 |
| LSP1_HUMAN | QASIELPSMAVASTK | 39.98 | 14.13 | 0.88 | 2.24E+05 | 2.64E+05 | 1.178571 |
| NUCKS_HUMAN | VVDYSQFQESDDADEDYGR | 39.98 | | 0.6 | 3.91E+05 | 3.49E+05 | 0.892583 |
| PLSL_HUMAN | GSVSDEEMMELR | 39.98 | | 0.51 | 3.86E+05 | 6.72E+05 | 1.740933 |
| PRP4B_HUMAN | SRSPVDLR | 39.98 | | 1 | 1.11E+05 | 1.17E+05 | 1.054054 |
| PTMA_HUMAN | SDAAVDTSSSEITTK | 39.98 | | 1.05 | 3.81E+05 | 4.32E+05 | 1.133858 |
| RLA1_HUMAN | KEESEESDDDMGFGLFD | 79.97 | 27.00 | 3.95 | 1.39E+05 | 1.45E+05 | 1.043165 |
| RLA1_HUMAN | KEESEESDDDMGFGLFD | 79.97 | 50.62 | 3.78 | 5.49E+05 | 6.24E+05 | 1.136612 |
| SFRS6_HUMAN | SNSPLPVPPSK | 39.98 | | 1.5 | 6.80E+04 | 6.70E+04 | 0.985294 |
| SRRM1_HUMAN | AASPSPQSVR | 39.98 | | 3.76 | 5.70E+04 | 3.39E+04 | 0.594737 |
| SRRM2_HUMAN | SRTPLLPR | 39.98 | | 1.61 | 2.36E+05 | 2.07E+05 | 0.877119 |
| SRRM2_HUMAN | SRTPPAIR | 39.98 | | 1.11 | 1.54E+05 | 1.56E+05 | 1.012987 |
| SRRM2_HUMAN | SRSSSPVTELASR | 79.97 | 2.52 | 2.79 | 1.19E+05 | 9.32E+04 | 0.783193 |
| SRRM2_HUMAN | SRSPLAIR | 39.98 | | 1.05 | 9.89E+04 | 1.36E+05 | 1.375126 |
| TEBP_HUMAN | DWEDDSDEDMSNFDR | 39.98 | 62.73 | 0.79 | 2.67E+05 | 2.25E+05 | 0.842697 |
| TEBP_HUMAN | DWEDDSDEDMSNFDR | 39.98 | | 1.91 | 3.80E+05 | 3.12E+05 | 0.821053 |
| TOP3B_HUMAN | VDPAELFSQAPTEK | 39.98 | | 1 | 1.60E+05 | 1.73E+05 | 1.08125 |
| TCP4_HUMAN | ELVSSSSSGSDSDSEVDKK | 39.98 | | -0.19 | 1.59E+05 | 2.35E+05 | 1.477987 |

References

1. Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D. & Chait, B. T. (1999). Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6591-6.
2. Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. & Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376-86.
3. Chaperot, L., Bendriss, N., Manches, O., Gressin, R., Maynadie, M., Trimoreau, F., Orfeuvre, H., Corront, B., Feuillard, J., Sotto, J. J., Bensa, J. C., Briere, F., Plumas, J. & Jacob, M. C. (2001). Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 97, 3210-7.
4. Chaperot, L., Blum, A., Manches, O., Lui, G., Angel, J., Molens, J. P. & Plumas, J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 176, 248-55.
5. Marcantonio, M., Trost, M., Courcelles, M., Desjardins, M. & Thibault, P. (2008). Combined enzymatic and data mining approaches for comprehensive phosphoproteome analyses: application to cell signaling events of interferon-gamma-stimulated macrophages. *Mol Cell Proteomics* 7, 645-60.
6. Kawai, T. & Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin Immunol* 19, 24-32.

Figure 1. Schematic representation of the PhEOSS workflow.

Figure 2. Actin peptide abundance.

Relative abundances for selected peptides from the most abundant protein, actin, are shown. Upper panel : peptide GYSFTTTAER ; middle panel : peptide KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR ; lower panel : peptide YSVWIGGSILASLSTFQQMWISK. Ion intensities are indicated on screen shots above light and heavy isotopic patterns.

Figure 3. Typical unassigned peptide fragmentation pattern after phosphopeptide enrichment.

Phosphopeptides were enriched using the MOAC protocol described. Mass spectrometry analysis of enriched fractions was carried out as described. Many of the peptide fragmentation patterns could not be assigned to peptide sequences. The majority of these fragmented peptides showed characteristic neutral losses for phosphopeptides. Two representative examples are shown.

Figure 4A. Peptide fragmentation pattern for IRAK4.

IRAK4 was identified in MOAC-enriched peptide samples following mass spectrometry analysis. The peptide fragmentation pattern assigned by MASCOT to peptide FSRFAGSSPSQSSMVAR is shown. Upper inset shows neutral loss of 98, corroborating peptide phosphorylation. Lower inset shows isotopic pattern intensity. The heavy isotope was undetectable.

Figure 4B. Peptide fragmentation pattern for M3K7 (TAK1).

M3K7 was identified in MOAC-enriched alkaline phosphatase treated samples following mass spectrometry analysis. The peptide fragmentation pattern assigned by MASCOT to peptide SQQQKRQGTS is shown. Inset shows MASCOT fragment assignment table.

Fig.1

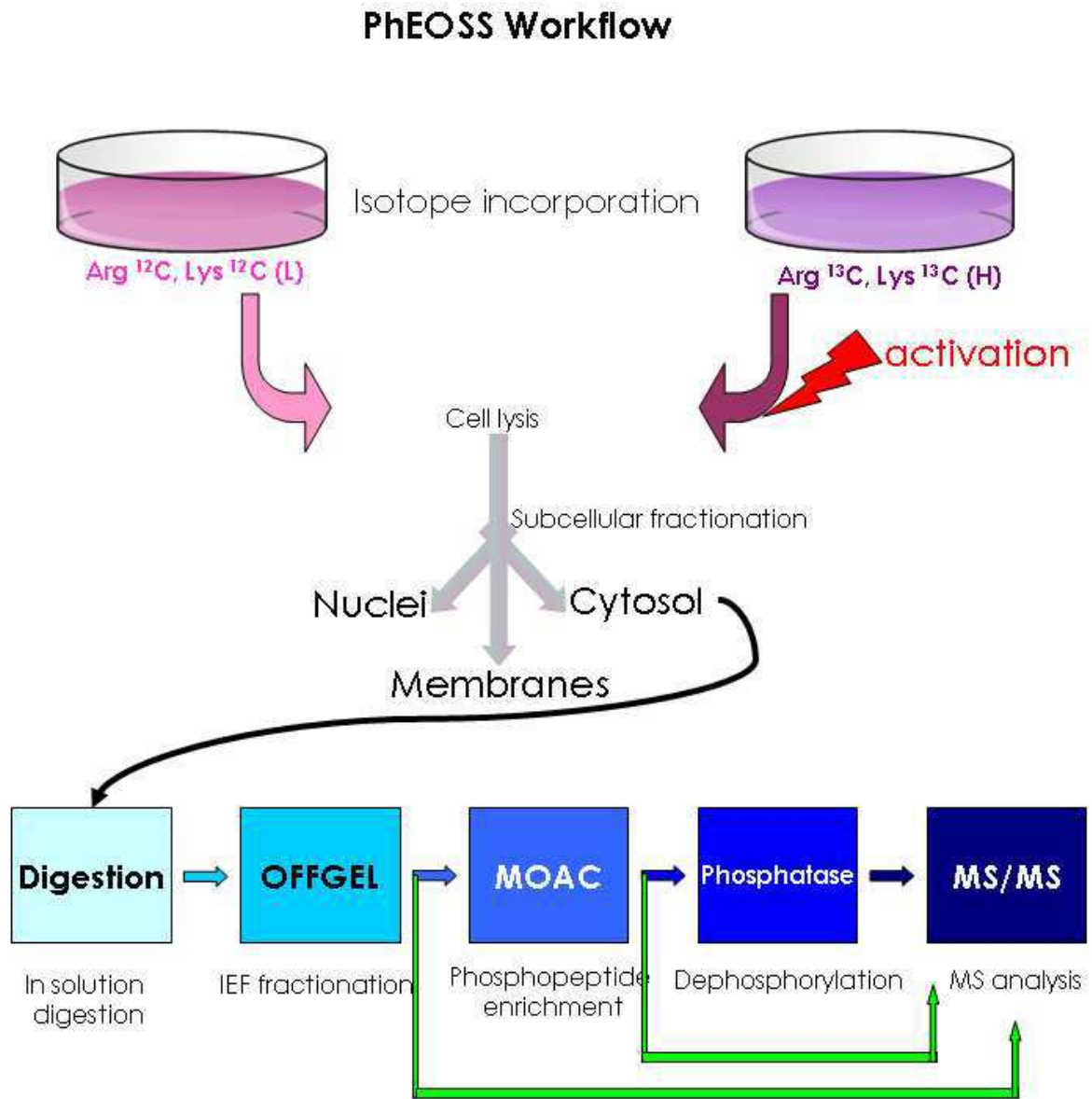


Fig.2

selected actin peptides fraction 6 (orbi1237, Mascot 35456)

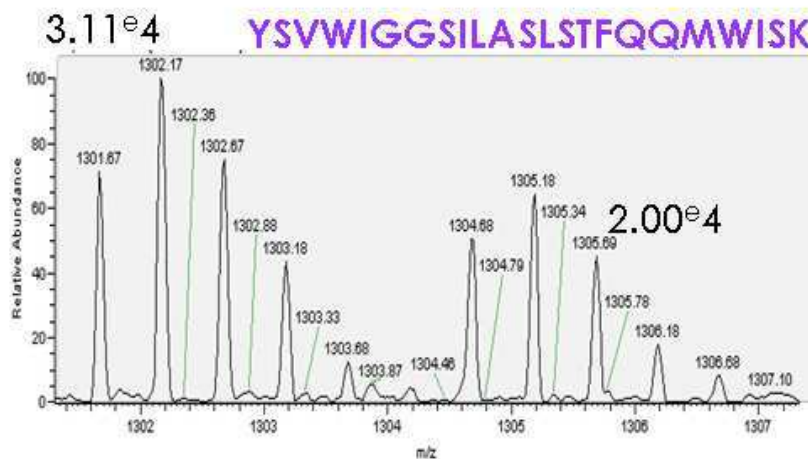
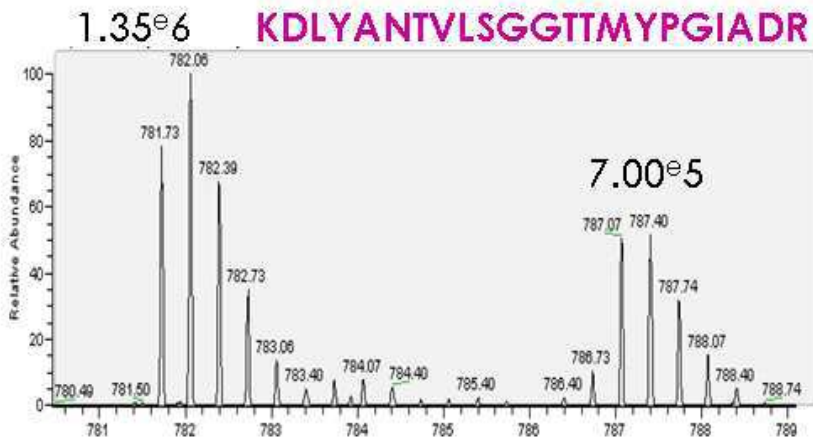
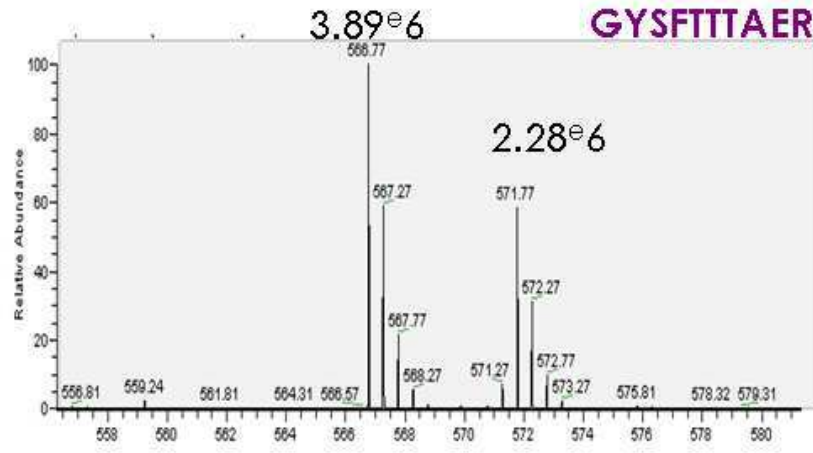


Fig.3 Typical unassigned peptide fragmentation pattern
(Fraction 6 after phosphopeptide enrichment)

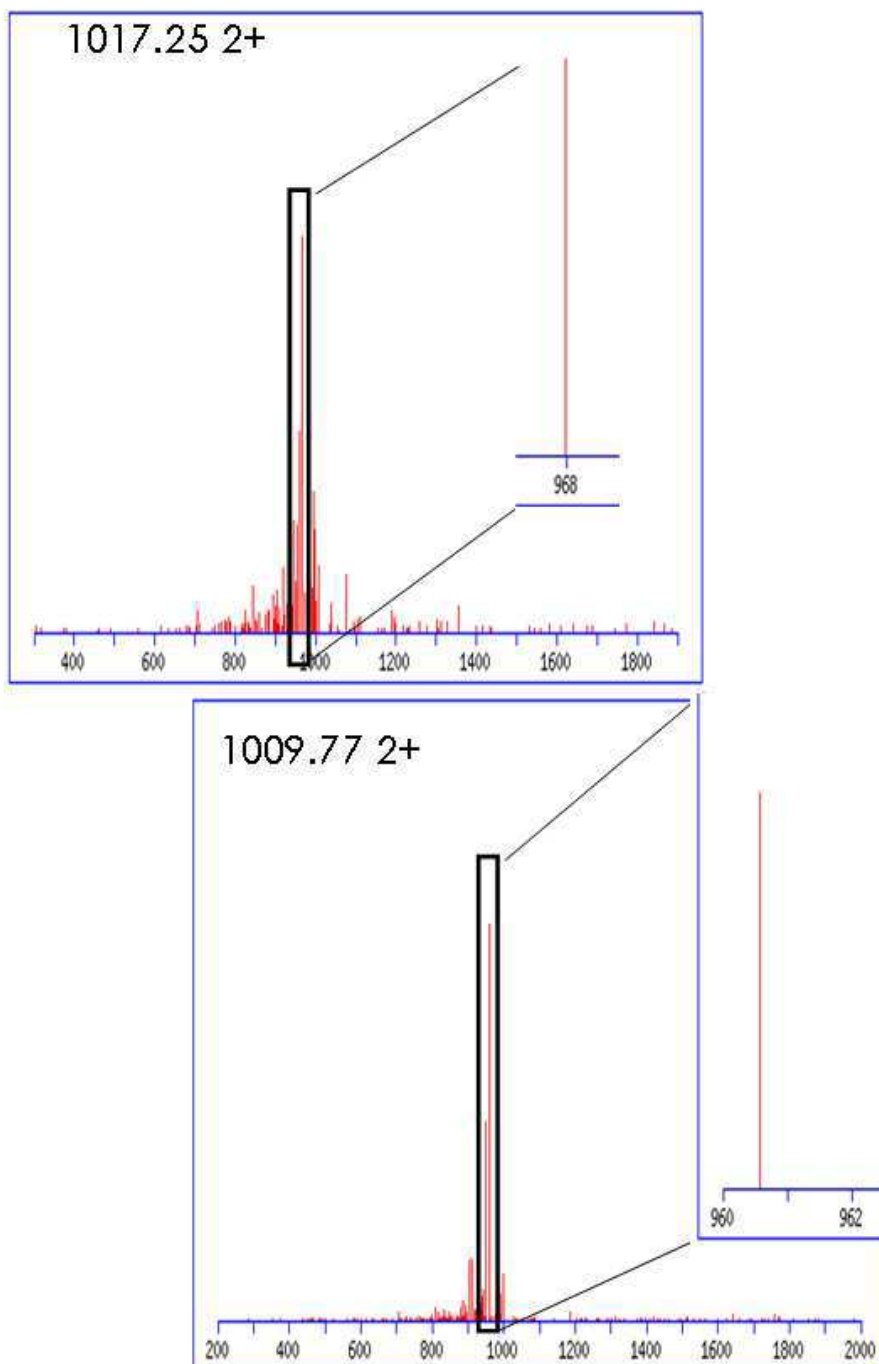


Fig.4A

IRAK1_HUMAN, Interleukin-1 receptor-associated kinase 1

FSRFAGSSPSQSSMVAR

Match to Query 612: 2136.710352 from(713.244060,3+)

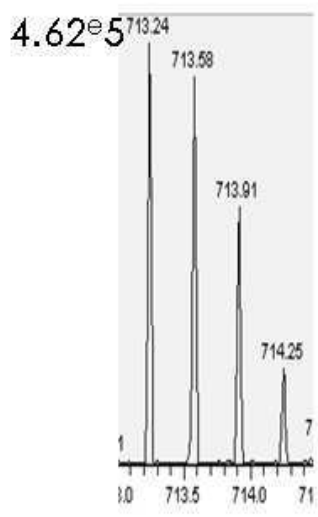
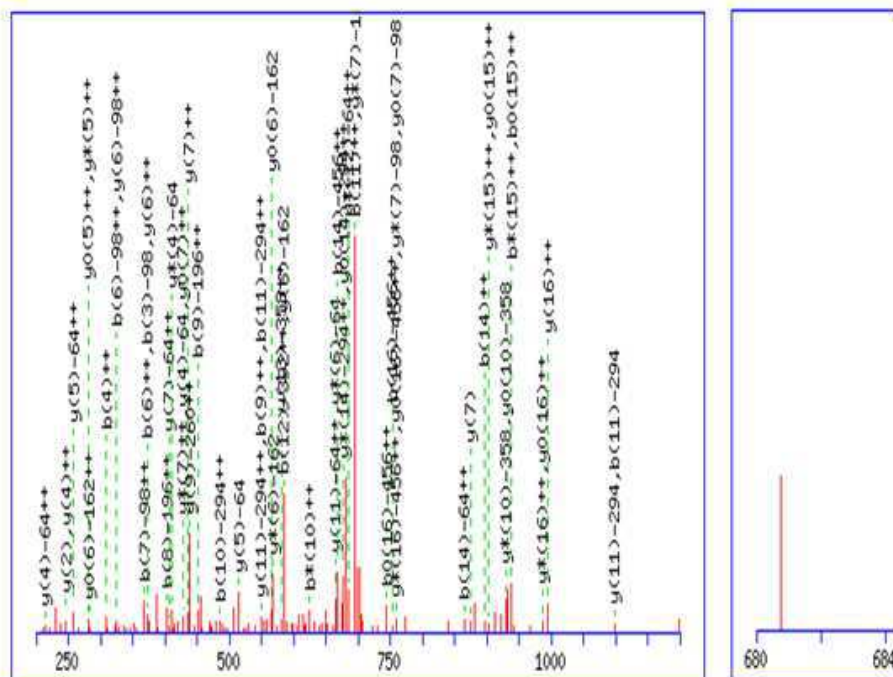
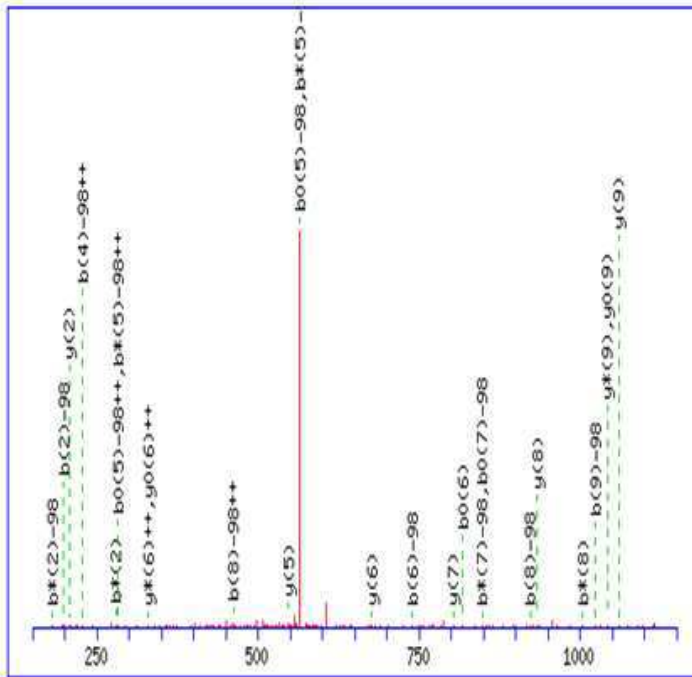


Fig.4B

M3K7_HUMAN, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 (TAK1)

SQQQKRQGTS

Match to Query 250: 1226.535808 from(614.275180,2+)



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1226.5405

Variable modifications:

S1 : Phospho (ST), with neutral losses 97.9769(shown in table), 0.0000

Ions Score: 17 Expect: 0.67

Matches (Bold Red): 26/152 fragment ions using 67 most intense peaks

| # | b | b ⁺⁺ | b [*] | b ⁺⁺⁺ | b ⁰ | b ⁰⁺⁺ | Seq | y | y ⁺⁺ | y [*] | y ⁺⁺⁺ | y ⁰ | y ⁰⁺⁺ | # |
|----|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----|
| 1 | 70.0287 | 35.5180 | | | 52.0182 | 26.5127 | S | | | | | | | 10 |
| 2 | 198.0073 | 99.5473 | 181.0608 | 91.0340 | 180.0767 | 90.5420 | Q | 1060.5494 | 530.7783 | 1043.5228 | 522.2651 | 1042.5388 | 521.7731 | 9 |
| 3 | 326.1459 | 163.5766 | 309.1193 | 155.0633 | 308.1353 | 154.5713 | Q | 932.4908 | 466.7490 | 915.4643 | 458.2358 | 914.4803 | 457.7438 | 8 |
| 4 | 454.2045 | 227.6059 | 437.1779 | 219.0926 | 436.1939 | 218.6006 | Q | 804.4322 | 402.7198 | 787.4057 | 394.2065 | 786.4217 | 393.7145 | 7 |
| 5 | 582.2994 | 291.6534 | 565.2729 | 283.1401 | 564.2889 | 282.6481 | K | 676.3757 | 338.6905 | 659.3471 | 330.1772 | 658.3631 | 329.6852 | 6 |
| 6 | 738.4005 | 369.7039 | 721.3740 | 361.1906 | 720.3900 | 360.6986 | R | 548.2787 | 274.6430 | 531.2522 | 266.1297 | 530.2681 | 265.6377 | 5 |
| 7 | 866.4591 | 433.7332 | 849.4326 | 425.2199 | 848.4486 | 424.7279 | Q | 392.1776 | 196.5924 | 375.1510 | 188.0792 | 374.1670 | 187.5872 | 4 |
| 8 | 923.4806 | 462.2489 | 906.4540 | 453.7307 | 905.4700 | 453.2386 | G | 264.1190 | 132.5631 | | | 246.1084 | 123.5579 | 3 |
| 9 | 1024.5283 | 512.7678 | 1007.5017 | 504.2545 | 1006.5177 | 503.7625 | T | 207.0975 | 104.0524 | | | 189.0870 | 95.0471 | 2 |
| 10 | | | | | | | S | 106.0499 | 53.5286 | | | 88.0393 | 44.5233 | 1 |

Annexe 2. Les pDC et les maladies dermatologiques : focus sur leur rôle dans l'auto-immunité et les cancers

Revue écrite par le Dr. Julie Charles dans laquelle j'ai participé à la rédaction. Cette revue est publiée dans European Journal of Dermatology.

Julie CHARLES^{1,2,3}
 Laurence CHAPEROT^{2,3}
 Dimitri SALAMEIRE^{2,3,4}
Jérémy DI DOMIZIO^{2,3}
 Caroline ASPORD^{2,3}
 Rémy GRESSIN⁵
 Marie-Christine JACOB⁶
 Marie-Jeanne RICHARD^{2,3,7}
 Jean-Claude BEANI¹
 Joel PLUMAS^{2,3}
 Marie-Thérèse LECCIA^{1,2,3}

¹ Dermatologie,
 Pôle Pluridisciplinaire de Médecine,
 CHU Grenoble, Hôpital Michallon,
 F-38043 France

² Inserm, U823, Centre de Recherche
 Albert Bonniot, Immunobiologie et
 Immunothérapie des Cancers, La Tronche,
 F-38706 France; Université Joseph Fourier,
 Grenoble, F-38041 France

³ Laboratoire R&D, Etablissement Français
 du Sang Rhône-Alpes, La Tronche,
 F-38701 France

⁴ Département d'Anatomo-cytopathologie,
 Pôle de Biologie, CHU Grenoble, Hôpital
 Michallon,
 F-38043 France

⁵ Hématologie, CHU Grenoble,
 Hôpital Michallon, F-38043 France;
 INSERM U823,
 Centre de Recherche Albert Bonniot,
 Voies Oncogéniques des Tumeurs Malignes,
 La Tronche, F-38706 France;
 Université Joseph Fourier,
 Grenoble, F-38041.

⁶ Laboratoire d'Immuno-cytologie,
 Etablissement Français du Sang
 Rhône-Alpes,
 La Tronche, F-38701 France

⁷ Unité Mixte de Thérapie Cellulaire
 et Tissulaire,
 CHU Grenoble, F-38043 France

Reprints: J Charles
 <JCharles@chu-grenoble.fr>
 Article accepted on 18/8/2009

Plasmacytoid dendritic cells and dermatological disorders: focus on their role in autoimmunity and cancer

Dendritic cells (DC), considered as immunological sentinels of the organism since they are antigen presenting cells, create the link between innate and adaptive immunity. DC include myeloid dendritic cells (MDC) and plasmacytoid dendritic cells (PDC). The presence of PDC, cells capable of producing large quantities of interferon alpha (IFN- α) in response to pathogenic agents or danger signals, seems to be closely related to pathological conditions. PDC have been observed in inflammatory immunoallergic dermatological disorders, in malignant cutaneous tumours and in cutaneous lesions of infectious origin. They seem to play a crucial role in the initiation of the pathological processes of autoimmune diseases such as lupus or psoriasis. Their function within a tumour context is not as well known and is controversial. They could have a tolerogenic role towards tumour cells in the absence of an activator but they also have the capacity to become activated in response to Toll-like receptor (TLR) ligands and could therefore be useful for therapeutic purposes.

Key words: interferon alpha, lupus, melanoma, plasmacytoid dendritic cell, psoriasis, toll-like receptor ligand

The skin epidermis constitutes the direct interface with the external environment and the first barrier of protection against penetration into the organism of exogenous pathogenic agents or substances. The underlying dermis, where the vascular structures are located, ensures the functions of thermoregulation and nutrition. Immune cells are located and moved between the epidermis and the dermis. They are organised in networks and take part in the defence against pathogenic agents. DC are professional antigen presenting cells (APC) capable of capturing and presenting antigens and also initiating and orchestrating the immune response by establishing links between innate and adaptive responses [1]. In a physiological situation, two DC contingents of myeloid origin are present in the skin: epidermal Langerhans cells and dermal DC, also known as interstitial DC [2]. The pres-

ence of PDC in healthy skin is controversial and only one study has shown the presence of rare immature PDC (BDCA2^{pos}) with no organised distribution pattern within healthy skin [3].

The two populations of DC, MDC and PDC, can be distinguished by their ontogeny and their functional capacities. MDC are of myeloid origin whereas PDC could be of lymphoid origin [4]. The phenotypic characteristics of DC are presented in table 1.

MDC have the functions of sentinels in peripheral tissues where they are resident and able to capture antigens. Regarding cutaneous levels, immature MDC are present in the skin under basal conditions in the dermis and in the epidermis [2]. MDC capture pathogenic agents, infected cells or degradation products using different methods (pinocytosis, phagocytosis...) through receptors

that allow the capture of antigens and integrate the information provided by the pathological environment. They acquire a high level of maturation and migrate towards secondary lymphoid organs through the modulation of the expression of chemokine receptors: a decrease in the expression of CCR6 allows them, for example, to leave the skin, whereas an increased expression of CCR7 directs them towards lymph nodes. They also express HLA DR (Human Leukocyte Antigen, HLA) and co-stimulation molecules (CD40, CD80, CD83, CD86) that allow them to initiate a response from lymphocytes present in the lymph nodes [5]. MDC can induce a T helper type 1 (Th1) polarisation on CD4+ naive T lymphocytes, leading to the predominant secretion of IFN- γ by mature lymphocytes. They can also initiate a T helper type 2 (Th2) polarisation, with lymphocytes secreting IL-4 and IL-5. A Th1 profile leads to a cell-mediated immune response, whereas a Th2 profile secondarily leads to the expansion and maturation of B lymphocytes into plasma cells and to a humoral response. The recruitment of CD8^{pos} naive T lymphocytes leads to their maturation into cytotoxic T lymphocytes that will cause lysis or induce apoptosis of infected cells via the perforin/granzyme and FAS (CD95)/FASLigand (CD95L) death inducing systems.

In a steady state, immature PDC are found in the blood, in T centres of lymphoid organs, in the thymus, in the tonsils and in lung tissue. The major role of PDC is a rapid response against viral aggressions. PDC have the peculiar capacity to produce large amounts of type I IFN in response to viral stimulation [4]. The antigen capture potential of PDC is, however, less developed compared to other APC. Under basal states, PDC are absent from the skin in contrast to MDC, suggesting that the presence of PDC in the skin under pathological conditions is the consequence of active mechanisms of recruitment.

The trafficking of PDC in infectious, inflammatory or tumour contexts is not as well understood as MDC trafficking. Blood circulating PDC are able to reach inflamed lymph nodes by a hematogenous route across high endothelial venules (HEV). This recruitment mainly involves CD62L, CCR5 and ChemR23 [6]. PDC are absent from the afferent lymph, which is in contrast to the trafficking pattern of MDC. High levels of PDC are found in inflamed skin, this recruitment could be mediated by ChemR23 [7] and CXCR3 [8]. Activated PDC observed in cutaneous lesions are capable of secreting large quantities of interferon α (IFN- α) [4]. They can also stimulate naive T lymphocytes and induce Th1 or Th2 polarisation depending on the pathological context. Thus stimulation by viruses or by Toll-Like Receptor (TLR) 7 or 9 ligands

will lead to a Th1 response, whereas activation by IL-3 or CD40L will lead to a Th2 response.

Danger signals carried by pathogenic agents (PAMP) are recognised by TLR. MDC express TLR1, 2, 4, 5 and 8. PDC possess TLR 7 and 9. The expression of TLR7 is almost totally restricted to PDC [9]. Thus MDC and PDC do not express the same set of TLR, but their expression is complementary and allows the recognition of a large panel of pathogenic motifs. New therapeutic molecules targeting TLR are currently in development and can prompt DC danger signal recognition and activation.

However, there is a strong plasticity in DC functions, depending on their localization, on their maturation state and on the influence of their environment. It is now established that DC can have tolerogenic functions. The CD4^{pos}CD25^{pos} T regulatory (Tr) cells and the type 1 regulatory T (Tr1) cells are the best characterized subsets of regulatory T cells and play a crucial role in peripheral tolerance. It has been demonstrated that Tr1 cells can be induced in the periphery by tolerogenic MDC and that mature DC are able to expand functional CD4^{pos}CD25^{pos} Tr cells [10, 11]. Regarding PDC, PDC precursors activated in the presence of IL-3 and CD40-ligands into mature dendritic cells, named DC2, are able to induce CD8^{pos} Tr cells, producing IL10 [12]. The generation of tolerogenic MDC or PDC opens new therapeutic ways in pathologies such as auto-immune diseases or Graft versus Host Disease (GVHD).

Recently, a third subset of effector Th cells that produces IL17 (Th17) has been identified. The protective role of Th17 cells appears to be the clearance of pathogens such as candida albicans and specific extracellular bacteria that are not adequately handled by Th1 or Th2 cells [13]. Th17 are can also enhance anti-tumor immunity [14, 15]. But Th17 cells are able to induce strong tissue inflammation and are implicated in the pathogenesis of auto-immune and inflammatory diseases such as multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis or psoriasis [13]. The role of DC in Th17 polarization is not well defined. Upon specific TLR or dectin receptor stimulation, DC are able to produce IL23 and this cytokine, together with TGF- β , IL1 β and IL6, stabilizes differentiating Th17 cells. So MDC expressing TLR2, TLR 4 and C-type lectins seems to be able to skew the T cell response towards the Th17 profile. The role of PDC in inducing Th17 in humans is not well characterized as yet.

We propose here an overview of dermatological diseases in which PDC are highly implicated and which could bring new knowledge of the physiopathology of some

Table 1. Main phenotypic features of DC

| | PDC | MDC |
|---------------------------------------|---|---|
| Common characteristics of PDC and MDC | | Negativity: CD3 (T lymphocyte marker), CD19 (B lymphocyte marker), CD14 (monocyte marker), CD56 (Natural Killer marker) Positivity: CD4, HLA-DR |
| Specific expression | BDCA2 (lectin family), BDCA4 (neuropilin), CD123 (α chain of the IL3 receptor) | CD11c CD116 (GM-CSF receptor or Granulocyte and Monocyte Colony Stimulating Factor). CD13 (myeloid marker) |

dermatoses, or represent potential targets for new therapeutic approaches.

PDC and immunoallergic inflammatory cutaneous diseases

PDC were initially described in disorders involving an important lymphocytic infiltrate and were associated with the group of cutaneous pseudolymphomas. At the end of the 1980s a new cellular contingent, termed plasmacytoid T cells or plasmacytoid monocytes, was discovered in cutaneous lymphoid hyperplasias and in Jessner-Kanoff type lymphocytic infiltrates [16, 17]. Until then these cells had only been identified in reactive lymph nodes. They were called plasmacytoid because their morphology was close to that of plasma cells with a developed endoplasmic reticulum. They also had common phenotypical characteristics with T lymphocytes and DC, were considered to belong to Skin-associated Lymphoid Tissue (SALT) and their antigen presenting function was a matter of debate [17]. In another study, the presence of plasmacytoid monocytes was established in 58% of biopsies removed from patients suffering from Jessner-Kanoff disease (75 biopsies) [18]. It is now established that these plasmacytoid monocytes or plasmacytoid T cells which were described in the 1980s were actually PDC [19].

Jessner Kanoff disease, lupus, chronic discoid lupus, lupus erythematosus

Jessner Kanoff disease and lupus belong to the same spectrum of dermatoses that can be photo-induced. PDC are found in large quantities by immunohistochemistry in skin biopsies from patients suffering from chronic discoid lupus and lupus erythematosus [20]. PDC are preferentially distributed along the dermal-epidermal junction, around hair follicles and vessels. Cells positive for MxA (protein induced by type I IFN) are disseminated throughout the dermis and epidermis and their number correlates with the PDC density of the infiltrate. These data suggest that activated PDC secrete IFN- α [20]. PDC were also identified in lupic panniculitis lesions, a specific clinical type of lupus also known as lupus erythematosus profundus, and in association with an important in situ secretion of IFN- α [21]. The activation of PDC appears to occur via TLR 7 and 9 which recognise specific DNA and RNA sequences. In patients with lupus, there is a defect in the degradation of apoptotic cells leading to the accumulation of RNA and DNA fragments, especially CpG enriched hypomethylated DNA fragments. These nucleic acid molecules generated by apoptotic cells can accumulate in the skin after exposure to ultraviolet rays [22]. In some patients, especially patients suffering from systemic lupus, anti-double stranded DNA antibodies and antibodies directed against nuclear antigens are produced. These antibodies lead to the formation of circulating immune complexes containing DNA. These immune complexes are able to activate the TLR9. It is now established that this activation occurs via the High Mobility Group Box protein type 1 (HMGB1) secreted by necrotic cells and inflammatory cells, which binds to nuclear DNA present in the immune complex. HMGB1 will then interact with RAGE (receptor for advanced glycation end-

products) which induces the activation of PDC via the TLR9-MyD88 pathway [23]. Recently, PDC have also been identified in lupus tumidus (spontaneous and photo-induced lesions) giving new arguments for a PDC recruitment after UV injury and supporting the concept of a PDC driven pathology in cutaneous lupus [24].

Psoriasis

Psoriasis is another inflammatory dermatosis in which hyperproliferation of keratinocytes is observed in response to an environmental aggression on a background of genetic predisposition. Understanding this disease comes down to determining how inflammatory cells of innate and adaptive immunity are capable of inducing the proliferation of keratinocytes and disorders of epidermal differentiation. The lymphocytic hypothesis is currently thought to be the most likely: autoreactive and constantly activated T lymphocytes produce cytokines that have pro-mitotic effects on keratinocytes [25].

PDC have been identified in increased numbers in psoriasis skin lesions but are also present in the healthy skin of these same patients [26]. Within the lesions they are located in the dermis and have an activated phenotype. In parallel, the number of circulating PDC is reduced in these patients, which is in favour of a cutaneous recruitment. IFN- α produced by activated PDC is secreted during the early phase of the development of a psoriasis lesion and is transient. It induces a strong activation and expansion of pathogenic T lymphocytes. PDC and IFN- α are actors of innate immunity and appear to play a dominant role in the pathophysiology of psoriasis [26]. Blocking the secretion of IFN- α using an anti-BDCA2 monoclonal antibody inhibits the development of psoriasis lesions (experimental model of human psoriasis skin xenografts into mice) [26].

Recently, the anti-microbial peptide LL37 has been identified as a key factor in the development and propagation of psoriasis lesions [27]. LL37 is highly expressed in psoriasis lesions and binds the self-DNA to form aggregated and condensed structures that are potent activators of PDC. These complexes are delivered to the early endocytic compartment of PDC to trigger TLR9 and thereby IFN- α production [28]. The earliest event seems to be the conversion of Pro-chemerin into chemerin in psoriatic pre-lesional skin leading to the recruitment of ChemR23 expressing PDC. This Chemerin/ChemR23 axis is an important new player in the pathogenesis of psoriasis [29].

Moreover, it has been described that the accidental application of a TLR-7 agonist, imiquimod, on psoriasis plaques could lead to its exacerbation and extension into guttate psoriasis [30]. Lesions which had appeared at a distance from the application area excluded a simple Koebner phenomenon that could be secondary to the irritation caused by imiquimod, and PDC was identified in psoriasis plaques. It would therefore be possible that PDC activated via the TLR-7 produce IFN- α in large quantities which could trigger psoriasis lesions.

Atopic dermatitis

The circulating contingent of PDC in patients suffering from atopic dermatitis is higher compared to control subjects, resulting in a reduced MDC/PDC ratio. An inverse correlation was established between the ratio MDC/PDC

and the clinical score of the disease [31]. The PDC infiltrate in atopic eczema lesions is less pronounced than in other inflammatory dermatoses such as psoriasis, contact eczema or lupus [32]. The rare PDC present in the skin are located in close proximity to vessels expressing a sub-type of adressesins, the peripheral neural adressesins (PNAs). The PNAs are the physiological ligands of L-selectin (CD62L) which are strongly expressed by PDC [31]. PDC seem capable of promoting a Th2 immune response but also a Th1 response in synergy with MDC. This type of response profile was observed during the chronic phase of the atopic disease, enhancing the auto-maintenance of the disease.

Moreover, this weak recruitment of PDC in atopic eczema inflammatory lesions could explain the high sensitivity of the patients to viral infections, such as Human Herpes Virus (HSV)1 and HSV2 herpes viruses, pox-virus infections, favorized by a local deficiency in type I IFN [33]. On the contrary, PDC have been found in large quantities in contact eczema lesions [32].

Lichen planus

Lichen planus is an inflammatory dermatosis with an as yet undetermined etiology. Following the hypothesis of a viral origin, the genomes of different viruses were searched for in cutaneous biopsies. Cells infected by HHV-7 (Human-Herpes Virus 7) were identified significantly more frequently in lichen planus lesions than in healthy skin or in other inflammatory dermatoses [34]. A large number of PDC were also observed in dermal infiltrates in close proximity to the epidermal basement membrane. Within lesions, the DNA of HHV-7 was predominantly present in PDC expressing BDCA-2 and replicates within these cells. Clinical remission following treatment was associated with a decrease in viral DNA and in the number of PDC in situ [35]. Lichen planus could be associated with a reactivation of HHV-7, where the prevalence is of roughly 90% within the general population, not following a cytopathogenic pattern, but as an intense inflammatory reaction initiated by PDC [35].

PDC and infectious disorders

PDC are in the front line of antiviral immune responses. Circulating and cutaneous PDC were analysed in a patient suffering from chicken pox, therefore infected with a Varicella Zoster Virus (VZV) [36]. PDC were identified in the epidermis and dermis and strongly expressed CXCR3. The circulating PDC contingent, however, was reduced. These data suggested that PDC probably left the peripheral blood circulation and were mobilised via CXCR3/CXCR3-ligand interactions at the site of the infection. They were activated and secreted IFN- α , as shown by the high number of MxA positive cells present in the dermis and epidermis.

PDC also have a crucial role in HSV1 and HSV2 infection. We have previously discussed the lack of PDC in atopic dermatitis skin as a factor for HSV surinfection. PDC participate in the immune control of recurrent HSV infection by their resistance to HSV infection and their capacity to induce a specific autologous T lymphocyte proliferation [37].

PDC have also been identified in virally induced cancers, especially in cervical carcinomas induced by the Human Papilloma Virus (HPV) [38]. However, the role of PDC in the context of solid tumours remains unclear.

PDC in the context of malignant cutaneous disorders

The interactions of DC subsets with tumour cells and tumour micro-environments are complex and the function of DC is finally determined by a balance of several molecular interactions that regulate recognition, uptake, processing and presentation of tumour antigens [39].

Melanomas

PDC have been identified within primary melanomas using immunohistochemical methods in a series including primary melanomas of different invasion stages, ranging from in situ melanoma to melanoma with a Breslow index of 28 mm [40]. PDC expressing CD123 were located around the tumour within a cellular infiltrate containing lymphocytes and MDC or in close proximity to blood vessels. More rarely, they are close to tumour cell clusters or directly in contact with melanoma cells. PDC have also been shown in cutaneous melanoma metastases. PDC are present in 79% of the malignant melanomas studied (42 primary tumours and 11 cutaneous metastases) whereas they were absent from samples of healthy skin and nevi that served as controls. Moreover, the analysis of 4 sentinel lymph nodes (1 lymph node with micrometastasis) revealed the presence of small clusters of PDC in these lymph nodes. In primary tumours and lymph nodes, the production of IFN- α was studied using the type I IFN – inducible MxA protein. Results showed a weak production of IFN- α that could be linked to functional abnormalities and to a low level of maturation of PDC.

Another study showed the presence of PDC in primary melanoma at the periphery of tumour cells (5 tumours studied) [41]. The number of PDC was higher in invasive and metastatic melanoma than in in-situ tumours. In vitro, the functional study of PDC showed that they are capable of initiating a Th1 response with proliferation of CD8^{pos} T cells specifically directed against melanoma cells. The CD62L expression of these T cells allowed them to reach inflammatory skin. The supernatants of activated PDC also induced a strong expression of MHC I as well as CD95 on melanoma cells, allowing their recognition and lysis by CD8^{pos} T cells. In vivo, however, PDC had a weak level of activation. They were CD83^{neg} and produced very little IFN- α . PDC were present in the tumour but at a sub-optimal level of activation that did not allow them to exhibit all their functional capacities.

In our laboratory, we were able to show the presence of PDC in different primary melanomas by immunohistochemical staining of paraffin embedded tumour with the BDCA2 antibody (figure 1).

PDC could also play a role in the phenomenon of regression that is histologically defined by the total or focal disappearance of malignant melanocytes in the dermis and/or epidermis. Regression occurs in roughly 40% of primary melanomas [42] and can be considered as a localised phenomenon of autoimmunity as the T cell response that is observed is directed against tumour antigens that

are considered as self-antigens. By analogy with autoimmune disorders such as cutaneous lupus, the potential role of IFN- α has been studied in the regression. An immunohistochemical study on 14 melanomas showing regression, compared to 6 dysplastic nevi, 4 halo nevi and 5 samples of healthy skin, was performed [43]. In primary melanoma showing signs of early or intermediate regression, a significantly larger CD8^{pos} T cell infiltrate was observed. The type I IFN inducible protein, MxA was strongly expressed within melanoma showing signs of early or intermediate regression and in halo nevi. The mechanism of CD8^{pos} T cell recruitment appeared to be mediated by the interferon-inducible protein 10 (IP10), the type I IFN inducible protein, as CD8^{pos} T cells express CXCR3, the IP-10 receptor. IFN- α producing cells present in the medium were probably PDC as they were revealed using the anti-BDCA-2 antibody. Therefore the initiation of the immune response that triggered the tumour regression could be linked to the presence of PDC infiltrating the tumor that secrete IFN- α , inducing the expression of IP-10 and the recruitment of cytotoxic T cells expressing CXCR3.

The role of PDC in melanoma can also be studied by looking at the effects of TLR ligands corresponding to the TLR expressed by PDC. Imiquimod, a synthetic ago-

nist of TLR-7 which is specifically expressed by PDC, was tested in a murine model. One hundred and fifteen tumours induced by the intradermal injection of melanoma cells were studied [44]. Eighty nine tumours were treated with topical imiquimod, with one application per day for 30 days, and 26 tumours were treated with the excipient. In imiquimod-treated lesions, partial or complete regression was observed in 26% of cases, stabilisation was observed in 51% of cases and tumour evolution in 23% of cases. Characterisation of the inflammatory infiltrate following the application of imiquimod showed a large number of PDC within the infiltrate. Therefore, the authors suggested that the anti-tumour effects of imiquimod could be mediated by a massive recruitment of PDC, expressing TLR-7 and capable of producing IFN- α in situ. In humans, no large study has evaluated the effects of imiquimod in the treatment of melanoma or associated cutaneous metastases. A few isolated cases showing the efficacy of imiquimod on cutaneous melanomas in palliative therapy have been reported [45-47]. Only one study was performed on the use of imiquimod as a first intention therapy for the treatment of 30 lentigo maligna that were not easily accessible for surgery [48]. Efficacy was shown in 93% of cases without any relapse at one year of follow-up. It is difficult to draw conclusions from this study, as the sample number was very reduced as was the time of follow-up. A phase II multicentric study used a TLR9 agonist, PF-3512676, in the treatment of stage IV melanoma (M1a to M1c AJCC [49]). Twenty patients were treated with weekly subcutaneous injections of 6 mg of PF-3512676 over a period of 24 weeks. The disease progressed under treatment in 14 patients. Stabilisation was observed in 3 patients, and 2 patients partially responded (one of them benefited from a 140 week prolonged partial response). There were no severe side effects associated with this treatment. Follow-up of the phenotypic and functional modifications of PDC in the peripheral blood after 8 weeks of treatment showed an increase in the expression of HLA-DR and CD86 activation markers on PDC. A sustained induction of type I IFN expression was also found. These data demonstrate the possibility of acting pharmacologically on PDC to activate them in vivo in order to fight against the tumour. Treatment with a TLR9 agonist was also proposed as an adjuvant treatment prior to extensive surgery of the primary melanoma and exeresis of sentinel lymph nodes [50]. In sentinel lymph nodes of treated patients, an activation of PDC, an increase in the production of pro-inflammatory cytokines and a decrease in the contingent of regulatory T cells have been observed [51].

Basal cell carcinomas

PDC are also present in basal cell carcinomas and have been studied as pharmacological targets of imiquimod. PDC appeared to be recruited and activated in situ by imiquimod, leading to the secretion of IFN- α within the tumour tissue [52]. The use of imiquimod has been validated in the United-States and in Europe for the treatment of superficial basal cell carcinoma [53]. It has recently been shown that PDC were massively recruited in superficial basal cell carcinoma and acquired the expression of TRAIL during the application of topical imiquimod. The expression of TRAIL Receptor 1 has been shown on the

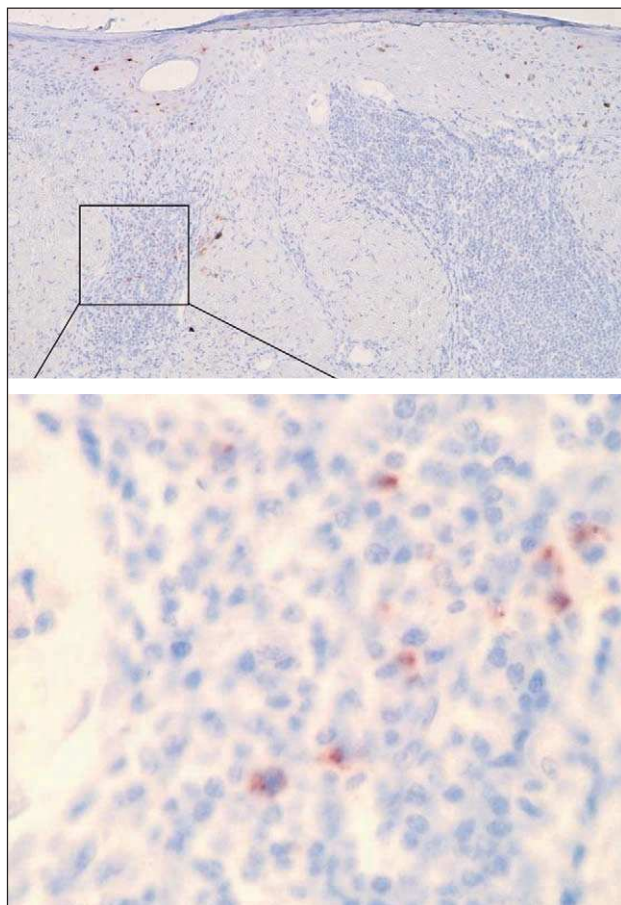


Figure 1. Immuno-histochemical BDCA2 (Clone 104C12 Dendritics, Dardilly France) staining of a inflammatory regression area of a primary melanoma. Original magnification $\times 40$ and $\times 400$ for inset, diaminobenzidine (DAB) revelation.

surface of basal cell carcinoma cells and a large number of tumour cells undergoing apoptosis were present in tumours treated with imiquimod, suggesting that the activation of PDC by imiquimod led to the apoptosis of tumour cells mediated by the TRAIL pathway [54].

Epidermoid carcinomas of the head and neck

PDC have been identified in epidermoid carcinomas of the head and neck [55]. PDC were distributed within the tumour tissue and presented functional alterations, especially with regard to their production of IFN- α . Decreased expression of certain TLR was noted, especially TLR9, leading to the absence of secretion of IFN- α in situ, in response to CPG-oligodeoxynucleotide (ODN), the TLR9 ligand. The response to CPG-ODN was preserved in the draining lymph node. These findings suggested that the microenvironment of the tumour could play a role in the functional alterations observed in PDC.

Mediterranean type Kaposi disease

Studies showed that DC populations in peripheral blood were decreased in patients suffering from the Mediterranean type Kaposi disease, an angiosarcoma associated with the Human Herpes Virus 8 (HHV-8). PDC represented 0.23% of the PBMC count in 66 patients compared to 0.32% of PBMC in controls, MDC represent 0.47% of the PBMC count in patients against 0.65% in controls. The phenotypic profile of DC was not modified. Quantitative alterations of the DC contingent were correlated with the stage of the disease but also with the clinical evolution of the disease and were independent of the levels of blood viral DNA detected in the blood of the patients. Modifications in the circulating MDC contingent could be associated with the effects of the viral IL-6 coded by HHV-8 that shares analogies with human IL-6 and inhibits the differentiation of MDC from their CD34+ precursors [56].

Hematological disorders with cutaneous expression involving PDC

Graft versus host disease

PDC could play a crucial role in the occurrence of graft versus host disease (GVHD) following the allograft of hematopoietic stem cells as PDC have multiple functions and could play an active role in the phenomenon of tolerance. GVHD occurs when the donor's mature T cells recognise specific antigens of the recipient, which leads to the destruction of the recipient's cells. One study showed that chronic GVHD in humans was associated with a high level of PDC in the graft and in the recipients blood [57]. Data from a murine model suggested that PDC from the recipient prevented the occurrence of acute GVHD and enhanced the acceptance of the graft [58].

PDC leukemia

PDC leukemia is a hematological disorder that has only recently been identified as a separate entity [59, 60]. This leukaemia was initially described as a CD4^{pos} CD56^{pos} malignancy with skin manifestation, but the high expression of CD123 marker was a strong argument for a plasmacytoid dendritic cell proliferation [61]. The main clinical



Figure 2. Patient suffering from PDC leukemia. Cutaneous nodules of the trunk.

characteristics of PDC leukemia are an aggressive evolutive profile and frequent skin involvements (figure 2). The phenotype of leukemic PDC is Lin^{neg}, CD4^{pos}, CD56^{pos}, CD11c^{pos}, CD123^{pos}, HLA-DR^{pos}, and CD45Ra^{pos}. The phenotypic and functional studies of these cells in several patients have shown the expression of a functional CCR6 on the surface of leukemic PDC with migration towards MIP3 α , its ligand in vitro. CCR6 could therefore allow leukemic PDC to leave the peripheral blood stream and to penetrate the skin leading to the formation of tumour nodules. The phenotypic and functional characteristics of leukemic PDC are otherwise comparable to those of normal PDC [62, 63]. An unique cell line has been derived from the cells of a patient suffering from PDC leukemia, the GEN cell line (Brevet 02-15927) that is a useful tool for the study of PDC ex vivo (figure 3).



Figure 3. PDC of the GEN cell line after in vitro activation by influenza virus illustrating the typical morphology of virus activated PDC.

Conclusion

PDC are professional antigen presenting cells and play a central role in the initiation and regulation of immune responses. PDC seem to be absent in the skin under homeostatic conditions whereas there are massively recruited into the skin under pathological conditions, such as inflammatory, infectious or malignant disorders. There is a strong plasticity in their functions depending on the pathological context in which they are present (figure 4). While their role is clearly beneficial for the host in the context of defence against infectious agents, PDC seems to be in an undesired state of activation in patients with inflammatory auto-immune diseases, such as psoriasis or lupus. PDC are activated by endogenous pathogenic motifs, their aberrant production of type I interferon leading to inflammation and the development of skin lesions. Studies of PDC constitute a crucial progress in the comprehension of the pathogenesis of skin pathologies such as psoriasis and lupus, which could lead to new therapeutic approaches targeting IFN- α production by PDC. In a carcinogenic context, PDC seem to play an important role in shaping the host response to a tumour. PDC interact with tumour cells and tumour microenvironments and a better understanding of these interactions will have major implications for the comprehension of phenomenon of immunity or tolerance to tumours. In breast cancer the presence of PDC in the tumour is associated with a poor prognosis [64] and in ovarian cancer PDC are recruited to the tumour site and produce IL-10, a regulatory cytokine [65]. Their prognostic signification is not known in skin cancers to date. The supposed detrimental functions of PDC in a tumoral context may be reversible in the context of melanoma. Molecules that are able to activate PDC and increase their antigen presentation capacities are currently under development. For example, CpG-ODN can enhance the immunogenicity of a Melan-A peptide based vaccine and the tumor antigen specific T cell responses in melanoma patients [66]. Thus, therapeutic agents targeting PDC today represent new innovative approaches in onco-dermatology. ■

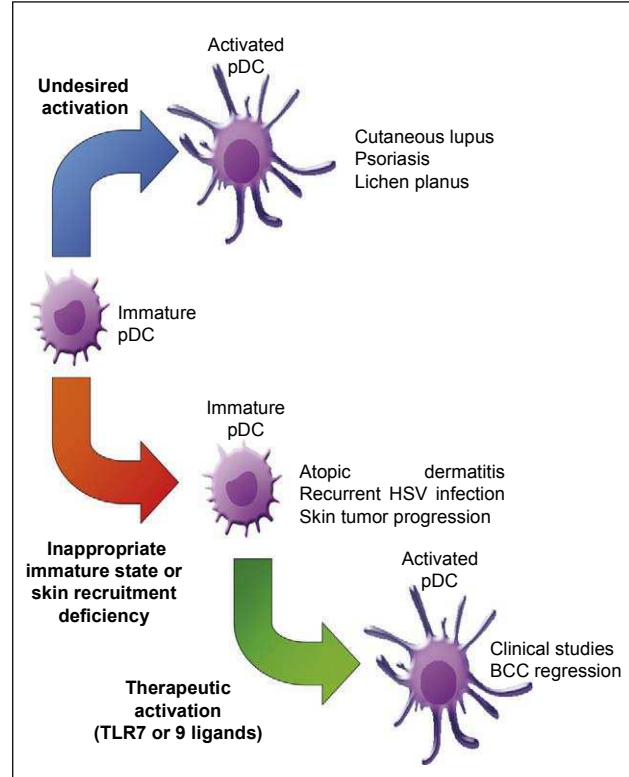


Figure 4. The role of PDC in various disease entities.

Acknowledgements. Financial support: none. Conflict of interest: none.

References

1. Banchereau J, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
2. Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol*, 2005 [réf à compléter].
3. Ebner S, et al. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol* 2004; 16: 877-87.
4. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1219-26.
5. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343: 37-49.
6. Randolph GJ, Ochoaño J, Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 293-316.
7. Vermi W, et al. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* 2005; 201: 509-15.
8. Kohrgruber N, et al. Plasmacytoid dendritic cell recruitment by immobilized CXCR3 ligands. *J Immunol* 2004; 173: 6592-602.
9. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-76.
10. Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo MG. CD4⁺ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 491-6.
11. Adler HS, Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur J Dermatol* 2007; 17: 476-91.
12. Gilliet M, Liu YJ. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol* 2002; 63: 1149-55.
13. Korn T, et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 485-517.

14. Kryczek I, et al. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 2009; 114: 357-9.
15. Hinrichs CS, et al. Type 17 CD8+ T cells display enhanced anti-tumor immunity. *Blood* 2009; 114: 596-9.
16. Eckert F, Schmid U. Identification of plasmacytoid T cells in lymphoid hyperplasia of the skin. *Arch Dermatol* 1989; 125: 1518-24.
17. Facchetti F, et al. Plasmacytoid T cells in a case of lymphocytic infiltration of skin. A component of the skin-associated lymphoid tissue? *J Pathol* 1988; 155: 295-300.
18. Toonstra J, van der Putte SC. Plasmacytoid monocytes in Jessner's lymphocytic infiltration of the skin. A valuable clue for the diagnosis. *Am J Dermatopathol* 1991; 13: 321-8.
19. Jahnsen FL, et al. Involvement of plasmacytoid dendritic cells in human diseases. *Hum Immunol* 2002; 63: 1201-5.
20. Farkas L, et al. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon-alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 2001; 159: 237-43.
21. Wenzel J, Tuting T. Identification of type I interferon-associated inflammation in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus opens up options for novel therapeutic approaches. *Exp Dermatol* 2007; 16: 454-63.
22. Wenzel J, et al. CXCR3-mediated recruitment of cytotoxic lymphocytes in lupus erythematosus profundus. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: 648-50.
23. Tian J, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007; 8: 487-96.
24. Obermoser G, et al. Recruitment of plasmacytoid dendritic cells in ultraviolet irradiation-induced lupus erythematosus tumidus. *Br J Dermatol* 2009; 160: 197-200.
25. Nickoloff BJ, Nestle FO. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2004; 113: 1664-75.
26. Nestle FO, et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 2005; 202: 135-43.
27. Lande R, et al. Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J Immunol* 2004; 173: 2815-24.
28. Lande R, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007; 449: 564-9.
29. Albanesi C, et al. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J Exp Med* 2009; 206: 249-58.
30. Gilliet M, et al. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch Dermatol* 2004; 140: 1490-5.
31. Hashizume H, et al. Compartmental imbalance and aberrant immune function of blood CD123+ (plasmacytoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in atopic dermatitis. *J Immunol* 2005; 174: 2396-403.
32. Wollenberg A, et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1096-102.
33. Novak N, Bieber T. The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53 (2 Suppl 2): S171-6.
34. De Vries HJ, et al. Lichen planus is associated with human herpesvirus type 7 replication and infiltration of plasmacytoid dendritic cells. *Br J Dermatol* 2006; 154: 361-4.
35. de Vries HJ, et al. Lichen planus remission is associated with a decrease of human herpes virus type 7 protein expression in plasmacytoid dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 2007; 299: 213-9.
36. Gerlini G, et al. Massive recruitment of type I interferon producing plasmacytoid dendritic cells in varicella skin lesions. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 507-9.
37. Donaghy H, et al. Role for plasmacytoid dendritic cells in the immune control of recurrent human herpes simplex virus infection. *J Virol* 2009; 83: 1952-61.
38. Bontkes HJ, et al. Plasmacytoid dendritic cells are present in cervical carcinoma and become activated by human papillomavirus type 16 virus-like particles. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 897-901.
39. Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Palucka AK. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death Differ* 2008; 15: 39-50.
40. Vermi W, et al. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 2003; 200: 255-68.
41. Salio M, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1052-62.
42. Bailly C, V.B. Diagnostic des tumeurs mélaniques cutanées. Enseignement post universitaire. International Academy of pathology French Division. 2005-2006.
43. Wenzel J, et al. Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 37-48.
44. Palamara F, et al. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol* 2004; 173: 3051-61.
45. Steinmann A, et al. Topical imiquimod treatment of a cutaneous melanoma metastasis. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 555-6.
46. Wolf IH, et al. Topical imiquimod in the treatment of metastatic melanoma to skin. *Arch Dermatol* 2003; 139: 273-6.
47. Zeitouni NC, Dawson K, Cheney RT. Treatment of cutaneous metastatic melanoma with imiquimod 5% cream and the pulsed-dye laser. *Br J Dermatol* 2005; 152: 376-7.
48. Naylor MF, et al. Treatment of lentigo maligna with topical imiquimod. *Br J Dermatol* 2003; 149 (Suppl 66): 66-70.
49. Balch CM, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3635-48.
50. Molenkamp BG, et al. Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2961-9.
51. Molenkamp BG, et al. Local administration of PF-3512676 CpG-B instigates tumor-specific CD8+ T-cell reactivity in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4532-42.
52. Urošević M, et al. Mechanisms underlying imiquimod-induced regression of basal cell carcinoma in vivo. *Arch Dermatol* 2003; 139: 1325-32.
53. Geisse J, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50: 722-33.
54. Sary G, et al. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2007; 204: 1441-51.
55. Hartmann E, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 6478-87.
56. Della Bella S, et al. Quantitative and functional defects of dendritic cells in classic Kaposi's sarcoma. *Clin Immunol* 2006; 119: 317-29.
57. Arpinati M, et al. Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 2003; 11: 345-56.
58. Fugier-Vivier JJ, et al. Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment. *J Exp Med* 2005; 201: 373-83.
59. Chaperot L, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2001; 97: 3210-7.
60. Jacob MC, et al. CD4+ CD56+ lineage negative malignancies: a new entity developed from malignant early plasmacytoid dendritic cells. *Haematologica* 2003; 88: 941-55.
61. Penven K, et al. Skin manifestations in CD4+, CD56+ malignancies. *Eur J Dermatol* 2003; 13: 161-5.
62. Bendriss-Vermare N, et al. In situ leukemic plasmacytoid dendritic cells pattern of chemokine receptors expression and in vitro migratory response. *Leukemia* 2004; 18: 1491-8.
63. Chaperot L, et al. Leukemic plasmacytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts. *Eur J Immunol* 2004; 34: 418-26.
64. Treilleux I, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7466-74.
65. Zou W, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001; 7: 1339-46.
66. Speiser DE, et al. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 2005; 115: 739-46.

DISCUSSION

Les TLR sont la cible de différentes molécules qui sont utilisées en tant qu'adjuvants vaccinaux ou dans le traitement d'infections virales et de cancers. Parmi elles, ce sont les agonistes des TLR7 et -9 qui ont montré la plus grande efficacité dans l'immunothérapie anticancéreuse. Il est donc crucial de connaître le mode d'action de ces molécules pour le développement et l'amélioration de cette nouvelle classe d'immunomodulateurs. De par leur expression prédominante des TLR7 et -9, les cellules dendritiques plasmocytoïdes sont au centre des investigations effectuées dans ce domaine.

Pour renforcer la compréhension des mécanismes d'action de tels traitements, nous avons étudié, dans ce manuscrit, les voies de signalisation engagées en aval des TLR7 et -9 chez les pDC en utilisant des agonistes induisant des profils d'activation différents. Nous avons également analysé le phénotype et l'activation des pDC issues de patients porteurs de mélanome dans le but de vérifier leur fonctionnalité dans l'optique d'un protocole immunothérapeutique à base de ligands de TLR.

I. Les voies de signalisation des TLR7 et -9

Les voies de signalisation des TLR7 et -9 dans les pDC humaines sont peu documentées. En effet, les méthodes d'analyse des facteurs jouant dans la transduction du signal utilisent souvent de grandes quantités de cellules ce qui limite les expérimentations à partir de pDC isolées du sang. De plus, la spécificité des inhibiteurs chimiques utilisés est souvent large. Par ailleurs, l'utilisation de séquences siRNA pour interférer avec l'expression d'un gène s'est parfois confrontée à l'activation inappropriée des pDC (Hornung et al. 2005). Ces obstacles dirigent donc les investigateurs à choisir préférentiellement le modèle murin dont les souris KO se révèlent être un outil indispensable. Cependant, toutes les données obtenues chez la souris ne sont

pas applicables à l'homme. En effet, la spécificité des ligands est parfois différente, c'est le cas des ARN simples brins ssRNA40 et ssPolyU qui sont des agonistes du TLR7 chez la souris et se fixent au TLR8 chez l'homme (Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004). Le profil d'expression des TLR est également différent, les mDC murines exprimant le TLR9 alors que leurs homologues humaines en sont dépourvues. Parallèlement, de nombreuses études sur les TLR utilisent des lignées cellulaires de type HEK transfectées avec des plasmides codant pour un TLR donné. Néanmoins, même si ces modèles ont permis de caractériser la biologie du TLR, ces cellules sont dépourvues des protéines spécifiques des pDC. C'est pourquoi l'utilisation de la lignée de pDC humaine GEN2.2 est un outil très intéressant pour l'étude des voies de signalisation induites par des ligands de TLR conduisant à l'activation de ces cellules.

Au moment où nous avons commencé cette étude, les données concernant les voies de signalisation des TLR7 et -9 qui ont été validées chez les pDC humaines rapportaient le recrutement du complexe protéique MyD88, IRAK4 et TRAF6 après fixation d'un ligand et l'induction de trois voies de signalisation conduisant à l'activation parfois différentielle de IRF7, NF- κ B et des MAPK. Cependant, la structure tridimensionnelle du ligand et sa stabilité en milieu acide semblent entraîner une activation différentielle de ces voies. En effet, les CpG de type A forment des agrégats et se fixent au TLR9 au niveau des endosomes précoces conduisant préférentiellement à la translocation du facteur IRF7 et donc à la transcription des gènes des IFN de type I (Figure D1). Au contraire, les CpG de type B, de par leur structure monomérique, se localisent dans les endosomes tardifs plus acides et activent plutôt la transcription des gènes codant pour les molécules de co-stimulation et les cytokines pro-inflammatoires via l'induction des voies de signalisation NF- κ B, des MAPK et de l'IRF5. Concernant les ligands de TLR7, aucune donnée ne décrit leur localisation subcellulaire. Néanmoins, les différents profils d'activation des pDC observés induits par ces ligands renseignent sur la manière possible dont les voies de signalisation sont engagées. En effet, nous avons vu dans les articles 1 et 2 que Flu, un virus

constitué d'une enveloppe et d'une capsid contenant 8 segments d'ARN, conduit principalement à la production des IFN de type I. Nous pouvons donc penser que le trafic intracellulaire de Flu est similaire à celui emprunté par les CpG de type A multimériques. Par ailleurs, la forte production de cytokines pro-inflammatoires, l'absence de translocation d'IRF7 dans le noyau et la faible induction d'IFN de type I entraînées par le CL097 laissent penser que cet analogue de guanine conserve une structure monomérique et se fixe au TLR7 au niveau des endosomes tardifs comme le fait le CpG B. De plus, il a été montré que la complexation des ligands synthétiques de TLR7 avec des lipides cationiques de type DOTAP permet d'induire une plus forte sécrétion d'IFN de type I par des PBMC (Heil et al. 2004). Ce changement de structure serait à l'origine de la modification du profil d'activation induit par ces agonistes.

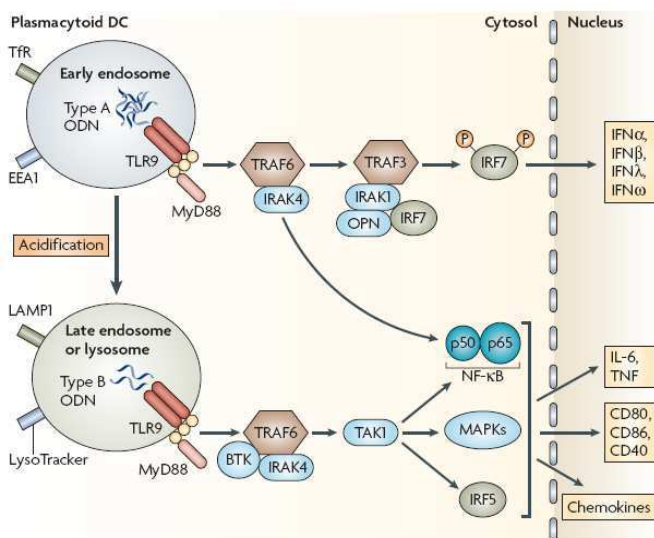


Figure D1. Activation différentielle des voies de signalisation du TLR9 par les CpG de type A et B. Les CpG de type A forment des agrégats et se fixent au TLR9 au niveau des endosomes précoces conduisant à la translocation du facteur IRF7 et à la transcription des gènes des IFN de type I. Les CpG B, eux, ont une structure monomérique, activent le TLR9 dans les endosomes tardifs et entraînent l'expression de molécules de co-stimulation et la production de cytokines pro-inflammatoires. D'après Gilliet *et al.*, Nat Rev Immunol, 2008.

De façon intéressante, nous avons observé dans l'article 2 que dans les pDC les cytokines IL-6 et IL-8 dont l'expression est dépendante des voies NF-κB et MAPK et l'IFN-α dont la transcription dépend de la translocation de l'IRF7 sont produits dès 3 h après stimulation des cellules quel que soit le ligand utilisé. Ceci suggère que la cinétique du trafic intracellulaire des différents ligands est la même quelle que soit la nature de l'endosome dans lequel ils se fixent au TLR. De plus, ces données montrent que l'engagement d'un TLR conduit à l'activation des différentes voies de signalisation de façon concomitante. Cependant, nous avons mis en évidence que la production

de TNF α dans les cellules GEN2.2 débute précocement dès 1 h après la stimulation TLR (Figure R4). Ceci peut être expliqué par la présence d'ARNm codant pour cette cytokine dans ces cellules dès T0 (Figure D2). Savoir si cette caractéristique est partagée par les pDC isolées du sang reste à définir. Cependant si cette donnée est confirmée, cela signifierait que la production de TNF α par les pDC activées par des ligands de TLR7 et -9 n'est pas seulement régulée au niveau transcriptionnel mais aussi au niveau traductionnel.

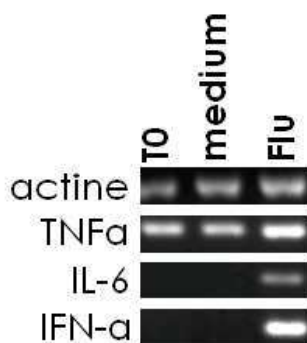


Figure D2. Expression des ARNm codant pour des cytokines par les cellules GEN2.2 à T0. L'expression des ARNm codant pour le TNF α , l'IL-6 et l'IFN- α a été analysée par RT-PCR sur des extraits de cellules GEN2.2 en culture (T0) et activées ou non par Flu pendant 24 h.

Outre les voies de signalisation classiques citées ci-dessus, nous démontrons dans les articles 1 et 2 qu'il existe une voie supplémentaire en aval des TLR7 et -9 qui entraîne l'activation du facteur STAT1 de façon indépendante de la voie de l'IFNAR. Cette voie conduit à l'expression rapide des gènes ISG dès 3-4 h après stimulation par des ligands de TLR7 et -9 (Figure R1, R4 et R6). La cinétique d'expression de ces gènes suggère que cette nouvelle voie de signalisation est également activée de façon concomitante aux voies classiques. Cependant, il semble que les voies de signalisation IRF7 et STAT1 ne soient pas toutes les deux engagées dans une même cellule puisque nous avons observé que les pDC sont soit simples positives IFN- α^+ soit simples positives CXCL10 $^+$ (Figure R5). Le mécanisme responsable d'une telle dichotomie dans le choix des voies de signalisation activées doit intervenir rapidement en aval des TLR7 et -9. Un des facteurs intervenant dans les phases précoces de la signalisation TLR7 et -9 est la PI3K. En effet, nous démontrons dans l'article 1 que l'activation de la voie STAT1 en aval du TLR7 dépend de l'activité de la PI3K. De plus, nous avons démontré que la PI3K joue un rôle dans la phosphorylation de la p38MAPK, une kinase de la voie de signalisation des MAPK. Enfin, il a déjà été montré que la translocation d'IRF7

après stimulation des pDC par des ligands de TLR9 est dépendante de la PI3K (Guiducci et al. 2008). Cette kinase est donc un facteur clé dans la signalisation TLR7 et -9 et son rôle doit être davantage défini.

Une autre inconnue dans la nouvelle voie de signalisation décrite est le mécanisme responsable de la phosphorylation de STAT1. Nous montrons dans l'article 1 que cette phosphorylation est dépendante de la p38MAPK. Cette kinase a été décrite comme pouvant phosphoryler STAT1 sur son résidu serine 727. Néanmoins, cette sérine kinase ne peut être directement responsable de la phosphorylation du résidu tyrosine 701 de STAT1 qui est détectée dans nos expérimentations. Nous avons alors analysé l'implication possible de tyrosines kinases connues de STAT1 comme JAK1 et JAK2 dans cette phosphorylation. Nous montrons alors dans l'article 2 que l'activation de STAT1 en aval de la stimulation des TLR7 et -9 est dépendante de l'activité de JAK1. Cette kinase est normalement associée à des récepteurs à cytokines et est activée après engagement d'un de ces récepteurs par son ligand. Cependant l'absence d'implication de facteurs extracellulaires dans l'activation de la voie STAT1 en aval des TLR7 et -9 nous a conduits à tester l'hypothèse d'un rôle joué par Pyk2. En effet, cette kinase qui est activée par la voie calcique est capable de phosphoryler JAK1. Cependant, même si l'inhibition de cette kinase altère la phosphorylation de STAT1 induite par les différents ligands de TLR7 et -9 (Figure R8), aucune induction d'une signalisation calcique n'a pu être détectée dans les cellules GEN2.2 (Figure R9). De plus, l'inhibition de CamKII, une kinase dépendante du calcium, n'a aucun effet sur l'activation de la voie STAT1 (Figure R9). Néanmoins, la sensibilité de la méthode de détection du calcium et la spécificité des inhibiteurs chimiques utilisés peuvent être remises en cause.

La question des acteurs signalétiques jouant entre la p38MAPK et STAT1 reste donc ouverte. C'est pourquoi, pour faciliter la définition de candidats potentiels, nous avons mis en place, en collaboration avec le laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes du CEA de Grenoble, une méthode d'analyse par spectrométrie de masse du phosphoprotéome des pDC stimulées par des ligands de TLR. Cette méthode, décrite en annexe 1,

permettra de décrire les événements précoces de phosphorylation existant en aval de la stimulation TLR de façon exhaustive. En parallèle, l'analyse par spectrométrie de masse des protéines associées à phospho-STAT1 isolées par immunoprécipitation devrait identifier la kinase responsable de la phosphorylation de STAT1 dans ce modèle. Ces résultats pourront être facilement validés en transfectant les cellules GEN2.2 avec des séquences shRNA ciblant les protéines candidates ou avec des inhibiteurs spécifiques s'ils existent.

Déterminer le mode d'activation des pDC en réponse aux stimulations des TLR7 et -9 c'est permettre de comprendre les mécanismes d'action des agonistes déjà utilisés en thérapeutique. Connaître les acteurs des voies de signalisation des TLR chez la pDC c'est définir de nouvelles cibles thérapeutiques pour activer ces cellules en contexte infectieux et tumoral et les inhiber en contexte d'allergie et d'autoimmunité.

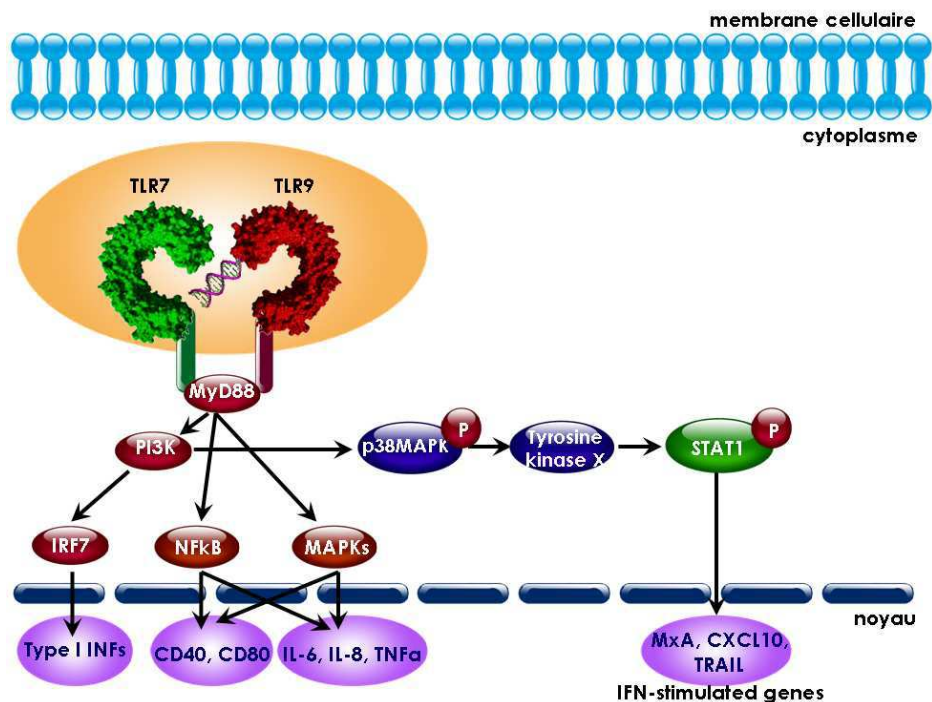


Figure D3. Schéma des voies de signalisation en aval des TLR7 et -9 dans les pDC.

L'engagement des TLR7 et -9 par des acides nucléiques au niveau des endosomes des pDC entraîne l'activation du facteur de signalisation IRF7 qui contrôle la transcription des gènes codant pour les IFN de type I et l'activation des voies NFκB et des MAPK qui contrôlent la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires et des molécules de co-stimulation. De façon concomitante, le facteur de transcription STAT1 est phosphorylé par une kinase inconnue de façon dépendante de la voie PI3K-p38MAPK. Cette activation permet d'induire la transcription rapide des gènes de réponse à l'IFN (ISG) comme MxA, CXCL10 et TRAIL en absence d'IFN de type I.

II. Les pDC de patients porteurs de mélanome

Les capacités à produire de grandes quantités d'IFN de type I et à cross-présenter des antigènes pour l'activation des lymphocytes T cytotoxiques font des pDC des cellules potentiellement clés dans l'immunité anti-tumorale. Cependant, plusieurs études ont associé la présence de pDC dans le cancer du sein et de l'ovaire au développement tumoral (Treilleux et al. 2004; Wei et al. 2005). De plus, il semblerait que les pDC soient activement recrutées sur le site tumoral puisque leur fréquence dans le sang de ces patientes peut être diminuée. Par ailleurs, ces cellules *in situ* présentent un profil immature et favoriseraient l'induction d'une tolérance immune vis-à-vis de la tumeur. Le micro-environnement tumoral pourrait donc contenir des facteurs capables d'inhiber l'activation des pDC, bloquant ainsi toute possibilité d'induction d'une réponse anti-tumorale efficace. Néanmoins, l'application locale d'agonistes de TLR7 comme l'imiquimod (R837) s'est montrée efficace dans le traitement de tumeurs cutanées localisées comme les carcinomes basocellulaires. Le mécanisme local d'action de l'imiquimod est cependant loin d'être élucidé. En effet, les pDC sont absentes de la peau saine avant traitement et les cellules de Langerhans et les cellules endothéliales n'expriment pas le TLR7 (Flacher et al. 2006; Fitzner et al. 2008). Il a été montré que les kératinocytes humains de l'épiderme expriment des TLR comme le TLR3 et -9, mais que l'expression du TLR7 est induite seulement après stimulation de ces cellules par des ARN double-brin (Kalali et al. 2008). Ces données suggèrent que les kératinocytes ne sont pas la cible directe des imidazoquinolines lorsque ceux-ci sont appliqués localement sur la peau. Par ailleurs, l'efficacité anti-tumorale de ce traitement semble être associée au recrutement de pDC et à leur activation, faisant de ces cellules les cibles privilégiées de ces molécules thérapeutiques (Stary et al. 2007). Notre laboratoire a d'ailleurs démontré que les pDC activées par des ligands de TLR7 sont capables d'induire l'apoptose de cellules tumorales via l'expression

de TRAIL(Chaperot, L. et al. 2006). Il reste désormais à comprendre par quel mécanisme ces agonistes de TLR7 peuvent induire le recrutement des pDC au niveau de la peau.

Un tel traitement reste cependant le plus souvent inefficace en contexte d'autres cancers cutanés comme le mélanome. Nous avons alors voulu caractériser le phénotype et la fonctionnalité des DC circulantes chez des patients porteurs de mélanome. Cette étude, présentée dans l'article 3, montre que la fréquence et le phénotype des DC du sang de patients atteints de mélanome ne sont pas altérés en comparaison avec les données obtenues sur les DC de sujets sains. De plus, l'augmentation de l'expression de CCR6 par les pDC de patients porteurs de mélanome et leur capacité de migration *in vitro* vers la chimiokine MIP3- α met en avant un mécanisme original possible de recrutement de ces cellules vers le site tumoral. Nous montrons d'ailleurs que les tumeurs de mélanome sont infiltrées par des pDC CCR6⁺. Par ailleurs, les pDC circulantes des patients maintiennent la capacité de s'activer en réponse à des ligands de TLR7 *in vitro* d'une manière similaire aux pDC de sujets sains. Néanmoins, cette caractéristique pourrait être différente *in situ* au contact des cellules tumorales. C'est pourquoi notre laboratoire a initié l'étude de l'impact des cellules de mélanome sur l'activation des pDC par des ligands de TLR7 et -9. Pour cela nous avons modélisé ces interactions cellulaires par des co-cultures mettant en présence les cellules GEN2.2 et des cellules de mélanome en contact direct ou en Transwell. Les résultats préliminaires de cette étude montrent que l'activation phénotypique et la production d'IFN- α par les pDC sont inhibées par la présence de cellules de mélanome. Par ailleurs, une production de VEGF, d'IL-10 et de TGF- β , des cytokines à propriétés immunorégulatrices, a été mesurée dans les surnageants de cellules de mélanome. De plus, la présence d'IL-10 inhibe la production d'IFN- α par les pDC de manière dose-dépendante. Ces résultats suggèrent que le mélanome produit un environnement cytokinique immunorégulateur axé sur l'inhibition de la production d'IFN de type I. La mise au point prochainement d'un modèle de souris immunodéficientes (NOD/SCID β 2m^{-/-}) reconstituées avec un système

immunitaire humain porteuses de mélanomes humains permettra de poursuivre l'analyse du recrutement des pDC et de leur fonctionnalité dans l'environnement tumoral *in vivo*.

Il est donc clair que les pDC peuvent jouer un rôle anti-tumoral puissant par l'acquisition de capacités cytotoxiques permettant une destruction spécifique des cellules tumorales et la production d'IFN de type I favorisant l'activation des autres effecteurs immuns. La mise en place d'une réponse adaptative est également cruciale pour obtenir une immunité anti-tumorale efficace contre les métastases. Les résultats obtenus dans les essais cliniques utilisant des mDC pour induire une immunité anti-tumorale sont néanmoins décevants. C'est pourquoi, la caractérisation de la polarisation des lymphocytes T induite par les pDC activées par différents ligands de TLR est un sujet en cours d'investigation dans notre laboratoire. Dans le contexte de mélanome, ces cellules sont donc des cibles de choix pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

REFERENCES

- A, A. G., S. K. Tying, et al.** (2009). "Beyond a decade of 5% imiquimod topical therapy." J Drugs Dermatol **8**(5): 467-74.
- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, et al.** (2007a). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." Nat Immunol **8**(9): 942-9.
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, et al.** (2007b). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." Nat Immunol **8**(6): 639-46.
- Adams, S., D. W. O'Neill, et al.** (2008). "Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant." J Immunol **181**(1): 776-84.
- Agnello, D., C. S. Lankford, et al.** (2003). "Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights." J Clin Immunol **23**(3): 147-61.
- Akira, S. and K. Takeda** (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
- Albanesi, C., C. Scarponi, et al.** (2009). "Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment." J Exp Med **206**(1): 249-58.
- Allman, D., M. Dalod, et al.** (2006). "Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation." Blood **108**(13): 4025-34.
- Aman, M. J., T. Treffer, et al.** (1996). "Interferon-alpha stimulates production of interleukin-10 in activated CD4+ T cells and monocytes." Blood **87**(11): 4731-6.
- Amjad, M., N. Abdel-Haq, et al.** (2008). "Decreased interferon-alpha production and impaired regulatory function of plasmacytoid dendritic cells induced by the hepatitis C virus NS 5 protein." Microbiol Immunol **52**(10): 499-507.
- Ank, N., M. B. Iversen, et al.** (2008). "An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity." J Immunol **180**(4): 2474-85.
- Annunziato, F., L. Cosmi, et al.** (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." J Exp Med **204**(8): 1849-61.

- Anthony, D. D., N. L. Yonkers, et al.** (2004). "Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection." J Immunol **172**(8): 4907-16.
- Appay, V., C. Jandus, et al.** (2006). "New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site." J Immunol **177**(3): 1670-8.
- Arpinati, M., G. Chirumbolo, et al.** (2003). "Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Transpl Immunol **11**(3-4): 345-56.
- Aspard, C., A. Pedroza-Gonzalez, et al.** (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, et al.** (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." Nat Immunol **2**(12): 1144-50.
- Bacchetta, R., S. Gregori, et al.** (2005). "CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function." Autoimmun Rev **4**(8): 491-6.
- Baechler, E. C., F. M. Batliwalla, et al.** (2003). "Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2610-5.
- Bailly C, V. B.** (2005-2006). "Diagnostic des tumeurs mélaniques cutanées. Enseignement post universitaire. International Academy of pathology French Division."
- Balch, C. M., A. C. Buzaid, et al.** (2001). "Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma." J Clin Oncol **19**(16): 3635-48.
- Banchereau, J., F. Briere, et al.** (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Barchet, W., M. Cella, et al.** (2002). "Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo." J Exp Med **195**(4): 507-16.
- Barchet, W., A. Krug, et al.** (2005). "Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways." Eur J Immunol **35**(1): 236-42.
- Barrat, F. J., T. Meeker, et al.** (2007). "Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody

production and amelioration of disease symptoms." Eur J Immunol **37**(12): 3582-6.

Barrat, F. J., T. Meeker, et al. (2005). "Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus." J Exp Med **202**(8): 1131-9.

Barton, G. M., J. C. Kagan, et al. (2006). "Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA." Nat Immunol **7**(1): 49-56.

Bave, U., M. Magnusson, et al. (2003). "Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG." J Immunol **171**(6): 3296-302.

Beckebaum, S., X. Zhang, et al. (2004). "Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets." Clin Cancer Res **10**(21): 7260-9.

Beignon, A. S., K. McKenna, et al. (2005). "Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions." J Clin Invest **115**(11): 3265-75.

Belot, A., P. Grosclaude, et al. (2008). "Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005." Rev Epidemiol Sante Publique **56**(3): 159-75.

Bendriss-Vermare, N., S. Burg, et al. (2005). "Virus overrides the propensity of human CD40L-activated plasmacytoid dendritic cells to produce Th2 mediators through synergistic induction of IFN- γ and Th1 chemokine production." J Leukoc Biol **78**(4): 954-66.

Bendriss-Vermare, N., L. Chaperot, et al. (2004a). "In situ leukemic plasmacytoid dendritic cells pattern of chemokine receptors expression and in vitro migratory response." Leukemia **18**: 1491-1498.

Bendriss-Vermare, N., L. Chaperot, et al. (2004b). "In situ leukemic plasmacytoid dendritic cells pattern of chemokine receptors expression and in vitro migratory response." Leukemia **18**(9): 1491-8.

Bengtsson, A. A., G. Sturfelt, et al. (2000). "Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies." Lupus **9**(9): 664-71.

- Benitez-Ribas, D., G. J. Adema, et al.** (2006). "Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc gamma RII-mediated uptake." J Exp Med **203**(7): 1629-35.
- Benitez-Ribas, D., P. Tacke, et al.** (2008). "Activation of human plasmacytoid dendritic cells by TLR9 impairs Fc gammaRII-mediated uptake of immune complexes and presentation by MHC class II." J Immunol **181**(8): 5219-24.
- Berghofer, B., G. Haley, et al.** (2007). "Natural and synthetic TLR7 ligands inhibit CpG-A- and CpG-C-oligodeoxynucleotide-induced IFN-alpha production." J Immunol **178**(7): 4072-9.
- Beutler, B.** (2004). "Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling." Nature **430**(6996): 257-63.
- Birmachu, W., R. M. Gleason, et al.** (2007). "Transcriptional networks in plasmacytoid dendritic cells stimulated with synthetic TLR 7 agonists." BMC Immunol **8**: 26.
- Bjorck, P., A. Beilhack, et al.** (2008). "Plasmacytoid dendritic cells take up opsonized antigen leading to CD4+ and CD8+ T cell activation in vivo." J Immunol **181**(6): 3811-7.
- Blanco, P., A. K. Palucka, et al.** (2001). "Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus." Science **294**(5546): 1540-3.
- Blasius, A. L., M. Cella, et al.** (2006). "Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12." Blood **107**(6): 2474-6.
- Blom, B., S. Ho, et al.** (2000). "Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(12): 1785-96.
- Boasso, A., A. W. Hardy, et al.** (2008). "HIV-induced type I interferon and tryptophan catabolism drive T cell dysfunction despite phenotypic activation." PLoS One **3**(8): e2961.
- Boasso, A., J. P. Herbeval, et al.** (2007). "HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells." Blood **109**(8): 3351-9.
- Bochtler, P., A. Kroger, et al.** (2008). "Type I IFN-induced, NKT cell-mediated negative control of CD8 T cell priming by dendritic cells." J Immunol **181**(3): 1633-43.

- Boissel, N., P. Rousselot, et al.** (2004). "Defective blood dendritic cells in chronic myeloid leukemia correlate with high plasmatic VEGF and are not normalized by imatinib mesylate." Leukemia **18**(10): 1656-61.
- Bonjardim, C. A., P. C. Ferreira, et al.** (2009). "Interferons: signaling, antiviral and viral evasion." Immunol Lett **122**(1): 1-11.
- Bontkes, H. J., J. J. Ruizendaal, et al.** (2005). "Plasmacytoid dendritic cells are present in cervical carcinoma and become activated by human papillomavirus type 16 virus-like particles." Gynecol Oncol **96**(3): 897-901.
- Boogaard, I., M. van Oosten, et al.** (2007). "Respiratory syncytial virus differentially activates murine myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Immunology **122**(1): 65-72.
- Boon, T., P. G. Coulie, et al.** (2006). "Human T cell responses against melanoma." Annu Rev Immunol **24**: 175-208.
- Borg, F. A. and D. A. Isenberg** (2007). "Syndromes and complications of interferon therapy." Curr Opin Rheumatol **19**(1): 61-6.
- Briere, F., N. Bendriss-Vermare, et al.** (2002). "Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol **63**(12): 1081-93.
- Brinkmann, M. M., E. Spooner, et al.** (2007). "The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling." J Cell Biol **177**(2): 265-75.
- Brown, K. N., V. Wijewardana, et al.** (2009). "Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection." PLoS Pathog **5**(5): e1000413.
- Cao, W., L. Bover, et al.** (2009). "Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction." J Exp Med **206**(7): 1603-14.
- Cao, W., S. Manicassamy, et al.** (2008). "Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway." Nat Immunol **9**(10): 1157-64.
- Cao, W., D. B. Rosen, et al.** (2006). "Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production." J Exp Med **203**(6): 1399-405.

- Cao, W., L. Zhang, et al.** (2007). "BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells." PLoS Biol **5**(10): e248.
- Cargill, M., S. J. Schrodi, et al.** (2007). "A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes." Am J Hum Genet **80**(2): 273-90.
- Casrouge, A., S. Y. Zhang, et al.** (2006). "Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency." Science **314**(5797): 308-12.
- Cella, M., F. Facchetti, et al.** (2000). "Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization." Nat Immunol **1**(4): 305-10.
- Cella, M., D. Jarrossay, et al.** (1999a). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.
- Cella, M., D. Jarrossay, et al.** (1999b). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**: 919-23.
- Chang, H. M., M. Paulson, et al.** (2004). "Induction of interferon-stimulated gene expression and antiviral responses require protein deacetylase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9578-83.
- Chaperot, L., N. Bendriss, et al.** (2001). "Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells." Blood **97**(10): 3210-7.
- Chaperot, L., A. Blum, et al.** (2006). "Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxicity of plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **176**(1): 248-55.
- Chaperot, L., A. Blum, et al.** (2006). "Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **176**(1): 248-55.
- Chaperot, L., I. Perrot, et al.** (2004). "Leukemic plasmacytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts." Eur J Immunol **34**(2): 418-26.
- Chehimi, J., D. E. Campbell, et al.** (2002). "Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals." J Immunol **168**(9): 4796-801.

- Chen, S. C., M. de Groot, et al.** (2009). "Expression of chemokine receptor CXCR3 by lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells in human psoriatic lesions." Arch Dermatol Res.
- Chen, W., S. Antonenko, et al.** (2004). "Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors." Blood **103**(7): 2547-53.
- Chen, W., X. Liang, et al.** (2008). "The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation." J Immunol **181**(8): 5396-404.
- Cicinnati, V. R., J. Kang, et al.** (2009). "Interferon-alpha Differentially Affects Homeostasis of Human Plasmacytoid and Myeloid Dendritic Cells." J Interferon Cytokine Res.
- Ciocon, D. H. and A. B. Kimball** (2007). "Psoriasis and psoriatic arthritis: separate or one and the same?" Br J Dermatol **157**(5): 850-60.
- Coccia, E. M., M. Severa, et al.** (2004). "Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells." Eur J Immunol **34**(3): 796-805.
- Coch, C., N. Busch, et al.** (2009). "Higher activation of TLR9 in plasmacytoid dendritic cells by microbial DNA compared with self-DNA based on CpG-specific recognition of phosphodiester DNA." J Leukoc Biol.
- Colina, R., M. Costa-Mattioli, et al.** (2008). "Translational control of the innate immune response through IRF-7." Nature **452**(7185): 323-8.
- Colonna, M., G. Trinchieri, et al.** (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-26.
- Conrad, C., S. Meller, et al.** (2009). "Plasmacytoid dendritic cells in the skin: to sense or not to sense nucleic acids." Semin Immunol **21**(3): 101-9.
- Cooper, C. L., J. B. Angel, et al.** (2008). "CPG 7909 adjuvant plus hepatitis B virus vaccination in HIV-infected adults achieves long-term seroprotection for up to 5 years." Clin Infect Dis **46**(8): 1310-4.
- Cooper, C. L., H. L. Davis, et al.** (2005). "CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults." Aids **19**(14): 1473-9.
- Cooper, C. L., H. L. Davis, et al.** (2004a). "CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in

- healthy adults: a double-blind phase I/II study." J Clin Immunol **24**(6): 693-701.
- Cooper, C. L., H. L. Davis, et al.** (2004b). "Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluarix influenza vaccine." Vaccine **22**(23-24): 3136-43.
- Corcoran, L., I. Ferrero, et al.** (2003). "The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells." J Immunol **170**(10): 4926-32.
- Costa-Mattioli, M. and N. Sonenberg** (2008). "RAPping production of type I interferon in pDCs through mTOR." Nat Immunol **9**(10): 1097-9.
- Cottrez, F. and H. Groux** (2004). "Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells." Transplantation **77**(1 Suppl): S12-5.
- Creticos, P. S., J. T. Schroeder, et al.** (2006). "Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis." N Engl J Med **355**(14): 1445-55.
- Crow, M. K.** (2007). "Type I interferon in systemic lupus erythematosus." Curr Top Microbiol Immunol **316**: 359-86.
- Curiel, T. J., P. Cheng, et al.** (2004). "Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer." Cancer Res **64**(16): 5535-8.
- Curreli, S., F. Romerio, et al.** (2002). "IFN-alpha2b increases interleukin-10 expression in primary activated human CD8+ T cells." J Interferon Cytokine Res **22**(12): 1167-73.
- Dalgaard, J., K. J. Beckstrom, et al.** (2005). "Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets." J Leukoc Biol **77**(5): 689-98.
- Dalod, M., T. Hamilton, et al.** (2003). "Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta." J Exp Med **197**(7): 885-98.
- Darnell, J. E., Jr.** (1997). "STATs and gene regulation." Science **277**(5332): 1630-5.
- David, M., E. Petricoin, 3rd, et al.** (1995). "Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins." Science **269**(5231): 1721-3.

- de Heer, H. J., H. Hammad, et al.** (2004). "Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen." J Exp Med **200**(1): 89-98.
- de Vries, H. J., M. B. Teunissen, et al.** (2007). "Lichen planus remission is associated with a decrease of human herpes virus type 7 protein expression in plasmacytoid dendritic cells." Arch Dermatol Res **299**(4): 213-9.
- De Vries, H. J., J. van Marle, et al.** (2006). "Lichen planus is associated with human herpesvirus type 7 replication and infiltration of plasmacytoid dendritic cells." Br J Dermatol **154**(2): 361-4.
- Decalf, J., S. Fernandes, et al.** (2007). "Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients." J Exp Med **204**(10): 2423-37.
- Del Corno, M., M. C. Gauzzi, et al.** (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 gp120 and other activation stimuli are highly effective in triggering alpha interferon and CC chemokine production in circulating plasmacytoid but not myeloid dendritic cells." J Virol **79**(19): 12597-601.
- Della Bella, S., A. Crosignani, et al.** (2007). "Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4+ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection." Immunology **121**(2): 283-92.
- Della Bella, S., M. Gennaro, et al.** (2003). "Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer." Br J Cancer **89**(8): 1463-72.
- Della Bella, S., S. Nicola, et al.** (2006). "Quantitative and functional defects of dendritic cells in classic Kaposi's sarcoma." Clin Immunol **119**(3): 317-29.
- Delves, P. J. and I. M. Roitt** (2000). "The immune system. First of two parts." N Engl J Med **343**(1): 37-49.
- DeNardo, D. G. and L. M. Coussens** (2007). "Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression." Breast Cancer Res **9**(4): 212.
- Deng, L., C. Wang, et al.** (2000). "Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain." Cell **103**(2): 351-61.

- Dhodapkar, M. V., K. M. Dhodapkar, et al.** (2008). "Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance." Cell Death Differ **15**(1): 39-50.
- Diacovo, T. G., A. L. Blasius, et al.** (2005). "Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes." J Exp Med **202**(5): 687-96.
- Diamantis, M. L., B. L. Bartlett, et al.** (2009). "Safety, efficacy & recurrence rates of imiquimod cream 5% for treatment of anogenital warts." Skin Therapy Lett **14**(5): 1-3, 5.
- Diana, J., T. Griseri, et al.** (2009). "NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner." Immunity **30**(2): 289-99.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, et al.** (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." Science **303**(5663): 1529-31.
- Donaghy, H., L. Bosnjak, et al.** (2009). "Role for plasmacytoid dendritic cells in the immune control of recurrent human herpes simplex virus infection." J Virol **83**(4): 1952-61.
- Donaghy, H., B. Gazzard, et al.** (2003). "Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1." Blood **101**(11): 4505-11.
- Dorschner, R. A., V. K. Pestonjamas, et al.** (2001). "Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus." J Invest Dermatol **117**(1): 91-7.
- Dreno, B.** (2004). "[Treatment of primary and regional melanoma]." Rev Prat **54**(11): 1203-9.
- Du, Z., Y. Shen, et al.** (2005). "Inhibition of IFN-alpha signaling by a PKC- and protein tyrosine phosphatase SHP-2-dependent pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(29): 10267-72.
- Duan, X. Z., M. Wang, et al.** (2004). "Decreased frequency and function of circulating plasmacytoid dendritic cells (pDC) in hepatitis B virus infected humans." J Clin Immunol **24**(6): 637-46.
- Duan, X. Z., H. Zhuang, et al.** (2005). "Decreased numbers and impaired function of circulating dendritic cell subsets in patients with chronic hepatitis B infection (R2)." J Gastroenterol Hepatol **20**(2): 234-42.

- Dubois, B., G. Joubert, et al.** (2009). "Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance." Gastroenterology **137**(3): 1019-28.
- Duhen, T., R. Geiger, et al.** (2009). "Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells." Nat Immunol **10**(8): 857-63.
- Dummer, R., A. Hauschild, et al.** (2008). "An Exploratory Study of Systemic Administration of the Toll-like Receptor-7 Agonist 852A in Patients with Refractory Metastatic Melanoma." Clin Cancer Res **14**(3): 856-64.
- Duramad, O., K. L. Fearon, et al.** (2005). "Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation." J Immunol **174**(9): 5193-200.
- Dzionic, A., A. Fuchs, et al.** (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol **165**(11): 6037-46.
- Dzionic, A., Y. Inagaki, et al.** (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions." Hum Immunol **63**(12): 1133-48.
- Dzionic, A., Y. Sohma, et al.** (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." J Exp Med **194**(12): 1823-34.
- Ebner, S., Z. Ehammer, et al.** (2004). "Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin." Int Immunol **16**(6): 877-87.
- Eckert, F. and U. Schmid** (1989). "Identification of plasmacytoid T cells in lymphoid hyperplasia of the skin." Arch Dermatol **125**(11): 1518-24.
- Eggermont, A. M., S. Suci, et al.** (2008). "Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial." Lancet **372**(9633): 117-26.
- Ellis, R. D., G. E. Mullen, et al.** (2009). "A Phase 1 study of the blood-stage malaria vaccine candidate AMA1-C1/Alhydrogel with CPG 7909, using two different formulations and dosing intervals." Vaccine **27**(31): 4104-9.
- Facchetti, F., C. De Wolf-Peeters, et al.** (1988). "Plasmacytoid T cells in a case of lymphocytic infiltration of skin. A component of the skin-associated lymphoid tissue?" J Pathol **155**(4): 295-300.

- Fallarino, F., C. Orabona, et al.** (2005). "Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells." Int Immunol **17**(11): 1429-38.
- Farkas, L., K. Beiske, et al.** (2001). "Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions." Am J Pathol **159**(1): 237-43.
- Farkas, L., E. O. Kvale, et al.** (2004). "Plasmacytoid dendritic cells activate allergen-specific TH2 memory cells: modulation by CpG oligodeoxynucleotides." J Allergy Clin Immunol **114**(2): 436-43.
- Feldman, S., D. Stein, et al.** (2001). "Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors." Clin Immunol **101**(2): 201-10.
- Fenner, J. E., R. Starr, et al.** (2006). "Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity." Nat Immunol **7**(1): 33-9.
- Feuillard, J., M. C. Jacob, et al.** (2002). "Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies." Blood **99**(5): 1556-63.
- Fiorentini, S., E. Riboldi, et al.** (2008). "HIV-1 matrix protein p17 induces human plasmacytoid dendritic cells to acquire a migratory immature cell phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3867-72.
- Fitzgerald-Bocarsly, P.** (1993). "Human natural interferon-alpha producing cells." Pharmacol Ther **60**(1): 39-62.
- Fitzner, N., S. Clauberg, et al.** (2008). "Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands." Clin Vaccine Immunol **15**(1): 138-46.
- Flacher, V., M. Bouschbacher, et al.** (2006). "Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria." J Immunol **177**(11): 7959-67.
- Fong, L., M. Mengozzi, et al.** (2002). "Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation." J Virol **76**(21): 11033-41.
- Fonteneau, J. F., M. Gilliet, et al.** (2003a). "Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity." Blood **2**: 2.

- Fonteneau, J. F., M. Gilliet, et al.** (2003b). "Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity." Blood **101**(9): 3520-6.
- Fonteneau, J. F., M. Larsson, et al.** (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells." J Virol **78**(10): 5223-32.
- Fuchs, A., M. Cella, et al.** (2005). "Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44." Blood **106**(6): 2076-82.
- Fugier-Vivier, I. J., F. Rezzoug, et al.** (2005). "Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment." J Exp Med **201**(3): 373-83.
- Fukui, R., S. Saitoh, et al.** (2009). "Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing." J Exp Med **206**(6): 1339-50.
- Gabrilovich, D.** (2004). "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects." Nat Rev Immunol **4**(12): 941-52.
- Ganguly, D., G. Chamilos, et al.** (2009). "Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8." J Exp Med.
- Gauvreau, G. M., E. M. Hessel, et al.** (2006). "Immunostimulatory sequences regulate interferon-inducible genes but not allergic airway responses." Am J Respir Crit Care Med **174**(1): 15-20.
- Geisse, J., I. Caro, et al.** (2004). "Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies." J Am Acad Dermatol **50**(5): 722-33.
- Gerlini, G., G. Mariotti, et al.** (2006). "Massive recruitment of type I interferon producing plasmacytoid dendritic cells in varicella skin lesions." J Invest Dermatol **126**(2): 507-9.
- Gerlini, G., C. Urso, et al.** (2007). "Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes." Clin Immunol **125**(2): 184-93.
- Gill, M. A., K. Long, et al.** (2008). "Differential recruitment of dendritic cells and monocytes to respiratory mucosal sites in children with influenza virus or respiratory syncytial virus infection." J Infect Dis **198**(11): 1667-76.

- Gill, M. A., A. K. Palucka, et al.** (2005). "Mobilization of plasmacytoid and myeloid dendritic cells to mucosal sites in children with respiratory syncytial virus and other viral respiratory infections." J Infect Dis **191**(7): 1105-15.
- Gilliet, M., C. Conrad, et al.** (2004). "Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors." Arch Dermatol **140**(12): 1490-5.
- Gilliet, M. and Y. J. Liu** (2002). "Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells." Hum Immunol **63**(12): 1149-55.
- Gobert, M., I. Treilleux, et al.** (2009). "Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome." Cancer Res **69**(5): 2000-9.
- Goubier, A., B. Dubois, et al.** (2008). "Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance." Immunity **29**(3): 464-75.
- Grage-Griebenow, E., S. Loseke, et al.** (2007). "Anti-BDCA-4 (neuropilin-1) antibody can suppress virus-induced IFN-alpha production of plasmacytoid dendritic cells." Immunol Cell Biol **85**(5): 383-90.
- Green, D. S., T. Lum, et al.** (2004). "IgG-derived Fc down-regulates virus-induced plasmacytoid dendritic cell (pDC) IFNalpha production." Cytokine **26**(5): 209-16.
- Grouard, G., M. C. Risoan, et al.** (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.
- Gu, M., P. M. Hine, et al.** (2007). "Increased potency of BioThrax anthrax vaccine with the addition of the C-class CpG oligonucleotide adjuvant CPG 10109." Vaccine **25**(3): 526-34.
- Guerrero-Plata, A., A. Casola, et al.** (2006). "Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus." Am J Respir Cell Mol Biol **34**(3): 320-9.
- Guiducci, C., C. Ghirelli, et al.** (2008). "PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid predendritic cells in response to TLR activation." J Exp Med **205**(2): 315-22.

- Guiducci, C., G. Ott, et al.** (2006). "Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation." J Exp Med **203**(8): 1999-2008.
- Gurney, K. B., A. D. Colantonio, et al.** (2004). "Endogenous IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells exerts an antiviral effect on thymic HIV-1 infection." J Immunol **173**(12): 7269-76.
- Haas, T., J. Metzger, et al.** (2008). "The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation." Immunity **28**(3): 315-23.
- Hacker, H., V. Redecke, et al.** (2006). "Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6." Nature **439**(7073): 204-7.
- Hadeiba, H., T. Sato, et al.** (2008). "CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease." Nat Immunol **9**(11): 1253-60.
- Halperin, S. A., S. Dobson, et al.** (2006). "Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults." Vaccine **24**(1): 20-6.
- Hardy, A. W., D. R. Graham, et al.** (2007). "HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(44): 17453-8.
- Hartmann, E., H. Graefe, et al.** (2006). "Analysis of plasmacytoid and myeloid dendritic cells in nasal epithelium." Clin Vaccine Immunol **13**(11): 1278-86.
- Hartmann, E., B. Wollenberg, et al.** (2003). "Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer." Cancer Res **63**(19): 6478-87.
- Hartmann, G., J. Battiany, et al.** (2003). "Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **33**(6): 1633-41.
- Hasan, L., L. Mazzucchelli, et al.** (2006). "Function of liver activation-regulated chemokine/CC chemokine ligand 20 is differently affected by cathepsin B and cathepsin D processing." J Immunol **176**(11): 6512-22.
- Hashizume, H., T. Horibe, et al.** (2005). "Compartmental imbalance and aberrant immune function of blood CD123+ (plasmacytoid) and

- CD11c+ (myeloid) dendritic cells in atopic dermatitis." J Immunol **174**(4): 2396-403.
- Heil, F., P. Ahmad-Nejad, et al.** (2003). "The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily." Eur J Immunol **33**(11): 2987-97.
- Heil, F., H. Hemmi, et al.** (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science **303**(5663): 1526-9.
- Hemmi, H., T. Kaisho, et al.** (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, et al.** (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.
- Heystek, H. C., B. den Drijver, et al.** (2003). "Type I IFNs differentially modulate IL-12p70 production by human dendritic cells depending on the maturation status of the cells and counteract IFN-gamma-mediated signaling." Clin Immunol **107**(3): 170-7.
- Hoefel, G., A. C. Ripoche, et al.** (2007). "Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells." Immunity **27**(3): 481-92.
- Hofmann, M. A., C. Kors, et al.** (2008). "Phase 1 evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma." J Immunother **31**(5): 520-7.
- Hollox, E. J., U. Huffmeier, et al.** (2008). "Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number." Nat Genet **40**(1): 23-5.
- Honda, K., Y. Ohba, et al.** (2005a). "Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction." Nature **434**(7036): 1035-40.
- Honda, K., S. Sakaguchi, et al.** (2003). "Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10872-7.
- Honda, K., H. Yanai, et al.** (2004). "Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(43): 15416-21.
- Honda, K., H. Yanai, et al.** (2005b). "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses." Nature **434**(7034): 772-7.

- Hong, H. S., N. Bhatnagar, et al.** (2009). "Exogenous HIV-1 Vpr disrupts IFN-alpha response by plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and subsequent pDC/NK interplay." Immunol Lett **125**(2): 100-4.
- Hong, J. and Z. J. Gong** (2008). "Human plasmacytoid dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection induce the generation of a higher proportion of CD4(+) and CD25(+) regulatory T cells compared with healthy patients." Hepatol Res **38**(4): 362-73.
- Hornung, V., J. Ellegast, et al.** (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." Science **314**(5801): 994-7.
- Hornung, V., M. Guenther-Biller, et al.** (2005). "Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." Nat Med **11**(3): 263-70.
- Hornung, V., J. Schlender, et al.** (2004). "Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus." J Immunol **173**(10): 5935-43.
- Hoshino, K., T. Sugiyama, et al.** (2006). "I κ B kinase- α is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9." Nature **440**(7086): 949-53.
- Huang, A. Y., P. Golumbek, et al.** (1994). "Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens." Science **264**(5161): 961-5.
- Huang, M., F. Qian, et al.** (2002). "Chromatin-remodelling factor BRG1 selectively activates a subset of interferon-alpha-inducible genes." Nat Cell Biol **4**(10): 774-81.
- Inglefield, J. R., C. D. Dumitru, et al.** (2008). "TLR7 agonist 852A inhibition of tumor cell proliferation is dependent on plasmacytoid dendritic cells and type I IFN." J Interferon Cytokine Res **28**(4): 253-63.
- Iparraguirre, A., J. W. Tobias, et al.** (2008). "Two distinct activation states of plasmacytoid dendritic cells induced by influenza virus and CpG 1826 oligonucleotide." J Leukoc Biol **83**(3): 610-20.
- Ishikawa, F., H. Niiro, et al.** (2007). "The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways." Blood **110**(10): 3591-660.
- Ishikawa, F., M. Yasukawa, et al.** (2005). "Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice." Blood **106**(5): 1565-73.

- Ito, T., R. Amakawa, et al.** (2002). "Roles of toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance." Hum Immunol **63**(12): 1120-5.
- Ito, T., R. Amakawa, et al.** (2004). "Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs." J Immunol **172**(7): 4253-9.
- Ito, T., H. Kanzler, et al.** (2006). "Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells." Blood **107**(6): 2423-31.
- Ivashkiv, L. B.** (2008). "A signal-switch hypothesis for cross-regulation of cytokine and TLR signalling pathways." Nat Rev Immunol **8**(10): 816-22.
- Ivashkiv, L. B.** (2009). "Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors." Nat Immunol **10**(4): 340-7.
- Iwakoshi, N. N., M. Pypaert, et al.** (2007). "The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells." J Exp Med **204**(10): 2267-75.
- Jacob, M. C., L. Chaperot, et al.** (2003). "CD4+ CD56+ lineage negative malignancies: a new entity developed from malignant early plasmacytoid dendritic cells." Haematologica **88**(8): 941-55.
- Jaehn, P. S., K. S. Zaenker, et al.** (2008). "Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon." Eur J Immunol **38**(7): 1822-32.
- Jahnsen, F. L., L. Farkas, et al.** (2002). "Involvement of plasmacytoid dendritic cells in human diseases." Hum Immunol **63**(12): 1201-5.
- Jahnsen, F. L., E. Gran, et al.** (2004). "Human nasal mucosa contains antigen-presenting cells of strikingly different functional phenotypes." Am J Respir Cell Mol Biol **30**(1): 31-7.
- Jahnsen, F. L., F. Lund-Johansen, et al.** (2000). "Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123^{high}) dendritic cells in human nasal allergy." J Immunol **165**(7): 4062-8.
- Jarrossay, D., G. Napolitani, et al.** (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**(11): 3388-93.
- Jefferies, C. A., S. Doyle, et al.** (2003). "Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in

nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4." J Biol Chem **278**(28): 26258-64.

Jego, G., A. K. Palucka, et al. (2003). "Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6." Immunity **19**(2): 225-34.

Jin, O., S. Kavikondala, et al. (2008). "Systemic lupus erythematosus patients have increased number of circulating plasmacytoid dendritic cells, but decreased myeloid dendritic cells with deficient CD83 expression." Lupus **17**(7): 654-62.

Ju, X., M. Zenke, et al. (2008). "CD300a/c regulate type I interferon and TNF-alpha secretion by human plasmacytoid dendritic cells stimulated with TLR7 and TLR9 ligands." Blood **112**(4): 1184-94.

Jurk, M., F. Heil, et al. (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." Nat Immunol **3**(6): 499.

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

Kadowaki, N., S. Ho, et al. (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.

Kalali, B. N., G. Kollisch, et al. (2008). "Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling." J Immunol **181**(4): 2694-704.

Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, et al. (2007). "Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease." Immunity **27**(4): 549-59.

Kanno, Y., B. Z. Levi, et al. (2005). "Immune cell-specific amplification of interferon signaling by the IRF-4/8-PU.1 complex." J Interferon Cytokine Res **25**(12): 770-9.

Kanto, T., M. Inoue, et al. (2004). "Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection." J Infect Dis **190**(11): 1919-26.

Kanzler, H., F. J. Barrat, et al. (2007). "Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists." Nat Med **13**(5): 552-9.

- Kariko, K., M. Buckstein, et al.** (2005). "Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA." Immunity **23**(2): 165-75.
- Karsunky, H., M. Merad, et al.** (2003). "Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo." J Exp Med **198**(2): 305-13.
- Karsunky, H., M. Merad, et al.** (2005). "Developmental origin of interferon-alpha-producing dendritic cells from hematopoietic precursors." Exp Hematol **33**(2): 173-81.
- Kato, H., S. Sato, et al.** (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." Immunity **23**(1): 19-28.
- Katsoulidis, E., Y. Li, et al.** (2005). "The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction." J Interferon Cytokine Res **25**(12): 749-56.
- Kaur, S., S. Uddin, et al.** (2005). "The PI3' kinase pathway in interferon signaling." J Interferon Cytokine Res **25**(12): 780-7.
- Kawai, T. and S. Akira** (2006). "Innate immune recognition of viral infection." Nat Immunol **7**(2): 131-7.
- Kawai, T. and S. Akira** (2007). "TLR signaling." Semin Immunol **19**(1): 24-32.
- Kawai, T., S. Sato, et al.** (2004). "Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6." Nat Immunol **5**(10): 1061-8.
- Kawai, T., K. Takahashi, et al.** (2005). "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction." Nat Immunol **6**(10): 981-8.
- Keir, M. E., C. A. Stoddart, et al.** (2002). "IFN-alpha secretion by type 2 predendritic cells up-regulates MHC class I in the HIV-1-infected thymus." J Immunol **168**(1): 325-31.
- Kemp, T. J., B. D. Elzey, et al.** (2003). "Plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-alpha induces TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2L-mediated antitumor activity by human monocytes following CpG oligodeoxynucleotide stimulation." J Immunol **171**(1): 212-8.
- Kerkmann, M., L. T. Costa, et al.** (2005). "Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells." J Biol Chem **280**(9): 8086-93.

- Kerkmann, M., S. Rothenfusser, et al.** (2003). "Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **170**(9): 4465-74.
- Kim, Y. M., M. M. Brinkmann, et al.** (2008). "UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes." Nature **452**(7184): 234-8.
- Knaan-Shanzer, S., I. van der Velde-van Dijke, et al.** (2008). "Phenotypic and functional reversal within the early human hematopoietic compartment." Stem Cells **26**(12): 3210-7.
- Kohrgruber, N., M. Groger, et al.** (2004). "Plasmacytoid dendritic cell recruitment by immobilized CXCR3 ligands." J Immunol **173**(11): 6592-602.
- Kool, M. and B. N. Lambrecht** (2007). "Dendritic cells in asthma and COPD: opportunities for drug development." Curr Opin Immunol **19**(6): 701-10.
- Kool, M., M. van Nimwegen, et al.** (2009). "An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation." J Immunol **183**(2): 1074-82.
- Korn, T., E. Bettelli, et al.** (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Kotenko, S. V., G. Gallagher, et al.** (2003). "IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex." Nat Immunol **4**(1): 69-77.
- Kotenko, S. V. and J. A. Langer** (2004). "Full house: 12 receptors for 27 cytokines." Int Immunopharmacol **4**(5): 593-608.
- Krieg, A. M.** (2008). "Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer." Oncogene **27**(2): 161-7.
- Krug, A., G. D. Luker, et al.** (2004). "Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9." Blood **103**(4): 1433-7.
- Krug, A., S. Rothenfusser, et al.** (2001a). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**(7): 2154-63.
- Krug, A., A. Towarowski, et al.** (2001b). "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." Eur J Immunol **31**(10): 3026-37.

- Krug, A., R. Veeraswamy, et al.** (2003). "Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells." J Exp Med **197**(7): 899-906.
- Kumagai, Y., H. Kumar, et al.** (2009). "Cutting Edge: TLR-Dependent viral recognition along with type I IFN positive feedback signaling masks the requirement of viral replication for IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **182**(7): 3960-4.
- Kurts, C., H. Kosaka, et al.** (1997). "Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells." J Exp Med **186**(2): 239-45.
- Kuwana, M.** (2002). "Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets." Hum Immunol **63**(12): 1156-63.
- Kwok, S. K., J. Y. Lee, et al.** (2008). "Dysfunctional interferon-alpha production by peripheral plasmacytoid dendritic cells upon Toll-like receptor-9 stimulation in patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Res Ther **10**(2): R29.
- Lai, W. K., S. M. Curbishley, et al.** (2007). "Hepatitis C is associated with perturbation of intrahepatic myeloid and plasmacytoid dendritic cell function." J Hepatol **47**(3): 338-47.
- Lambrecht, B. N., M. De Veerman, et al.** (2000). "Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation." J Clin Invest **106**(4): 551-9.
- Lande, R., E. Giacomini, et al.** (2004). "Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis." J Immunol **173**(4): 2815-24.
- Lande, R., J. Gregorio, et al.** (2007). "Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide." Nature **449**(7162): 564-9.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al.** (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-40.
- Laouar, Y., T. Welte, et al.** (2003). "STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation." Immunity **19**(6): 903-12.
- Latz, E., A. Schoenemeyer, et al.** (2004). "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome." Nat Immunol **5**(2): 190-8.

- Latz, E., A. Verma, et al.** (2007). "Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9." Nat Immunol **8**(7): 772-9.
- Lee, H. K., J. M. Lund, et al.** (2007). "Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells." Science **315**(5817): 1398-401.
- Lee, J. R., R. R. Dalton, et al.** (2003). "Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma." Lab Invest **83**(10): 1457-66.
- Lehmann, C., J. M. Harper, et al.** (2008). "Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients." J Acquir Immune Defic Syndr **48**(5): 522-30.
- Lekmine, F., S. Uddin, et al.** (2003). "Activation of the p70 S6 kinase and phosphorylation of the 4E-BP1 repressor of mRNA translation by type I interferons." J Biol Chem **278**(30): 27772-80.
- Lemke, G. and C. V. Rothlin** (2008). "Immunobiology of the TAM receptors." Nat Rev Immunol **8**(5): 327-36.
- Lenahan, C. and D. Avigan** (2006). "Dendritic cell defects in patients with cancer: mechanisms and significance." Breast Cancer Res **8**(1): 101.
- Lewkowich, I. P., S. Lajoie, et al.** (2008). "Allergen uptake, activation, and IL-23 production by pulmonary myeloid DCs drives airway hyperresponsiveness in asthma-susceptible mice." PLoS One **3**(12): e3879.
- Liang, H., R. S. Russell, et al.** (2009). "Differential effects of hepatitis C virus JFH1 on human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." J Virol **83**(11): 5693-707.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, et al.** (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." J Exp Med **203**(10): 2271-9.
- Liu, C., Y. Lou, et al.** (2008). "Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice." J Clin Invest **118**(3): 1165-75.
- Liu, Y. J., H. Kanzler, et al.** (2001). "Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation." Nat Immunol **2**(7): 585-9.
- Lombardi, V., L. Van Overtvelt, et al.** (2009). "Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of IL-10, IFN-gamma, and IL-17A by naive CD4+ T cells." J Immunol **182**(6): 3372-9.

- Longman, R. S., A. H. Talal, et al.** (2005). "Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C." J Infect Dis **192**(3): 497-503.
- Lore, K., A. Smed-Sorensen, et al.** (2005). "Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells." J Exp Med **201**(12): 2023-33.
- Lovgren, T., M. L. Eloranta, et al.** (2004). "Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG." Arthritis Rheum **50**(6): 1861-72.
- Lowes, M. A., A. M. Bowcock, et al.** (2007). "Pathogenesis and therapy of psoriasis." Nature **445**(7130): 866-73.
- Lu, Q. and G. Lemke** (2001). "Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family." Science **293**(5528): 306-11.
- Luft, T., K. C. Pang, et al.** (1998). "Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells." J Immunol **161**(4): 1947-53.
- Lui, G., O. Manches, et al.** (2009). "Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells." PLoS One **4**(9): e7111.
- Lund, J., A. Sato, et al.** (2003). "Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **198**(3): 513-20.
- Lund, J. M., L. Alexopoulou, et al.** (2004). "Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5598-603.
- Mami, N. B., M. Mohty, et al.** (2004). "Blood dendritic cells in patients with acute lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol **126**(1): 77-80.
- Manches, O., D. Munn, et al.** (2008). "HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism." J Clin Invest **118**(10): 3431-9.
- Mandl, J. N., A. P. Barry, et al.** (2008). "Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections." Nat Med **14**(10): 1077-87.
- Manegold, C., D. Gravenor, et al.** (2008). "Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in

combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **26**(24): 3979-86.

Manfra, D. J., S. C. Chen, et al. (2003). "Conditional expression of murine Flt3 ligand leads to expansion of multiple dendritic cell subsets in peripheral blood and tissues of transgenic mice." J Immunol **170**(6): 2843-52.

Manigold, T. and V. Racanelli (2007). "T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies." Lancet Infect Dis **7**(12): 804-13.

Marcantonio, M., M. Trost, et al. (2008). "Combined enzymatic and data mining approaches for comprehensive phosphoproteome analyses: application to cell signaling events of interferon-gamma-stimulated macrophages." Mol Cell Proteomics **7**(4): 645-60.

Marrack, P., J. Kappler, et al. (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." J Exp Med **189**(3): 521-30.

Martinelli, E., C. Cicala, et al. (2007). "HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3396-401.

Martinson, J. A., A. Roman-Gonzalez, et al. (2007). "Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor (TLR) ligands." Cell Immunol **250**(1-2): 75-84.

Masten, B. J., G. K. Olson, et al. (2006). "Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung." J Immunol **177**(11): 7784-93.

Matsui, T., J. E. Connolly, et al. (2009). "CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions." J Immunol **182**(11): 6815-23.

Matsumoto, M., K. Funami, et al. (2003). "Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells." J Immunol **171**(6): 3154-62.

McHutchison, J. G., B. R. Bacon, et al. (2007). "Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus." Hepatology **46**(5): 1341-9.

Means, T. K., E. Latz, et al. (2005). "Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9." J Clin Invest **115**(2): 407-17.

- Megjugorac, N. J., H. A. Young, et al.** (2004). "Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells." J Leukoc Biol **75**(3): 504-14.
- Meier, A., J. J. Chang, et al.** (2009). "Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1." Nat Med **15**(8): 955-9.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn** (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol **4**(10): 762-74.
- Merad, M. and M. G. Manz** (2009). "Dendritic cell homeostasis." Blood **113**(15): 3418-27.
- Meyer-Wentrup, F., D. Benitez-Ribas, et al.** (2008). "Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production." Blood **111**(8): 4245-53.
- Mohty, M., D. Isnardon, et al.** (2002). "Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34+/CD38-primitive haematopoietic progenitors." Br J Haematol **119**(1): 115-8.
- Molenkamp, B. G., B. J. Sluijter, et al.** (2008). "Local administration of PF-3512676 CpG-B instigates tumor-specific CD8+ T-cell reactivity in melanoma patients." Clin Cancer Res **14**(14): 4532-42.
- Molenkamp, B. G., P. A. van Leeuwen, et al.** (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.
- Montoya, M. C., D. Sancho, et al.** (2002). "Cell adhesion and polarity during immune interactions." Immunol Rev **186**: 68-82.
- Moseman, E. A., X. Liang, et al.** (2004). "Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **173**(7): 4433-42.
- Movassagh, M., A. Spatz, et al.** (2004). "Selective accumulation of mature DC-Lamp+ dendritic cells in tumor sites is associated with efficient T-cell-mediated antitumor response and control of metastatic dissemination in melanoma." Cancer Res **64**(6): 2192-8.
- Mullen, G. E., R. D. Ellis, et al.** (2008). "Phase 1 trial of AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG 7909: an asexual blood-stage vaccine for Plasmodium falciparum malaria." PLoS One **3**(8): e2940.

- Munn, D. H., M. D. Sharma, et al.** (2004). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes." J Clin Invest **114**(2): 280-90.
- Nagasawa, M., H. Schmidlin, et al.** (2008). "Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B." Eur J Immunol **38**(9): 2389-400.
- Naik, S. H., P. Sathe, et al.** (2007). "Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo." Nat Immunol **8**(11): 1217-26.
- Nair, J. S., C. J. DaFonseca, et al.** (2002). "Requirement of Ca²⁺ and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 5971-6.
- Nascimbeni, M., L. Perie, et al.** (2009). "Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression." Blood **113**(24): 6112-9.
- Naylor, M. F., N. Crowson, et al.** (2003). "Treatment of lentigo maligna with topical imiquimod." Br J Dermatol **149 Suppl 66**: 66-70.
- Nestle, F. O., C. Conrad, et al.** (2005). "Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production." J Exp Med **202**(1): 135-43.
- Nguyen, H., C. V. Ramana, et al.** (2001). "Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression." J Biol Chem **276**(36): 33361-8.
- Nickoloff, B. J. and F. O. Nestle** (2004). "Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities." J Clin Invest **113**(12): 1664-75.
- Novak, N., J. P. Allam, et al.** (2004). "Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis." J Allergy Clin Immunol **114**(2): 364-70.
- Novak, N. and T. Bieber** (2005). "The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis." J Am Acad Dermatol **53**(2 Suppl 2): S171-6.
- Novak, N., C. F. Yu, et al.** (2008). "Toll-like receptor 7 agonists and skin." Drug News Perspect **21**(3): 158-65.

- Nusinzon, I. and C. M. Horvath** (2003). "Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 14742-7.
- O'Doherty, U., M. Peng, et al.** (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." Immunology **82**: 487-93.
- Obermoser, G., P. Schwingshackl, et al.** (2009). "Recruitment of plasmacytoid dendritic cells in ultraviolet irradiation-induced lupus erythematosus tumidus." Br J Dermatol **160**(1): 197-200.
- Ochando, J. C., C. Homma, et al.** (2006). "Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts." Nat Immunol **7**(6): 652-62.
- Oda, Y., K. Huang, et al.** (1999). "Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6591-6.
- Ong, P. Y., T. Ohtake, et al.** (2002). "Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis." N Engl J Med **347**(15): 1151-60.
- Ong, S. E., B. Blagoev, et al.** (2002). "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." Mol Cell Proteomics **1**(5): 376-86.
- Osawa, Y., S. Iho, et al.** (2006). "Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **177**(7): 4841-52.
- Pacanowski, J., S. Kahi, et al.** (2001). "Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection." Blood **98**(10): 3016-21.
- Palamara, F., S. Meindl, et al.** (2004). "Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod." J Immunol **173**(5): 3051-61.
- Paquette, R. L., N. C. Hsu, et al.** (1998). "Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells." J Leukoc Biol **64**(3): 358-67.
- Parcina, M., C. Wendt, et al.** (2008). "Staphylococcus aureus-induced plasmacytoid dendritic cell activation is based on an IgG-mediated memory response." J Immunol **181**(6): 3823-33.

- Pascale, F., V. Contreras, et al.** (2008). "Plasmacytoid dendritic cells migrate in afferent skin lymph." J Immunol **180**(9): 5963-72.
- Pashenkov, M., G. Goess, et al.** (2006). "Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma." J Clin Oncol **24**(36): 5716-24.
- Penna, G., S. Sozzani, et al.** (2001). "Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **167**(4): 1862-6.
- Perrot, I., D. Blanchard, et al.** (2007). "Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage." J Immunol **178**(5): 2763-9.
- Perussia, B., V. Fanning, et al.** (1985). "A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses." Nat Immun Cell Growth Regul **4**(3): 120-37.
- Pestka, S., C. D. Krause, et al.** (2004). "Interleukin-10 and related cytokines and receptors." Annu Rev Immunol **22**: 929-79.
- Petrilli, V., C. Dostert, et al.** (2007). "The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity." Curr Opin Immunol **19**(6): 615-22.
- Phipps-Yonas, H., J. Seto, et al.** (2008). "Interferon-beta pretreatment of conventional and plasmacytoid human dendritic cells enhances their activation by influenza virus." PLoS Pathog **4**(10): e1000193.
- Piccioli, D., C. Sarmiceli, et al.** (2009). "Human plasmacytoid dendritic cells are unresponsive to bacterial stimulation and require a novel type of cooperation with myeloid dendritic cells for maturation." Blood **113**(18): 4232-9.
- Piccioli, D., S. Tavarini, et al.** (2005). "Comparable functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors." J Hepatol **42**(1): 61-7.
- Pichlmair, A., O. Schulz, et al.** (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." Science **314**(5801): 997-1001.
- Pinzon-Charry, A., C. S. Ho, et al.** (2007). "Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer." Br J Cancer **97**(9): 1251-9.

- Platanias, L. C. and E. N. Fish** (1999). "Signaling pathways activated by interferons." Exp Hematol **27**(11): 1583-92.
- Pockros, P. J., D. Guyader, et al.** (2007). "Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies." J Hepatol **47**(2): 174-82.
- Poeck, H., M. Wagner, et al.** (2004). "Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help." Blood **103**(8): 3058-64.
- Pulendran, B., J. Banchereau, et al.** (2000). "Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo." J Immunol **165**(1): 566-72.
- Randolph, G. J., J. Ochando, et al.** (2008). "Migration of dendritic cell subsets and their precursors." Annu Rev Immunol **26**: 293-316.
- Rathinam, C., R. Geffers, et al.** (2005). "The transcriptional repressor Gfi1 controls STAT3-dependent dendritic cell development and function." Immunity **22**(6): 717-28.
- Ratta, M., F. Fagnoni, et al.** (2002). "Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6." Blood **100**(1): 230-7.
- Reis e Sousa, C.** (2007). "Immunology. Eating in to avoid infection." Science **315**(5817): 1376-7.
- Rissoan, M. C., T. Duhon, et al.** (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, et al.** (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." Science **283**(5405): 1183-6.
- Rock, J., E. Schneider, et al.** (2007). "CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCgamma2." Eur J Immunol **37**(12): 3564-75.
- Rock, K. L. and L. Shen** (2005). "Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance." Immunol Rev **207**: 166-83.
- Ronnblom, L., M. L. Eloranta, et al.** (2006). "The type I interferon system in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **54**(2): 408-20.

- Ronnblom, L. and V. Pascual** (2008). "The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells." Lupus **17**(5): 394-9.
- Rosenberg, S. A. and M. E. Dudley** (2004). "Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **101 Suppl 2**: 14639-45.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et al.** (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." Nat Med **10**(9): 909-15.
- Rothenfusser, S., E. Tuma, et al.** (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG." Hum Immunol **63**(12): 1111-9.
- Rothlin, C. V., S. Ghosh, et al.** (2007). "TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response." Cell **131**(6): 1124-36.
- Sadaka, C., M. A. Marloie-Provost, et al.** (2009). "Developmental regulation of MHC II expression and transport in human plasmacytoid-derived dendritic cells." Blood **113**(10): 2127-35.
- Salio, M., M. Cella, et al.** (2003). "Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions." Eur J Immunol **33**(4): 1052-62.
- Salio, M., M. J. Palmowski, et al.** (2004). "CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens." J Exp Med **199**(4): 567-79.
- Sanchez, F. O., M. V. Linga Reddy, et al.** (2008). "IFN-regulatory factor 5 gene variants interact with the class I MHC locus in the Swedish psoriasis population." J Invest Dermatol **128**(7): 1704-9.
- Sandgren, S., A. Wittrup, et al.** (2004). "The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis." J Biol Chem **279**(17): 17951-6.
- Santini, S. M., C. Lapenta, et al.** (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.
- Sapozhnikov, A., J. A. Fischer, et al.** (2007). "Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **204**(8): 1923-33.
- Sasaki, A., H. Yasukawa, et al.** (1999). "Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-

- terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain." Genes Cells **4**(6): 339-51.
- Schlecht, G., S. Garcia, et al.** (2004). "Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation." Blood **104**(6): 1808-15.
- Schmidt, B., I. Scott, et al.** (2004). "Low-level HIV infection of plasmacytoid dendritic cells: onset of cytopathic effects and cell death after PDC maturation." Virology **329**(2): 280-8.
- Schnurr, M., Q. Chen, et al.** (2005). "Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery." Blood **105**(6): 2465-72.
- Schon, M. P. and M. Schon** (2008). "TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy." Oncogene **27**(2): 190-9.
- Schotte, R., M. Nagasawa, et al.** (2004). "The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development." J Exp Med **200**(11): 1503-9.
- Schroeder, J. T., A. P. Bieneman, et al.** (2005). "TLR9- and FcepsilonRI-mediated responses oppose one another in plasmacytoid dendritic cells by down-regulating receptor expression." J Immunol **175**(9): 5724-31.
- Schroeder, J. T., K. L. Chichester, et al.** (2008). "Toll-like receptor 9 suppression in plasmacytoid dendritic cells after IgE-dependent activation is mediated by autocrine TNF-alpha." J Allergy Clin Immunol **121**(2): 486-91.
- Schulze, H. J., B. Cribier, et al.** (2005). "Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe." Br J Dermatol **152**(5): 939-47.
- Senti, G., P. Johansen, et al.** (2009). "Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial." Clin Exp Allergy **39**(4): 562-70.
- Shao, Z., A. S. Bharadwaj, et al.** (2009). "Fms-like tyrosine kinase 3 ligand increases a lung DC subset with regulatory properties in allergic airway inflammation." J Allergy Clin Immunol **123**(4): 917-924 e2.
- Sharma, M. D., B. Baban, et al.** (2007). "Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase." J Clin Invest **117**(9): 2570-82.

- Sharma, M. D., D. Y. Hou, et al.** (2009). "Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes." Blood **113**(24): 6102-11.
- Sheppard, P., W. Kindsvogel, et al.** (2003). "IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R." Nat Immunol **4**(1): 63-8.
- Shigematsu, H., B. Reizis, et al.** (2004). "Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin." Immunity **21**(1): 43-53.
- Shin, A., T. Toy, et al.** (2008). "P2Y receptor signaling regulates phenotype and IFN-alpha secretion of human plasmacytoid dendritic cells." Blood **111**(6): 3062-9.
- Shinohara, M. L., L. Lu, et al.** (2006). "Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells." Nat Immunol **7**(5): 498-506.
- Shodell, M., K. Shah, et al.** (2003). "Circulating human plasmacytoid dendritic cells are highly sensitive to corticosteroid administration." Lupus **12**(3): 222-30.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al.** (1999a). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al.** (1999b). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**: 1835-7.
- Sigal, L. J., S. Crotty, et al.** (1999). "Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen." Nature **398**(6722): 77-80.
- Sigurdsson, S., G. Nordmark, et al.** (2005). "Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus." Am J Hum Genet **76**(3): 528-37.
- Simons, F. E., Y. Shikishima, et al.** (2004). "Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA." J Allergy Clin Immunol **113**(6): 1144-51.
- Smed-Sorensen, A., K. Lore, et al.** (2005). "Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells." J Virol **79**(14): 8861-9.
- Smit, J. J., D. M. Lindell, et al.** (2008). "The balance between plasmacytoid DC versus conventional DC determines pulmonary immunity to virus infections." PLoS One **3**(3): e1720.

- Smit, J. J., B. D. Rudd, et al.** (2006). "Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus." J Exp Med **203**(5): 1153-9.
- Sochorova, K., R. Horvath, et al.** (2007). "Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF-alpha production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia." Blood **109**(6): 2553-6.
- Soumelis, V. and Y. J. Liu** (2006). "From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation." Eur J Immunol **36**(9): 2286-92.
- Soumelis, V., I. Scott, et al.** (2001). "Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients." Blood **98**(4): 906-12.
- Sousa, L. P., B. S. Brasil, et al.** (2005). "Characterization of alpha-enolase as an interferon-alpha 2 alpha 1 regulated gene." Front Biosci **10**: 2534-47.
- Speiser, D. E., D. Lienard, et al.** (2005). "Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909." J Clin Invest **115**(3): 739-46.
- Spits, H., F. Couwenberg, et al.** (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.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, et al.** (1998). "How cells respond to interferons." Annu Rev Biochem **67**: 227-64.
- Stary, G., C. Bangert, et al.** (2007). "Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells." J Exp Med **204**(6): 1441-51.
- Stary, G., I. Klein, et al.** (2009). "Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T cell apoptosis in HIV-1 viremic patients." Blood.
- Steinman, R. M.** (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol **9**: 271-96.
- Steinmann, A., J. O. Funk, et al.** (2000). "Topical imiquimod treatment of a cutaneous melanoma metastasis." J Am Acad Dermatol **43**(3): 555-6.
- Stetson, D. B. and R. Medzhitov** (2006). "Antiviral defense: interferons and beyond." J Exp Med **203**(8): 1837-41.

- Tabeta, K., K. Hoebe, et al.** (2006). "The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9." Nat Immunol **7**(2): 156-64.
- Tacken, P. J., I. J. de Vries, et al.** (2007). "Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting." Nat Rev Immunol **7**(10): 790-802.
- Takaoka, A., H. Yanai, et al.** (2005). "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors." Nature **434**(7030): 243-9.
- Takeda, K., T. Kaisho, et al.** (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.
- Takeshita, F., C. A. Leifer, et al.** (2001). "Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells." J Immunol **167**(7): 3555-8.
- Tang, X., J. S. Gao, et al.** (2007). "Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor." Cell **131**(1): 93-105.
- Taniguchi, T. and A. Takaoka** (2002). "The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors." Curr Opin Immunol **14**(1): 111-6.
- Tavakoli, S., I. Mederacke, et al.** (2008). "Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection." Clin Exp Immunol **151**(1): 61-70.
- Theofilopoulos, A. N., R. Baccala, et al.** (2005). "Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity." Annu Rev Immunol **23**: 307-36.
- Tian, J., A. M. Avalos, et al.** (2007). "Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE." Nat Immunol **8**(5): 487-96.
- Toonstra, J. and S. C. van der Putte** (1991). "Plasmacytoid monocytes in Jessner's lymphocytic infiltration of the skin. A valuable clue for the diagnosis." Am J Dermatopathol **13**(4): 321-8.
- Treilleux, I., J. Y. Blay, et al.** (2004). "Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer." Clin Cancer Res **10**(22): 7466-74.
- Trinchieri, G., D. Santoli, et al.** (1978). "Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation." J Exp Med **147**(5): 1299-1313.

- Tsujimura, H., T. Tamura, et al.** (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.
- Tversky, J. R., T. V. Le, et al.** (2008). "Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-alpha via Toll-like receptor 9." Clin Exp Allergy **38**(5): 781-8.
- Uddin, S., E. N. Fish, et al.** (1997). "Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase by IFN-alpha." J Immunol **158**(5): 2390-7.
- Uddin, S., F. Lekmine, et al.** (2000). "The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins." J Biol Chem **275**(36): 27634-40.
- Uddin, S., A. Sassano, et al.** (2002). "Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727." J Biol Chem **277**(17): 14408-16.
- Uematsu, S., S. Sato, et al.** (2005). "Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction." J Exp Med **201**(6): 915-23.
- Ulsenheimer, A., J. T. Gerlach, et al.** (2005). "Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection." Hepatology **41**(3): 643-51.
- Urosevic, M., R. Dummer, et al.** (2005). "Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid predendritic cells following imiquimod treatment." J Natl Cancer Inst **97**(15): 1143-53.
- Urosevic, M., T. Maier, et al.** (2003). "Mechanisms underlying imiquimod-induced regression of basal cell carcinoma in vivo." Arch Dermatol **139**(10): 1325-32.
- Valladeau, J. and S. Saeland** (2005). "Cutaneous dendritic cells." Semin Immunol.
- van Boxel-Dezaire, A. H., M. R. Rani, et al.** (2006). "Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons." Immunity **25**(3): 361-72.
- van Crujisen, H., K. Hoekman, et al.** (2007). "Defective differentiation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in advanced cancer patients is not normalized by tyrosine kinase inhibition of the vascular endothelial growth factor receptor." Clin Dev Immunol **2007**: 17315.

- van der Molen, R. G., D. Sprengers, et al.** (2004). "Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B." Hepatology **40**(3): 738-46.
- Vanbervliet, B., N. Bendriss-Vermare, et al.** (2003). "The Inducible CXCR3 Ligands Control Plasmacytoid Dendritic Cell Responsiveness to the Constitutive Chemokine Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1)/CXCL12." J Exp Med **198**(5): 823-30.
- Vasku, V., K. Kankova, et al.** (2002). "Gene polymorphisms (G82S, 1704G/T, 2184A/G and 2245G/A) of the receptor of advanced glycation end products (RAGE) in plaque psoriasis." Arch Dermatol Res **294**(3): 127-30.
- Vermi, W., R. Bonecchi, et al.** (2003). "Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas." J Pathol **200**(2): 255-68.
- Vermi, W., E. Riboldi, et al.** (2005). "Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin." J Exp Med **201**(4): 509-15.
- Vollenweider, R. and K. Lennert** (1983). "Plasmacytoid T-cell clusters in non-specific lymphadenitis." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **44**(1): 1-14.
- Wagner, H.** (2008). "The sweetness of the DNA backbone drives Toll-like receptor 9." Curr Opin Immunol **20**(4): 396-400.
- Wang, C., L. Deng, et al.** (2001). "TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK." Nature **412**(6844): 346-51.
- Wang, H., N. Peters, et al.** (2006). "Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection." J Immunol **177**(9): 6263-70.
- Wang, J. P., P. Liu, et al.** (2006). "Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition." J Immunol **177**(10): 7114-21.
- Wang, L., I. Tassioulas, et al.** (2008). "'Tuning' of type I interferon-induced Jak-STAT1 signaling by calcium-dependent kinases in macrophages." Nat Immunol **9**(2): 186-93.
- Watarai, H., E. Sekine, et al.** (2008). "PDC-TREM, a plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, is responsible for augmented production of type I interferon." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 2993-8.

- Wei, S., I. Kryczek, et al.** (2005). "Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma." Cancer Res **65**(12): 5020-6.
- Wen, Z., Z. Zhong, et al.** (1995). "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." Cell **82**(2): 241-50.
- Wendland, M., N. Czeloth, et al.** (2007). "CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(15): 6347-52.
- Wenzel, J., B. Bekisch, et al.** (2005). "Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions." Am J Clin Pathol **124**(1): 37-48.
- Wenzel, J., J. Proelss, et al.** (2007). "CXCR3-mediated recruitment of cytotoxic lymphocytes in lupus erythematosus profundus." J Am Acad Dermatol **56**(4): 648-50.
- Wenzel, J. and T. Tuting** (2007). "Identification of type I interferon-associated inflammation in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus opens up options for novel therapeutic approaches." Exp Dermatol **16**(5): 454-63.
- Wilson, N. J., K. Boniface, et al.** (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." Nat Immunol **8**(9): 950-7.
- Wolf, I. H., K. Kodama, et al.** (2007). "Nature of inflammatory infiltrate in superficial cutaneous malignancies during topical imiquimod treatment." Am J Dermatopathol **29**(3): 237-41.
- Wolf, I. H., J. Smolle, et al.** (2003). "Topical imiquimod in the treatment of metastatic melanoma to skin." Arch Dermatol **139**(3): 273-6.
- Wollenberg, A., M. Wagner, et al.** (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases." J Invest Dermatol **119**(5): 1096-102.
- Woltman, A. M., J. W. de Fijter, et al.** (2007). "Quantification of dendritic cell subsets in human renal tissue under normal and pathological conditions." Kidney Int **71**(10): 1001-8.
- Workman, C. J., A. L. Szymczak-Workman, et al.** (2009). "The development and function of regulatory T cells." Cell Mol Life Sci **66**(16): 2603-22.

- Xie, Q., H. C. Shen, et al.** (2009). "Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9." Microbes Infect **11**(4): 515-23.
- Xu, Y., Y. Hu, et al.** (2009). "HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells." Mol Immunol **46**(13): 2640-6.
- Yanai, H., H. M. Chen, et al.** (2007). "Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3402-7.
- Yang, C. H., A. Murti, et al.** (2001). "Interferon alpha /beta promotes cell survival by activating nuclear factor kappa B through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt." J Biol Chem **276**(17): 13756-61.
- Yang, G. X., Z. X. Lian, et al.** (2005). "Plasmacytoid dendritic cells of different origins have distinct characteristics and function: studies of lymphoid progenitors versus myeloid progenitors." J Immunol **175**(11): 7281-7.
- Yang, K., A. Puel, et al.** (2005). "Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses." Immunity **23**(5): 465-78.
- Yang, Y., B. Liu, et al.** (2007). "Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages." Immunity **26**(2): 215-26.
- Yao, Y., L. Richman, et al.** (2009). "Neutralization of interferon-alpha/beta-inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **60**(6): 1785-96.
- Yoneyama, H., K. Matsuno, et al.** (2004). "Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules." Int Immunol **16**(7): 915-28.
- Yoneyama, M. and T. Fujita** (2007). "Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity." J Biol Chem **282**(21): 15315-8.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al.** (2005). "Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity." J Immunol **175**(5): 2851-8.
- Yonezawa, A., R. Morita, et al.** (2003). "Natural alpha interferon-producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into dendritic cells." J Virol **77**(6): 3777-84.

- Yonkers, N. L., B. Rodriguez, et al.** (2007). "TLR ligand-dependent activation of naive CD4 T cells by plasmacytoid dendritic cells is impaired in hepatitis C virus infection." J Immunol **178**(7): 4436-44.
- Yoshimura, A., T. Naka, et al.** (2007). "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation." Nat Rev Immunol **7**(6): 454-65.
- Yrlid, U., C. D. Jenkins, et al.** (2006). "Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions." J Immunol **176**(7): 4155-62.
- Zasloff, M.** (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-95.
- Zeitouni, N. C., K. Dawson, et al.** (2005). "Treatment of cutaneous metastatic melanoma with imiquimod 5% cream and the pulsed-dye laser." Br J Dermatol **152**(2): 376-7.
- Zhang, J., A. Raper, et al.** (2006). "Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors." Blood **107**(9): 3600-8.
- Zhang, Y. L., Y. J. Guo, et al.** (2009). "Hepatitis C virus single-stranded RNA induces innate immunity via Toll-like receptor 7." J Hepatol **51**(1): 29-38.
- Zhang, Z., Z. S. Zou, et al.** (2008). "Severe dendritic cell perturbation is actively involved in the pathogenesis of acute-on-chronic hepatitis B liver failure." J Hepatol **49**(3): 396-406.
- Zhou, Z., O. J. Hamming, et al.** (2007). "Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases." J Virol **81**(14): 7749-58.
- Zou, W.** (2005). "Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance." Nat Rev Cancer **5**(4): 263-74.
- Zou, W., V. Machelon, et al.** (2001a). "Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells." Nat Med **7**(12): 1339-46.
- Zou, W., V. Machelon, et al.** (2001b). "Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells." Nat Med **7**(12): 1339-46.

Résumé

Plusieurs stratégies thérapeutiques innovantes dans le traitement des maladies infectieuses, des allergies et du cancer ciblent les Toll-like receptor (TLR) par l'utilisation d'agonistes synthétiques. En effet, l'activation de ces récepteurs est le signal initial pour l'induction d'une réponse immune. Actuellement, les agonistes thérapeutiques les plus utilisés ciblent principalement les TLR7 et -9. Ces TLR sont exprimés de façon prédominante par les cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDC). Les pDC sont des cellules clés dans la réponse immune précoce puisqu'elles produisent de grandes quantités d'IFN de type I et peuvent cross-présenter des antigènes en contexte d'infection virale, permettant de faire le lien entre l'immunité innée et adaptative. Ces cellules sont donc un sujet d'investigation pour le développement de nouvelles immunothérapies anticancéreuses. L'efficacité des traitements ciblant le TLR7 a été démontrée comme impliquant des pDC activées. Cependant, les voies de signalisation exactes induites après engagement du TLR7 et conduisant à l'activation des pDC humaines restent à être déterminées.

Pour cela, nous avons étudié dans une première partie les voies de signalisation induites par un ligand naturel, le virus *influenza* (Flu), et un ligand synthétique de TLR7, le CL097, dans les pDC humaines isolées du sang et dans une lignée de pDC, les cellules GEN2.2. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation conduisant à l'expression rapide des gènes induits par l'IFN (ISG) et ce de façon indépendante de l'IFN de type I.

Dans une deuxième partie, nous avons déterminé si cette voie particulière peut être induite dans les pDC après stimulation du TLR9 par deux types de CpG. Nous nous sommes également intéressés à identifier les facteurs signalétiques responsables de l'activation de cette voie de signalisation en ciblant sur un rôle possible du calcium.

Enfin, nous avons caractérisé les cellules dendritiques circulantes chez les patients porteurs de mélanome afin de savoir si ces cellules sont mobilisables et activables dans l'optique de la mise en place d'une immunothérapie utilisant des agonistes de TLR.

Ces travaux renforcent l'idée que les pDC constituent une cible de choix pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques anti-tumorales.

Abstract

Several innovative therapeutic strategies for the treatment of infectious diseases, allergies and cancer target Toll-like receptors (TLR) by using synthetic agonists. Indeed, activation of these receptors is the initial signal for the immune response induction. The most effective therapeutic agonists currently used mainly target TLR7 and -9. These TLRs are predominantly expressed by plasmacytoid dendritic cells (pDC). pDCs are key cells in the early immune response since they produce huge amounts of type I IFN and are able to cross-present antigens during viral infection, linking innate and adaptive immunity. Therefore, these cells constitute a subject of investigation for new antitumor immunotherapies development. The efficacy of treatments targeting TLR7 was demonstrated to involve activated pDCs. However, exact signaling pathways induced after TLR7 triggering and leading to the activation of human pDCs remain to be determined.

Hence, we studied in a first part the signaling pathways induced by a natural ligand, *influenza* virus (Flu), and a synthetic TLR7 ligand, CL097, in human blood isolated pDCs and in the pDC cell line, GEN2.2 cells. This study allowed us to define a new signaling pathway leading to the rapid expression of IFN-stimulated genes (ISG) in the absence of type I IFN.

In a second part, we determined if this particular pathway could be induced in TLR9-activated pDCs using two kinds of CpGs. We were also interested to identify the signaling factors responsible for the activation of this pathway by targeting the potential role of calcium.

Finally, we characterized circulating dendritic cells in melanoma patients in order to verify that these cells are mobilizable and activable for TLR agonists based immunotherapy.

This work reinforces the idea that pDCs constitute a target of choice for developing new antitumor therapeutic approaches.