



HAL
open science

Caractérisation des altérations fonctionnelles des cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes dans les tumeurs mammaires murines

Isabelle Le Mercier

► To cite this version:

Isabelle Le Mercier. Caractérisation des altérations fonctionnelles des cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes dans les tumeurs mammaires murines. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10229 . tel-00876658

HAL Id: tel-00876658

<https://theses.hal.science/tel-00876658v1>

Submitted on 25 Oct 2013

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 03 Décembre 2009

par

Mademoiselle Isabelle LE MERCIER

**Caractérisation des altérations fonctionnelles
des cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes
dans les tumeurs mammaires murines**

Directeur de thèse : Dr Christophe CAUX

JURY : Pr Jean-François NICOLAS, Président
Pr Claude LECLERC, Rapporteur
Pr Bernard BONNOTTE, Rapporteur
Dr Muriel MOSER, Examinatrice
Dr Christophe CAUX, Directeur de thèse
Dr Isabelle PUISIEUX, Co-encadrante

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux Prs Claude Leclerc et Bernard Bonnotte pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également le Dr Muriel Moser et le Pr Jean-François Nicolas pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse. C'est un grand honneur pour moi d'être jugée par vous.

Je te remercie vivement Christophe, pour m'avoir dirigée et pour ton implication majeure sur ce projet. Merci d'avoir fait en sorte qu'il puisse exister. J'ai beaucoup appris sous ta direction et je t'en remercie. Merci aussi pour ta grande disponibilité pour répondre à mes questions, et pour toutes tes suggestions et corrections.

Je tiens ensuite à remercier Isabelle (Puisieux) pour m'avoir encadrée. Merci de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail. Merci de m'avoir transmis ton expérience des manipulations animales. Grâce à toi je suis d'ailleurs devenue ambidextre. Merci aussi pour ta bonne humeur et ton sens de l'humour.

Merci à Dominique pour tous ces moments passés ensemble dans notre salle de culture « Souris ». Tu m'as initiée à la culture cellulaire et je pense que c'est un grand avantage étant donné tes mains vertes qui ne laissent pousser que les cellules mais pas les champignons. Merci aussi pour ta patience et ta grande qualité d'écoute.

Nadège, merci pour ton implication sur le projet et pour tout le temps que tu as passé à relire mon manuscrit. Merci aussi pour les verres du samedi soir pendant la rédaction. Il faudrait continuer cette habitude mais dans un autre contexte maintenant.

Merci à Isabelle (Durand) pour les longs après-midi passés à discuter de tout pendant que le trieur triait 13 270 pauvres petites pDC.

Je remercie aussi toute « l'équipe Colette ». Votre arrivée dans l'équipe a apporté beaucoup de bonnes rigolades. Merci à Colette d'abord, d'être restée à côté de moi de longues soirées pendant la rédaction. Merci pour les gâteaux, les bonbons et les discussions horoscopes. Merci à Jenny pour ton humour et aussi pour tes nombreux renseignements sur les Lectines.

Merci à Nathalie pour tes conseils sur le projet pendant toute la durée de ma thèse et pour ta relecture plus qu'attentive du manuscrit. Merci à Christine pour être toujours partante pour aller prendre un verre et pour tes phrases cultes. Merci d'avoir négocié pour moi avec ton grand ami Mr BD. Merci enfin à toutes les deux pour vos réponses à mes (nombreuses) (très nombreuses) questions sur tout, tout le temps.

Merci à Cathy, Martine, Adeline et Anne Claire pour les discussions pendant les pauses café, à Laurent pour sa super formation radioac (tu vois que tu peux être patient parfois !). Merci à Anthony pour m'avoir expliqué trois fois comment faire une table des matières. D'ailleurs je n'ai toujours pas pris de notes mais je crois que cette fois je m'en souviens.

Merci à ceux qui sont partis mais qui ont été présents ces dernières années, notamment Séverine, Mickael et Sarah.

Hiba, une petite pensée pour toi pour la fin de ta rédaction. Grâce à toi, je me suis sentie un peu moins seule. Courage c'est bientôt fini !

Vanja, Flo et Nadège, merci à vous pour les pauses et les discussions NK pendant les centri. Un grand merci à Estelle même si tu es vraiment trop nulle au Bowling. Par contre je ne te dis pas merci pour les batailles d'eau et de glaçons parce que sinon, ils sauront que je n'y étais pas par hasard.

J'aimerais finir par un grand remerciement collectif pour toute l'équipe Cytokines et Cancers. Vous m'avez tous soutenu pendant ce moment stressant de la rédaction mais aussi tout au long de ma thèse. Cela fait maintenant un certain nombre d'années passées ensemble et il m'est difficile d'imaginer vous quitter un jour. Nous avons vécu deux déménagements de l'équipe, de nombreuses arrivées, moins de départs heureusement, beaucoup de déménagements personnels (grâce à Martine), quelques mariages (et PACS) et beaucoup de naissances. J'espère que l'on aura encore l'occasion de fêter ensemble toutes les bonnes choses qui pourront vous arriver.

Je tiens à remercier très profondément mes parents et mes sœurs pour votre soutien et votre affection depuis toujours. L'objectif de vous rendre fiers de moi a probablement beaucoup contribué à ce que l'on arrive à ce moment.

Merci à mes copines !!! Audrey et Hélène pour les après-midi peinture, les soirées entre filles et pour votre compréhension quand j'étais un peu débordée.

Enfin je finis par toi Nat. Il me sera difficile de recenser toutes les raisons que j'ai de te remercier. Les plus importantes sont ta présence auprès de moi tous les jours, ton soutien permanent, du matin jusqu'au soir et ta grande qualité de toujours trouver de nouvelles choses à découvrir. Je ne serai jamais arrivée jusqu'à ce moment sans toi et je te dédie donc ce manuscrit. J'ai hâte maintenant de redevenir disponible à 100% pour continuer à profiter de la vie avec toi qui est toujours pleine de surprises.

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE ET OBJECTIFS SPECIFIQUES	3
INTRODUCTION.....	5
CHAPITRE I Importance de la présentation croisée des antigènes par les cellules dendritiques conventionnelles dans l'induction d'immunité ou de tolérance	6
1.1 Importance physiologique de la présentation croisée des antigènes	7
1.1.1 Découverte de la présentation croisée et de son importance physiologique	7
1.1.2 Mécanisme cellulaire de la présentation croisée	8
1.1.3 Spécificité des cellules dendritiques dans la présentation croisée <i>in vivo</i>	9
1.2 Hétérogénéité phénotypique des cellules dendritiques murines	10
1.2.1 Cellules dendritiques périphériques et migratrices	10
1.2.2 Cellules dendritiques des organes lymphoïdes.....	13
1.3 Hétérogénéité fonctionnelle des cellules dendritiques	14
1.3.1 Les DC CD8 α^+ des organes lymphoïdes présentent constitutivement les antigènes cellulaires aux LT CD8 $^+$ spécifiques.....	14
1.3.1.1 Les antigènes périphériques sont constitutivement présentés dans les ganglions drainants.....	14
1.3.1.2 La présentation croisée des antigènes cellulaires est restreinte à la population de DC CD8 α^+	15
1.3.1.3 Les DC CD8 α^+ peuvent acquérir les antigènes cellulaires par transfert et/ou phagocytose des cellules mortes	16
1.3.2 Conséquences de la présentation croisée par les DC CD8 α^+	18
1.3.2.1 La présentation croisée par les DC CD8 α^+ conduit à l'induction de tolérance en condition physiologique	18
1.3.2.2 La présentation croisée par les DC CD8 α^+ conduit à l'induction d'immunité lors d'une infection.....	20
1.3.3 Relativisation du modèle et implication des DC migratrices dans l'induction d'immunité et de tolérance	21
1.3.4 La présentation croisée par les DC CD8 α^- est inductible.....	22
1.3.4.1 L'absence de présentation croisée par les CD8 α^- en condition physiologique n'est pas liée à une absence de capture des antigènes.....	22
1.3.4.2 Induction de la présentation croisée par des récepteurs activateurs.....	23
1.3.4.3 Induction de la présentation croisée par des ligands des TLR	24
1.3.4.4 Induction de la présentation croisée lors d'infections virales	24
1.4 Cellules dendritiques conventionnelles humaines et équivalence possible avec les populations murines	25
CHAPITRE II Rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'immunité	27
2.1 Découverte et description des cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines et murines	28
2.2 Localisation et migration des pDC en condition physiologique et inflammatoire.....	31
2.3 Reconnaissance des pathogènes par les pDC et production d'IFN de type I.....	33
2.3.1 Reconnaissance des pathogènes par les pDC	33
2.3.2 Voies de signalisation induites par les TLR7 et -9.....	34
2.3.3 Régulation de la synthèse d'IFN de type I par les pDC	35

2.4 Rôle des pDC dans l'immunité adaptative.....	36
2.4.1 Différenciation des pDC en DC matures.....	36
2.4.2 Présentation des antigènes et activation des réponses T par les pDC	37
2.4.2.1 Activation des réponses T primaires par les pDC	37
2.4.2.2 Capture des antigènes exogènes par les pDC.....	39
2.4.2.3 Présentation des antigènes exogènes aux LT CD4 ⁺ par les pDC.....	40
2.4.2.4 Présentation croisée par les pDC.....	41
2.5 Importance des pDC dans l'immunité et la tolérance	43
2.5.1 Flexibilité des réponses induites par les pDC	43
2.5.1.1 Capacité des pDC à induire la polarisation Th1, Th2 et Th22 des lymphocytes T naïfs	43
2.5.1.2 Induction de lymphocytes T suppresseurs par les pDC	44
2.5.1.2.1 Induction de Tr1 par les pDC.....	44
2.5.1.2.2 Induction de Treg par les pDC	45
2.5.2 Rôle des pDC dans l'induction d'immunité.....	46
2.5.2.1 Rôle des pDC dans l'immunité anti-virale.....	46
2.5.2.2 Rôle des pDC dans l'auto-immunité	47
2.5.2.3 Rôle des pDC dans l'immunité anti-tumorale.....	48
2.5.3 Rôle des pDC dans l'induction de tolérance <i>in vivo</i>	49
2.5.3.1 Les pDC sont responsables de la tolérance physiologique aux antigènes inhalés et limitent les immuno-pathologies inflammatoires pulmonaires.....	49
2.5.3.2 Les pDC sont responsables de tolérance orale.....	50
2.5.3.3 Les pDC favorisent la tolérance aux greffes	51
 CHAPITRE III Altérations fonctionnelles des cellules dendritiques associées au cancer..	53
3.1 Altération de la différenciation des cDC.....	54
3.1.1 Altération du nombre de cDC chez les individus porteurs de tumeurs.....	54
3.1.2 Facteurs impliqués dans l'altération de la différenciation des cellules myéloïdes	55
3.2 Altération de la maturation des cDC et de leur sécrétion de cytokines.....	56
3.2.1 Altération des cDC infiltrant les tumeurs.....	56
3.2.2 Rôle paracrine/autocrine de l'IL-10 dans l'inhibition des cDC	57
3.3 Incapacité des TADC à induire des réponses anti-tumorales.....	59
3.3.1 Capture <i>in situ</i> et présentation des antigènes tumoraux par les TADC <i>in vitro</i> et dans les ganglions drainant les tumeurs <i>in vivo</i>	59
3.3.2 Induction de tolérance en l'absence de support par les lymphocytes T CD4 ⁺	60
3.4 Contribution active des DC à la progression tumorale	61
3.4.1 Promotion directe de la croissance tumorale.....	62
3.4.2 Suppression des réponses immunes	62
3.4.2.1 Inhibition directe de la prolifération des lymphocytes T par les DC	62
3.4.2.2 Activation et induction de lymphocytes T suppresseurs par les DC.....	63
 RESULTATS	65
Objectifs	66
Article 1	67
Résultats complémentaires	94
 DISCUSSION	101
ANNEXE	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	158

PREAMBULE ET OBJECTIFS SPECIFIQUES

Le cancer du sein est la tumeur maligne la plus fréquente et la première cause de mortalité par cancer chez la femme dans les pays occidentaux. Notre groupe a montré que la présence de cellules dendritiques (DC) de type plasmacytoïde (pDC) dans les tumeurs mammaires est un facteur indépendant de mauvais pronostic en terme de survie globale et de survie sans progression pour les patientes (Treilleux et al., 2004). Cette observation clinique est à la base de notre projet d'étude du rôle des pDC associées aux tumeurs (TApDC) dans la progression tumorale.

Au sein du système immunitaire, les DC jouent un rôle central en initiant et en orientant les réponses T primaires CD4⁺ et CD8⁺. Les DC présentent la capacité unique de réaliser la présentation croisée des antigènes exogènes en association avec les molécules du CMH de classe I. Cette caractéristique essentielle pour instruire les lymphocytes T CD8⁺ naïfs spécifiques d'antigènes qui ne sont pas exprimés par les DC leur confère un rôle crucial dans l'induction des réponses immunes anti-virales et anti-tumorales mais également dans l'induction de tolérance.

Les DC constituent une famille hétérogène tant sur le plan phénotypique que fonctionnel. Parmi elles, les DC conventionnelles (cDC) sont constituées de plusieurs sous populations qui présentent des fonctions distinctes. Dans la première partie de l'introduction, nous détaillerons l'hétérogénéité fonctionnelle des cDC vis-à-vis de la présentation croisée des antigènes ainsi que les conséquences de cette présentation sur l'induction d'immunité ou de tolérance.

Dans la seconde partie, nous présenterons l'originalité des pDC vis-à-vis des cDC. Celles-ci sont des cellules clé de la réponse anti-virale par leur production de grandes quantités d'interféron de type I lors d'une stimulation virale. Leur rôle en tant que cellules présentatrices d'antigènes dans l'induction d'immunité n'est cependant pas encore clairement établi. En revanche, ces cellules sont également impliquées dans la régulation des réponses immunes et l'induction de tolérance.

De nombreuses évidences suggèrent que les tumeurs ne sont pas ignorées par le système immunitaire. Dans la troisième partie de l'introduction, nous détaillerons les mécanismes d'altération des DC permettant aux tumeurs d'échapper à la surveillance du système immunitaire.

Enfin, nous présenterons les résultats que nous avons obtenus durant ce projet.

Afin de comprendre le rôle négatif des pDC sur le pronostic des patientes atteintes de cancer du sein, nous avons développé un modèle murin de tumeur mammaire reflétant la pathologie humaine par son infiltration par des pDC associées à l'échappement des tumeurs à l'immuno-surveillance. Ce modèle nous a permis de mieux caractériser les altérations fonctionnelles des pDC dans les tumeurs mammaires en terme de réponse aux ligands des TLR et d'activation des réponses T (Article 1).

Du fait de leur rôle clé dans les réponses anti-virales, les TApDC apparaissent également comme des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cancer du sein. Nous avons ainsi souhaité déterminer les conditions nécessaires à l'induction d'une réponse anti-tumorale par les pDC. Nous avons émis l'hypothèse que l'infection virale des cellules tumorales pourrait provoquer leur reconnaissance et leur capture par les pDC résultant en l'activation de leur capacité à présenter les antigènes tumoraux (Résultats complémentaires).

Nos résultats apportent ainsi de nouvelles connaissances sur la biologie des pDC et notamment des TApDC. Ces résultats seront discutés en parallèle avec les données obtenues chez l'homme par notre équipe (Annexe) et les données de la littérature actuelle sur la régulation et/ou la dérégulation des fonctions des pDC. Les perspectives amenées par nos résultats notamment en terme de développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les TApDC dans le cancer du sein seront également abordées.

INTRODUCTION

CHAPITRE I
**Importance de la présentation croisée des antigènes
par les cellules dendritiques conventionnelles dans
l'induction d'immunité ou de tolérance**

1.1 Importance physiologique de la présentation croisée des antigènes

1.1.1 Découverte de la présentation croisée et de son importance physiologique

La présentation des antigènes aux lymphocytes T (LT) CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques est généralement gouvernée par des mécanismes distincts.

Les antigènes endogènes ou viraux généralement synthétisés dans le cytoplasme des cellules présentatrices sont dégradés par le protéasome. Les peptides résultants sont transportés par les transporteurs associés au traitement des antigènes TAP1 et TAP2 dans la lumière du réticulum endoplasmique où ils sont chargés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (CMH-I). Les complexes CMH-I:peptides sont ensuite transportés à la membrane plasmique via le complexe golgien où ils sont présentés aux LT CD8⁺ spécifiques. Toutes les cellules sont ainsi capables de présenter les antigènes qu'elles expriment, révélant ainsi leur identité aux effecteurs cytotoxiques. Ce mécanisme diffère de la présentation des antigènes exogènes (extracellulaires) qui sont internalisés par endocytose ou phagocytose par les cellules présentatrices d'antigènes (APC). Les composés internalisés sont dégradés dans les lysosomes et les peptides sont alors chargés sur les molécules du CMH de classe II (CMH-II) présentes dans ces compartiments puis transportés à la membrane et présentés aux LT CD4⁺ spécifiques. Les antigènes endogènes peuvent également emprunter cette voie soit par leur présence initiale dans les endosomes (protéines sécrétées ou membranaires) soit par autophagie (protéines cytosoliques) (Germain and Margulies, 1993).

Cependant, ces deux mécanismes peuvent se rejoindre par un processus transverse appelé présentation croisée permettant la présentation des antigènes exogènes en association avec les molécules du CMH-I aux LT CD8⁺. Ce processus a été décrit pour la première fois *in vivo* en 1976 par Bevan. L'immunisation de souris hybrides F1 (H-2^d x H-2^b) par des cellules d'haplotype H-2^b induit une réponse cytotoxique spécifique des antigènes mineurs d'histocompatibilité des cellules injectées restreinte au second haplotype parental (H-2^d) (Bevan, 1976). Ainsi, la restriction de la réponse est déterminée par le CMH parental et non par celui de l'*inoculum* ce qui suggère que des APC parentales instruisent les LT CD8⁺ naïfs.

Ce processus s'est progressivement révélé crucial *in vivo* pour l'induction des réponses cytotoxiques primaires dirigées contre des antigènes cellulaires exogènes (Carbone and Bevan, 1990), des tumeurs non hématopoïétiques (Huang et al., 1994) et des virus qui

n'infectent pas les APC (Sigal et al., 1999), mais également pour le maintien de la tolérance périphérique vis-à-vis des antigènes du soi extra-thymiques et/ou exprimés dans les tissus non lymphoïdes (Kurts et al., 1996; Kurts et al., 1997b).

1.1.2 Mécanisme cellulaire de la présentation croisée

La présentation croisée nécessite l'internalisation des composés extracellulaires de façon non spécifique par phagocytose (Brossart and Bevan, 1997; Kovacsovics-Bankowski et al., 1993; Norbury et al., 1997; Pfeifer et al., 1993) ou spécifique par endocytose (Burgdorf et al., 2006; Ke and Kapp, 1996; Regnault et al., 1999). De nombreux pathogènes produisent des toxines qui interfèrent dans différentes étapes de la présentation des antigènes par les cellules. L'utilisation de ces toxines et d'inhibiteurs de synthèse a permis d'élucider en partie le mécanisme cellulaire conduisant à la présentation croisée dans des systèmes modèles tels que les macrophages, les DC dérivées de cultures de moelle osseuse ou une lignée de DC (Brossart and Bevan, 1997; Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995; Rodriguez et al., 1999). La chloroquine, inhibiteur de l'acidification des endosomes, n'affecte pas la présentation croisée des antigènes exogènes aux LT CD8⁺ mais inhibe leur présentation aux LT CD4⁺. Ceci suggère que les peptides associés aux molécules du CMH-I ou aux molécules du CMH-II ne sont pas générés dans les mêmes compartiments. En revanche, des inhibiteurs naturels ou synthétiques du protéasome tels que la lactacystine bloquent spécifiquement la présentation des antigènes endogènes et exogènes aux LT CD8⁺. Les peptides dérivés des antigènes exogènes et endogènes sont ainsi générés par le même mécanisme ce qui suppose que les composés internalisés doivent rejoindre le cytoplasme. Après phagocytose de gélonine, de peroxydase ou de luciférase, l'activité enzymatique de ces protéines est conservée et détectable dans le cytoplasme démontrant l'existence d'un mécanisme de transfert des composés internalisés des phagosomes ou des endosomes précoces vers le cytoplasme. Ce transfert ne semble pas associé à une rupture des compartiments endosomaux mais plutôt à un transport spécifique des antigènes internalisés dont le mécanisme n'est pas encore entièrement élucidé. Cependant, le système de translocation inverse des protéines du réticulum endoplasmique (RE) vers le cytoplasme permettant la dégradation de protéines du réticulum endoplasmique ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) a été impliqué dans la présentation croisée d'antigènes solubles par l'utilisation d'Eotoxine A, une toxine bactérienne inhibant le canal Sec61 (Ackerman et al., 2006). La présence dans les endosomes de protéines normalement associées au réticulum endoplasmique corrobore cette hypothèse

(Burgdorf et al., 2008; Kim et al., 2008). D'autre part, l'existence d'un compartiment cellulaire mixte résultant de la fusion du réticulum endoplasmique et des phagosomes et contenant les transporteurs spécifiques du réticulum a également été proposée (Guermontprez et al., 2003; Houde et al., 2003) mais reste toutefois controversée (Touret et al., 2005). Le compartiment cellulaire (endosomes ou fusion RE/phagosomes) d'où sont transférés les antigènes exogènes vers le cytoplasme n'est ainsi pas encore clairement défini. Une fois transportés dans le cytoplasme, les antigènes sont dégradés par le protéasome et rejoignent la voie de chargement des molécules du CMH de classe I par les transporteurs TAP1-2 dans le réticulum endoplasmique (sensible à la Brefeldine A) (Brossart and Bevan, 1997; Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995) ou directement dans les endosomes/phagosomes (insensible à la Brefeldine A) (Burgdorf et al., 2008).

1.1.3 Spécificité des cellules dendritiques dans la présentation croisée *in vivo*

La construction de souris hybrides F1 (H-2^d x H-2^b) chimères par transfert de cellules de moelle osseuse d'un seul haplotype (H-2^b) a permis de démontrer que la réponse cytotoxique dirigée contre les antigènes tumoraux (Huang et al., 1994) était restreinte au CMH du donneur. De plus, le transfert de cellules de moelle osseuse déficientes pour la présentation des antigènes associés au CMH-I (bm1 ou TAP^{0/0}) abroge la présentation croisée des antigènes du soi (Kurts et al., 1996), tumoraux (Huang et al., 1996a) ou viraux (Sigal et al., 1999). La présentation croisée de ces antigènes est ainsi exclusivement réalisée par des APC dérivées de la moelle osseuse.

In vitro, trois populations d'APC ont été décrites comme capables de réaliser la présentation croisée à partir d'antigènes solubles ou particuliers (associés à des billes ou exprimés par des bactéries): les lymphocytes B (LB) (Ke and Kapp, 1996), les macrophages (Harding and Song, 1994; Kovacsovics-Bankowski et al., 1993; Norbury et al., 1995; Pfeifer et al., 1993; Rock et al., 1993) et les DC (Brossart and Bevan, 1997; Norbury et al., 1997).

L'élimination des DC *in vivo* chez les souris transgéniques DTR-CD11c par la toxine diphtérique supprime l'induction des réponses T CD8⁺ primaires contre les antigènes cellulaires exogènes, les bactéries, les parasites (Jung et al., 2002) et les antigènes solubles (Sapozhnikov et al., 2007). De plus, le transfert de cellules de moelle osseuse issues de souris transgéniques CD11c-b2m dans des souris b2m^{-/-} rétablit la présentation croisée des antigènes du soi (Kurts et al., 2001). Les DC sont ainsi nécessaires et suffisantes pour effectuer la présentation croisée des antigènes cellulaires ou solubles *in vivo*.

Les DC sont de plus des APC remarquables car ce sont les seules capables d'induire des réponses immunes primaires *in vivo*, permettant ainsi l'établissement de la mémoire immunologique (Steinman, 1991).

1.2 Hétérogénéité phénotypique des cellules dendritiques murines

Les DC ont été identifiées par leur morphologie caractéristique dans l'épiderme humain par Paul Langerhans en 1868 puis en 1973 dans les organes lymphoïdes murins (Steinman et al., 1975; Steinman and Cohn, 1973). Les DC constituent une population hétérogène d'origine hématopoïétique partageant des propriétés physiques, phénotypiques et fonctionnelles uniques. Les DC sont caractérisées par leur faible densité, leur expression des molécules du CMH-II en l'absence des marqueurs caractéristiques de lignage ainsi que par leur capacité unique à induire la prolifération des LT naïfs (Steinman et al., 1974; Steinman et al., 1979; Steinman et al., 1983; Steinman and Cohn, 1974; Steinman and Witmer, 1978). Il existe des sous populations de DC qui diffèrent par leur localisation anatomique et leur expression de marqueurs de surface.

Contrairement aux DC humaines, toutes les DC murines expriment l'intégrine CD11c. Cependant, deux sous populations peuvent être distinguées selon l'intensité d'expression de ce marqueur plus faiblement exprimé par les DC plasmacytoïdes (pDC) que par les autres DC qualifiées de DC conventionnelles (cDC). Les pDC diffèrent des cDC par de nombreux aspects et font l'objet d'un chapitre particulier (Chapitre II).

Au sein des DC conventionnelles, une première distinction peut être réalisée entre les DC périphériques migratrices et les DC résidentes des organes lymphoïdes.

1.2.1 Cellules dendritiques périphériques et migratrices

Les DC périphériques sont présentes dans les tissus non lymphoïdes tels que la peau et les muqueuses et constituent la première barrière immunologique de l'organisme contre les pathogènes de l'environnement. Les cellules de Langerhans (LC) colonisent les épithéliums et les DC interstitielles sont localisées dans la plupart des organes et tissus (Austyn et al., 1994; Hart and Fabre, 1981). Les LC sont caractérisées par leur forte expression de l'intégrine CD11b, des molécules d'adhésion aux cellules épithéliales E-Cadhérine et EpCAM, de la molécule F4/80 et de différents récepteurs d'endocytose tels que les récepteurs des

		cDC résidentes			cDC migratrices		pDC		
		DN	CD4+	CD8+	Cellules de Langherans	DC Interstitielles CD103+ ou CD11b+			
Marqueurs de lignage		CD4	-	+	-	-	-	+/-	
		CD8	-	-	+	- *	-	+/- *	
		F4/80	faible	+	faible	fort	+/-	-	
		BST2	-	-	-	-	-	-	+
		B220	-	-	-	-	-	-	+
		Ly6G/C	-	-	-	-	-	-	+
Molécules d'adhésion	Superfamille des immunoglobulines	EpCAM	-	-	-	+	+/-	-	
		SIRPa CD172a	+	+	-	+	+	ND	
	Intégrines	αX CD11c	fort	fort	fort	fort	fort	faible	
		αM CD11b	+	+	-	+	+/-	-	
		αLβ2 CD11a/CD18 LFA-1	+	+	fort	- *	+/-	+	
		αE CD103	-	-	+	-	+/-	-	
	Cadhérines	E-Cadhérine	ND	ND	ND	+	ND	ND	
	CD24		+	+	fort	++	++	faible	
Recepteurs d'endocytose	Lectines	MR1 CD206	-	-	+	ND	ND	dep	
		CLEC9A/DNGR1	-	-	+	ND	ND	faible	
		Langerin CD207	-	-	+	fort	+/-	-	
		33D1 DCIR2	+	+	-	-	-	ND	
		DEC205 CD205	-	-	fort	fort	int	-	
		Siglec-H	-	-	-	-	-	+	
	Récepteur Scavenger	CD36	-	-	+	ND	ND	+	
	Récepteurs des immunoglobulines	FcgR1 CD64	+	+	+	+	+	+	
		FcgRII CD32	+	+	+	+	+	+	
FcgRIII CD16		+	+	+	+	+	+		

Table 1 : Hétérogénéité phénotypique des cDC murines

Légende

* : augmenté suite à l'activation

+/- : plusieurs populations

ND : non déterminé

Dep : variable selon la souche

immunoglobulines Fc γ R, et les lectines de type C DEC205/CD205 et Langérine/CD207 (Table 1) (Anjuere et al., 1999; Merad et al., 2008; Valladeau and Saeland, 2005). Les DC interstitielles sont plus hétérogènes et au moins deux sous populations peuvent être définies dans la peau (Bursch et al., 2007; Ginhoux et al., 2007) et les voies aériennes (Jakubzick et al., 2008; Sung et al., 2006) selon l'expression relative des intégrines CD11b et CD103. Les DC CD11b⁺ sont CD103⁻ Langérine⁻ et F4/80⁺ et les DC CD103⁺ sont CD11b⁻ Langérine⁺ et F4/80⁻ (Merad et al., 2008).

Les DC isolées des tissus en condition physiologique sont caractérisées par leur forte capacité de capture des antigènes et par leur faible activité immuno-stimulatrice associée à une faible expression des molécules du CMH-II et des molécules de costimulation des LT CD80, CD86 et CD40 (Romani et al., 1989; Schuler and Steinman, 1985). En condition d'inflammation (Roake et al., 1995), lors d'un contact avec un allergène (Macatonia et al., 1987; Vermaelen et al., 2001; Weinlich et al., 1998), ou en culture (Austyn et al., 1994; Heufler et al., 1988; Schuler and Steinman, 1985), les LC et les DC interstitielles acquièrent un phénotype mature caractérisé par une augmentation de l'expression des molécules du CMH-II et des molécules de costimulation et migrent par la lymphe afférente vers les ganglions drainants (Larsen et al., 1990; Macatonia et al., 1987; Roake et al., 1995; Vermaelen et al., 2001; Weinlich et al., 1998). Sur la base de ces études, le paradigme des cellules de Langerhans (Girolomoni et al., 2002) propose un cycle de vie des DC selon lequel les DC immatures sont présentes en périphérie où elles capturent constitutivement les antigènes. La reconnaissance de signaux de danger endogènes tels que des cytokines inflammatoires ou exogènes tels que des motifs conservés chez les pathogènes (PAMPs) par les DC (Encadré Récepteurs de reconnaissance de motifs et Figure 1) entraîne leur maturation phénotypique et leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Les DC matures présenteraient alors les antigènes rencontrés en périphérie et initieraient les réponses adaptatrices (Banchereau et al., 2000).

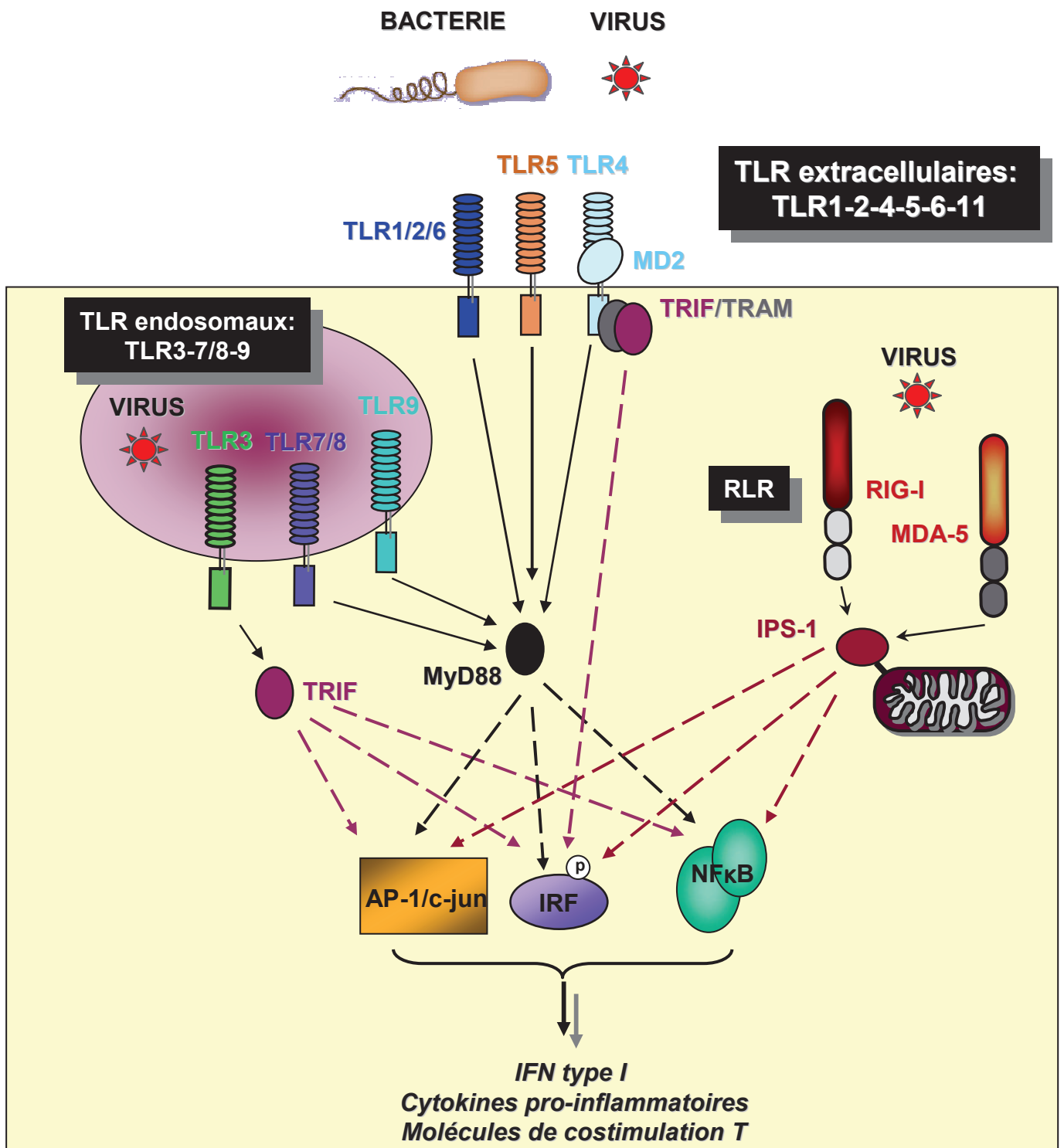


Figure 1: Reconnaissance des pathogènes par les récepteurs de reconnaissance de motifs extracellulaires et intracellulaires

Encadré 1 : Récepteurs de reconnaissance de motifs

Le système immunitaire est capable de reconnaître les motifs moléculaires conservés des microorganismes (PAMP) au moyen de récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR). Les PRR sont subdivisés en trois grandes familles, les RIG-like récepteurs (RLR), les NOD-like récepteurs (NLR) et les Toll-like récepteurs (TLR). Les TLR ont été décrits initialement chez la drosophile comme médiateurs de la polarité dorso-ventrale et de la réponse immunitaire anti-fongique. Ultérieurement, une famille de récepteurs humains et murins structurellement proches des récepteurs de la drosophile a été décrite. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires de type I, exprimées sur diverses cellules immunes, comme les macrophages et les DC. Il a été décrit dix homologues humains aux récepteurs Toll (TLR1 à -10) dont les ligands naturels sont connus pour la majorité d'entre eux. De part leur localisation, ces récepteurs sont spécialisés dans la détection de type particulier de pathogènes. Tandis que les TLR1, -2, -4, -5, -6 (et -11 chez la souris), exprimés sur la surface extracellulaire, sont principalement impliqués dans la reconnaissance des composés bactériens, les TLR3, -7 -8 et -9 sont localisés au niveau des endosomes et sont spécialisés dans la reconnaissance des nucléotides viraux et/ou bactériens (Figure 1). Notamment, le TLR2, en association avec les co-récepteurs TLR1 et -6 est impliqué dans la reconnaissance d'une grande variété de molécules dérivées des parois bactériennes et fongiques ou d'enveloppes virales (peptidoglycane, acide lipotéichoïque, zymosan, Hémagglutinine du virus de la rougeole). Le TLR4 reconnaît spécifiquement le lipopolysaccharide (LPS) de la paroi des bactéries Gram négatives ainsi que la protéine de fusion du virus RSV. Le TLR5 reconnaît spécifiquement la flagelline bactérienne. Le TLR11 murin, sans homologue humain fonctionnel, serait impliqué dans la reconnaissance de la profiline du protozoaire *Toxoplasma gondii*. Le TLR3 est impliqué dans la reconnaissance des ARN doubles brins viraux et de l'ARN double-brin synthétique Poly(I:C). Les TLR7 et -8 reconnaissent quant à eux des ARN simple brin viraux et des composés anti-viraux synthétiques de type imidazoquinolines (imiquimod, résiquimod (R-848)). Enfin, TLR9 participe à la détection des motifs CpG hypométhylés naturels ou synthétiques caractéristiques de l'ADN viral et bactérien.

Après reconnaissance de leurs ligands respectifs, tous les TLR à l'exception du TLR3 s'associent à la molécule adaptatrice Myeloid differentiation primary response gene 88 MyD88. En revanche, le TLR3 (ainsi que TLR4) s'associe à la molécule adaptatrice Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN β (TRIF). Ces adaptateurs, par leur recrutement de diverses kinases, initient différentes voies de signalisation résultant en l'activation de nombreux facteurs de transcriptions tels que le nuclear factor- κ B (NF- κ B), les mitogen-activated protein (MAP) kinases AP-1/c-jun et les interferon regulatory factor (IRF)-3, -5 et -7. Ces facteurs induisent alors la transcription des gènes codant les IFN de type I, les cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α et les molécules de costimulation T CD40, CD80 et CD86.

Les récepteurs cytoplasmiques RLR, melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA5) et retinoic acid inducible gene I (RIG-I) constituent une seconde catégorie de PRR impliqués dans la réponse anti-virale. Ces récepteurs ubiquitaires sont impliqués dans la reconnaissance des ARN viraux intracellulaires et du Poly(I:C). Suite à leur association avec la molécule adaptatrice mitochondriale IPS-1/CARDIF/VISA/MAVS et l'activation de voies de signalisation similaires à celles des TLR, ils induisent également la synthèse d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires (Figure 1).

1.2.2 Cellules dendritiques des organes lymphoïdes

Un certain nombre de sous populations de DC conventionnelles résidentes des organes lymphoïdes primaires et secondaires, ne transitant donc pas par les tissus a cependant été identifié. Notamment, ces cellules présentent un phénotype immature (Wilson and Villadangos, 2004; Wilson et al., 2003).

Le thymus contient une majorité de DC $CD8\alpha^+$ $DEC205^+$ et $CD11b^-$. Contrairement aux LT $CD8^+$ qui expriment un hétérodimère $\alpha\beta$, les DC $CD8\alpha^+$ n'expriment pas la chaîne β mais un homodimère $\alpha\alpha$. Les DC thymiques sont des DC résidentes probablement spécialisées dans la présentation des antigènes du soi et la sélection négative en induisant l'apoptose des LT auto-réactifs (Ardavin et al., 1993).

Les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions contiennent également différentes sous populations de DC résidentes immatures caractérisées par l'expression de certaines molécules de surface. L'expression des marqueurs $CD8\alpha$ et $CD4$ est exclusive et permet de distinguer trois sous populations : $CD8\alpha^+/CD4^-$ (DC $CD8\alpha^+$), $CD8\alpha^-/CD4^+$ (DC $CD4^+$) et $CD8\alpha^-/CD4^-$ (DC DN) (Vremec et al., 2000). Ces DC expriment également des molécules d'adhésion et des récepteurs d'endocytose qualitativement et/ou quantitativement différents (Table 1). Notamment, les DC $CD8\alpha^+$ sont $CD103^+$ $CD24^{hi}$ MR^+ $CLEC9A/DNGR1^+$ $Langérine^+$ $DEC205^+$ $CD36^+$. Ces DC sont également souvent désignées comme DC lymphoïdes du fait de leur ressemblance phénotypique avec les DC thymiques. En revanche les DC $CD4^+$ et DN, généralement regroupées sous le terme de DC $CD8\alpha^-$ ou de DC myéloïdes sont $SIRP\alpha^+$ $CD11b^+$ $DCIR2^+$ (McLellan et al., 2002). L'origine exclusivement lymphoïde des DC $CD8\alpha^+$ et myéloïde des DC $CD8\alpha^-$ ainsi que la possibilité d'une filiation entre ces deux populations (Martinez et al., 2002; Merad et al., 2000; Moron et al., 2002) ont été longtemps controversées. Il semble aujourd'hui clair que ces populations sont distinctes (Naik et al., 2003) bien qu'elles puissent être toutes deux générées *in vitro* à partir des précurseurs lymphoïdes et myéloïdes de la moelle osseuse (Martin et al., 2000; Traver et al., 2000; Wu et al., 2001). Selon leur localisation anatomique, les ganglions contiennent une ou deux populations supplémentaires caractérisées par une forte expression des molécules du CMH-II et des molécules de costimulation (Wilson et al., 2003). La première, $DEC205^{int}$ $CD8\alpha^-$ est hétérogène vis-à-vis de l'expression des molécules $CD11b$, $CD103$ et $Langérine$ et est présente dans tous les ganglions périphériques. La seconde est restreinte aux ganglions cutanés et présente une combinaison unique de marqueurs $DEC205^{high}$ $CD11b^+$ $CD8\alpha^{low}$ $Langérine^+$. Ces populations correspondent respectivement aux DC interstitielles et aux LC

matures provenant des tissus (Anjuere et al., 1999; Anjuere et al., 2000; Henri et al., 2001; Merad et al., 2000).

En conclusion, les DC constituent une population extrêmement hétérogène du point de vue de leur phénotype et de leur localisation en condition physiologique. Cette hétérogénéité est encore amplifiée en condition inflammatoire par la capacité de ces cellules à se différencier à partir de précurseurs sanguins (monocytes), à migrer, à s'activer et à acquérir le marqueur CD8 α .

1.3 Hétérogénéité fonctionnelle des cellules dendritiques

Les DC partagent la capacité unique de présenter les antigènes et d'instruire les LT naïfs (Hart, 1997). Cependant, la diversité phénotypique des DC est corrélée à des différences fonctionnelles quant à leur capacité à capturer différentes formes d'antigènes; cellulaires, particulaires, solubles ou associés en complexes immuns, et à les associer aux molécules du CMH-I et II. Les conséquences d'une telle présentation en terme d'induction d'immunité ou de tolérance sont également variables. Ces différences semblent être liées d'une part à des caractéristiques intrinsèques des populations, certaines réalisant ces fonctions constitutivement et d'autres de façon inductible et d'autre part à l'état de différenciation/maturation des DC et au contexte de la rencontre avec l'antigène.

1.3.1 Les DC CD8 α ⁺ des organes lymphoïdes présentent constitutivement les antigènes cellulaires aux LT CD8⁺ spécifiques

1.3.1.1 Les antigènes périphériques sont constitutivement présentés dans les ganglions drainants

Les antigènes périphériques peuvent être des antigènes du soi exprimés dans les tissus non lymphoïdes, des antigènes exogènes exprimés par exemple lors d'une infection par un pathogène ou des antigènes tumoraux. De nombreux systèmes ont été développés pour suivre la présentation de ces antigènes au moyen d'antigènes modèles introduits de façon artificielle. La détection de la prolifération *in vivo* des LT CD8⁺ transgéniques pour le TCR spécifique de l'antigène correspondant préalablement injectés permet alors de déterminer si et où ces antigènes sont présentés.

Les antigènes du soi extra thymiques peuvent être modélisés chez des souris transgéniques par l'expression ectopique d'antigènes modèles sous le contrôle de promoteurs spécifiques des tissus. Dans les souris RIP-mOVA qui expriment l'Ovalbumine (OVA) sous la dépendance du promoteur de l'insuline dans les cellules β des îlots pancréatiques et les cellules tubulaires proximales rénales, les LT CD8⁺ transgéniques pour le TCR spécifique de OVA (OT-I) prolifèrent uniquement dans les ganglions drainant le pancréas et le rein (Kurts et al., 1996).

Les antigènes cellulaires exogènes peuvent être modélisés *in vivo* par injection intraveineuse de splénocytes chargés artificiellement en ovalbumine par choc osmotique (Moore et al., 1988). Dans ce système, OVA est également présentée dans la rate aux LT CD8⁺ spécifiques endogènes (Carbone and Bevan, 1990) ou transgéniques OT-I (den Haan et al., 2000).

Les antigènes tumoraux peuvent être modélisés par l'expression transgénique d'oncogènes dans les tissus, conduisant au développement de tumeurs spontanées, ou par l'implantation de lignées tumorales exprimant un antigène cible. Différents modèles ont ainsi été décrits dans lesquels les LT CD8⁺ spécifiques d'OVA (Curtsinger et al., 2007; Gerner et al., 2008) ou de l'antigène T du virus SV40 (Anderson et al., 2007) prolifèrent dans les ganglions drainant les tumeurs exprimant ces antigènes.

Ainsi, les antigènes cellulaires périphériques du soi, exogènes ou tumoraux sont présentés aux LT CD8⁺ spécifiques *in vivo* de façon constitutive, c'est-à-dire en l'absence de signaux de danger microbiens associés.

1.3.1.2 La présentation croisée des antigènes cellulaires est restreinte à la population de DC CD8 α ⁺

L'implication des DC dans la présentation croisée des antigènes *in vivo* a été mentionnée plus tôt. Le cycle de vie des DC migratrices laisse supposer que ces DC, ayant capturé les antigènes en périphérie et migré dans les ganglions drainants, instruiraient les LT spécifiques et initieraient les réponses adaptatrices. Cependant, cette vision a été considérablement remise en cause par l'identification de la sous population de DC responsable de la présentation croisée des antigènes dans les modèles antigéniques précédents. En effet, la purification des sous populations de DC à partir des organes lymphoïdes drainant les tissus ou la rate dans le cas d'injection intraveineuse et leur culture avec les LT CD8⁺ ou les hybridomes spécifiques a révélé que dans tous ces modèles, la fonction de présentation croisée des antigènes cellulaires *in vivo* était spécifiquement restreinte à la sous population de DC CD8 α ⁺ résidente des organes lymphoïdes (Belz et al., 2002a; den Haan et al., 2000; Gerner et al., 2008).

Récemment, deux modèles confirmant le rôle des DC CD8 α ⁺ dans la présentation croisée des antigènes cellulaires aux LT CD8⁺ *in vivo* ont été développés. Lin et al ont développé le premier système permettant l'élimination sélective des cellules responsables de la présentation croisée *in vivo* par injection de cytochrome c. Ce système est basé sur la capacité unique des cellules réalisant la présentation croisée à transférer un composé internalisé dans le cytoplasme. Ainsi, les cellules ayant capturé le cytochrome c et l'ayant transféré dans leur cytoplasme sont éliminées par apoptose médiée par la voie mitochondriale artificiellement activée. Lin et al ont démontré que l'injection de cytochrome c réduisait considérablement la proportion des DC CD8 α ⁺ spléniques sans affecter les autres sous populations et diminuait la présentation croisée de l'ovalbumine cellulaire aux cellules OT-I *in vivo* et *in vitro* (Lin et al., 2008). Hildner et al, dans le but de développer des modèles alternatifs à la déplétion des DC *in vivo* par la toxine diphtérique, ont réalisé une étude globale de l'expression de facteurs de transcription dans de nombreux tissus et cellules immunitaires. Cette étude a conduit à l'identification d'un facteur de transcription Batf3 spécifiquement et fortement exprimé par les cDC. Ces auteurs ont construit les souris déficientes Batf3^{-/-} et démontré l'absence spécifique des DC CD8 α ⁺ résidentes de la rate et des ganglions dans ces souris. Les souris Batf3^{-/-} contrairement aux souris sauvages sont alors incapables de rejeter une tumeur très immunogénique. De plus, les DC isolées de ces souris cultivées avec des splénocytes chargés en ovalbumine sont incapables d'induire la prolifération des cellules OT-I *in vitro* (Hildner et al., 2008).

Ainsi, les DC CD8 α ⁺ semblent spécialisées dans la présentation croisée des antigènes cellulaires *in vivo* en condition d'homéostasie.

1.3.1.3 Les DC CD8 α ⁺ peuvent acquérir les antigènes cellulaires par transfert et/ou phagocytose des cellules mortes

Comme R. Steinman l'a suggéré, la restriction de la fonction de présentation croisée des antigènes exprimés en périphérie aux DC CD8 α ⁺ dans ces modèles, suggère une coopération fonctionnelle entre les DC résidentes des organes lymphoïdes et les DC migratrices qui transportent les antigènes de la périphérie vers les ganglions drainants (Steinman et al., 2000). Des transferts de molécules du CMH entre les DC migratrices et les DC résidentes dans les organes lymphoïdes ont été décrits *in vivo* (de Heusch et al., 2007) et permettent l'induction de réponses T CD8⁺ spécifiques (Dolan et al., 2006). Notamment, après injection de DC chargées en ovalbumine dans des souris déficientes en CMH-I, les DC CD8 α ⁺ de la souris

receveuse mais pas les DC CD8 α ⁻ induisent la prolifération des cellules OT-I suggérant que le transfert d'antigène par ce biais est de plus spécifique des DC CD8 α ⁺ (Qu et al., 2009). Les transferts peuvent s'opérer par contact cellulaire (Dolan et al., 2006) ou par le biais d'exosomes sécrétés par les DC migratrices. Un transfert de complexes CMH-II:peptides sélectivement vers les DC CD8 α ⁺ par le biais d'exosomes a ainsi été décrit et implique le récepteur LFA1 (Segura et al., 2007). Un tel type de transfert suggèrerait cependant que la présentation croisée des antigènes est réalisée uniquement par les DC migratrices et non par les DC CD8 α ⁺. De plus, les DC CD8 α ⁺ sont beaucoup moins stimulatrices lorsqu'elles acquièrent les antigènes par transfert plutôt que par phagocytose (Smyth et al., 2008).

Le transfert d'antigène entre les DC migratrices et les DC CD8 α ⁺ résidentes pourrait donc plus probablement s'opérer par la phagocytose des DC migratrices à faible durée de vie. Dans ce sens, les DC CD8 α ⁺ sont caractérisées par leur capacité unique à internaliser différents types de cellules mortes *in vivo* tels que des splénocytes chargés, des cellules B allogéniques tuées par les NK et des cellules tumorales apoptotiques (Iyoda et al., 2002). Cette spécialisation est par ailleurs associée à leur rôle fondamental dans la présentation des antigènes apportés par les splénocytes chargés en ovalbumine (Schulz and Reis e Sousa, 2002). En accord avec la spécialisation des DC CD8 α ⁺ dans la capture des cellules apoptotiques, l'expression sous la dépendance du promoteur CD11c d'un dominant négatif de la GTPase Rac1 impliqué dans la phagocytose inhibe la capture et la présentation croisée des antigènes cellulaires par les DC CD8 α ⁺ (Kerksiek et al., 2005).

Il existe de nombreux signaux associés à la mort cellulaire et induisant la reconnaissance et la capture des cellules apoptotiques par les phagocytes (Ravichandran and Lorenz, 2007). Cependant, peu de ces signaux peuvent expliquer la restriction de cette capture aux DC CD8 α ⁺. Ainsi, la recherche du récepteur impliqué dans la reconnaissance des cellules mortes par les DC CD8 α ⁺ s'est d'abord focalisée sur le récepteur scavenger CD36 sélectivement exprimé par cette sous population (Iyoda et al., 2002) et précédemment impliqué en association avec les intégrines $\alpha_v\beta_5$ dans la phagocytose des cellules apoptotiques par les DC humaines (Albert et al., 1998). Cependant, la présentation des antigènes cellulaires apportés par des splénocytes chargés par les DC CD8 α ⁺ est intacte dans les souris CD36^{-/-} ainsi que dans les souris déficientes pour les intégrines β_3 et β_5 (Schulz et al., 2002). De même la présentation des antigènes du soi par les DC CD8 α ⁺ est effective dans les souris RIP-mOVA irradiées et reconstituées avec des cellules de moelle osseuse CD36^{-/-} (Belz et al., 2002b). Un autre récepteur scavenger pourrait être impliqué dans cette reconnaissance. En effet l'exposition à la membrane de la calréticuline reconnue par CD91 (Basu et al., 2001) est

associée à la capture des cellules apoptotiques par les DC (Obeid et al., 2007). Cependant, la lectine DNGR1/CLEC9A récemment impliquée dans l'activation de la présentation croisée, mais pas dans la capture, des antigènes issus de cellules nécrotiques semble constituer le récepteur privilégié pour la reconnaissance et la présentation croisée des antigènes issus de cellules mortes. En particulier, cette lectine est sélectivement exprimée par les DC CD8 α^+ et reconnaît un ligand protéique intracellulaire non identifié exposé à la membrane lors de la mort cellulaire (Sancho et al., 2009). En revanche, les autres sous populations de DC expriment la molécule SIRP α (McLellan et al., 2002) impliquée dans l'inhibition de la phagocytose des globules rouges par les macrophages suite à la reconnaissance de son ligand CD47 (Oldenborg et al., 2000).

1.3.2 Conséquences de la présentation croisée par les DC CD8 α^+

1.3.2.1 La présentation croisée par les DC CD8 α^+ conduit à l'induction de tolérance en condition physiologique

La présentation croisée en condition physiologique des antigènes du soi par les DC CD8 α^+ dans les ganglions drainant le pancréas des souris RIP-mOVA ainsi que dans d'autres modèles transgéniques (Belz et al., 2002a; Hernandez et al., 2001; Vezys et al., 2000) conduit à une prolifération primaire locale des LT CD8 $^+$ spécifiques transgéniques injectés. Cependant cette prolifération n'aboutit pas à l'acquisition des fonctions effectrices (Hernandez et al., 2001) mais à la délétion progressive des cellules après quelques divisions (Hernandez et al., 2001; Kurts et al., 1997b; Kurts et al., 1998a). Dans un modèle similaire, les LT CD8 $^+$ spécifiques endogènes sont également éliminés (Vezys et al., 2000). Ces modèles transgéniques sont cependant caractérisés par une forte expression des antigènes ce qui n'est pas le cas pour tous les antigènes du soi. Dans les souris RIP-OVA^{low} qui n'expriment que faiblement OVA, les cellules OT-I restent ignorantes (Kurts et al., 1999) sauf en cas de destruction préalable des cellules pancréatiques (Kurts et al., 1998b). Ainsi, la mort cellulaire favorise la présentation croisée des antigènes du soi faiblement exprimés par les DC CD8 α^+ probablement en favorisant la capture des antigènes par les DC migratrices et conduit également à l'induction de tolérance périphérique. En accord avec cette théorie, l'induction d'apoptose des cellules β pancréatiques facilite la présentation croisée des antigènes pancréatiques par les DC des ganglions drainants et protège les souris NOD du développement spontané d'un diabète auto-immun (Hugues et al., 2002).

En revanche, la co-injection de LT CD4⁺ transgéniques pour le TCR spécifique de OVA (OT-II) ou d'anticorps dirigés contre la molécule de costimulation CD40 et de cellules OT-I dans les souris RIP-mOVA induit une stimulation efficace et durable des LT CD8⁺ et conduit au développement d'un diabète auto-immun par destruction massive des cellules β pancréatiques (Hamilton-Williams et al., 2005; Kurts et al., 1997a). L'injection de ligands des TLR (TLR-L) quant à elle, augmente la phase effectrice initiale mais n'empêche pas la délétion finale des cellules auto-réactives dans ce modèle (Hamilton-Williams et al., 2005). Cependant, dans un autre modèle transgénique, le résultat de l'induction de la réponse T CD8⁺ peut être renversé en faveur de l'auto-immunité par différents signaux inflammatoires tels qu'une infection virale ou une toxine bactérienne au moment de la présentation des antigènes. Un anticorps anti-CD40 favorise également l'induction d'immunité dans ce second modèle (Vezys and Lefrancois, 2002).

De même que pour les antigènes du soi, la présentation croisée par les DC CD8α⁺ des antigènes cellulaires exogènes issus de cellules mourantes (Ferguson et al., 2002; Liu et al., 2002) et des antigènes tumoraux (Anderson et al., 2007; Gerner et al., 2008) en l'absence de support par les LT CD4⁺ conduit à une prolifération initiale qui n'est pas accompagnée de l'acquisition de fonctions effectrices mais conduit à la délétion clonale des LT CD8⁺ spécifiques de l'antigène. En revanche, la co-injection d'anti-CD40 et de splénocytes chargés en ovalbumine conduit à la maturation phénotypique des DC CD8α⁺ et à l'induction d'une immunité effectrice (Ferguson et al., 2002; Liu et al., 2002). De même, la co-injection de LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques des antigènes tumoraux retarde la délétion des LT CD8⁺ spécifiques (Shafer-Weaver et al., 2009).

Ainsi, en condition non inflammatoire, les LT CD4⁺ peuvent fournir un support critique au moment de la présentation des antigènes aux LT CD8⁺ favorisant l'induction et le maintien de l'immunité. Le remplacement possible de ce support par un anticorps ciblant la molécule de costimulation CD40 (Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998) suggère qu'il agit majoritairement sur les DC au moins au moment de la présentation croisée des antigènes. En conséquence, l'activation préalable (Ridge et al., 1998) ou en parallèle (Bennett et al., 1997) des LT CD4⁺ et CD8⁺ est un pré-requis à l'induction d'immunité. Cependant, en condition physiologique, la présentation des antigènes par les DC CD8α⁺ immatures se produit majoritairement en association avec les molécules du CMH-I (Li et al., 2001; Pooley et al., 2001). Dans ce sens, la reconnaissance de TLR-L dans un phagosome dirige les antigènes contenus dans celui-ci vers la présentation aux LT CD4⁺ alors que l'absence de ces ligands induit la dégradation du contenu et l'absence de présentation (Blander and Medzhitov, 2006).

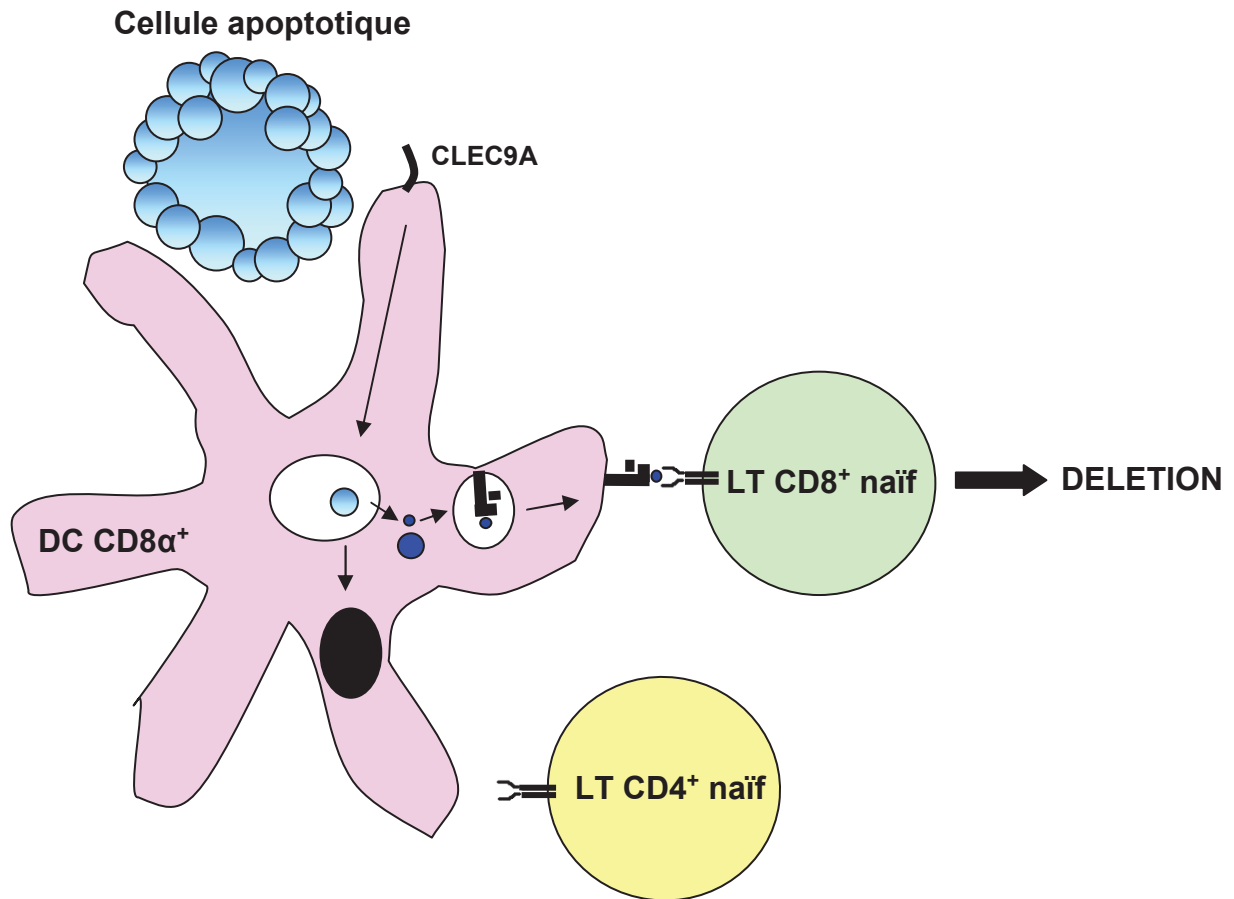


Figure 2: Mécanisme d'induction de tolérance par les DC CD8 α^+

La reconnaissance des cellules apoptotiques par les DC CD8 α^+ induit leur internalisation. Les antigènes sont rapidement transférés des endosomes vers le cytoplasme. Les antigènes transférés dans le cytoplasme sont dégradés par le protéasome puis rejoignent le réticulum endoplasmique où les peptides du soi sont associés avec les molécules du CMH-I. Les complexes CMH-I:peptide sont exportés à la membrane et présentés aux lymphocytes T CD8 $^+$ autoréactifs en l'absence de costimulation et de support par les lymphocytes T CD4 $^+$. Cette présentation aboutit à la délétion des lymphocytes T CD8 $^+$ autoréactifs

Ce mécanisme restreint ainsi la présentation aux LT CD4⁺ des antigènes rencontrés lors d'infection et non ceux apportés par les cellules mortes en condition physiologique.

Par conséquent, la présentation croisée des antigènes cellulaires issus de cellules mortes par les DC CD8 α ⁺ en l'absence de support apportés par les LT CD4⁺ ou de signaux de dangers conduit à l'induction de tolérance par délétion des cellules auto-réactives permettant ainsi aux réponses ultérieures de se concentrer sur les antigènes étrangers plutôt que sur les antigènes du soi (Figure 2).

1.3.2.2 La présentation croisée par les DC CD8 α ⁺ conduit à l'induction d'immunité lors d'une infection

Les DC CD8 α ⁺ des organes lymphoïdes ont également été majoritairement impliquées dans la présentation des antigènes viraux (virus de l'herpès HSV-1, virus de la grippe (Influenza), virus de la vaccine, virus de la chorioméningite lymphocytaire LCMV) et bactériens (*Listeria Monocytogenes*) *in vivo* (Allan et al., 2003; Belz et al., 2004a; Belz et al., 2004b; Belz et al., 2005; Smith et al., 2003). Les contributions relatives de la présentation croisée et de la présentation directe par les DC infectées sont cependant difficiles à évaluer dans la plupart des modèles d'infection par des virus et des pathogènes intracellulaires. Cependant, les virus lytiques tels que HSV-1 inhibent les fonctions des DC infectées (Bosnjak et al., 2005; Salio et al., 1999). De plus, la présentation de l'antigène viral HSVgB aux LT CD8⁺ spécifiques *in vitro* et *in vivo* est dépendante de l'intégrité de la capacité de capture des DC CD8 α ⁺ (Allan et al., 2006; Jirmo et al., 2009) mais indépendante de la capacité du virus à établir une seconde infection (Jirmo et al., 2009). Ceci suggère que pour HSV-1 au moins, la présentation croisée des antigènes par les DC CD8 α ⁺ est majoritairement responsable de l'induction d'une réponse anti-virale.

L'utilisation de modèles animaux transgéniques dans lesquels seules les cellules non hématopoïétiques peuvent être infectées (Sigal et al., 1999), de virus qui n'infectent pas les DC CD8 α ⁺ tels que le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) et le virus de la forêt de Semliki (SFV), ou la modélisation de l'infection virale des cellules par électroporation de l'ARN double brin synthétique Poly(I:C) (Schulz et al., 2005) ont permis également de confirmer l'importance de la présentation croisée par les DC CD8 α ⁺ dans l'induction des réponses anti-virales.

Contrairement à l'induction de tolérance observée en condition physiologique, la présentation croisée des antigènes issus de cellules infectées par SFV ou chargées en Poly(I:C) induit une

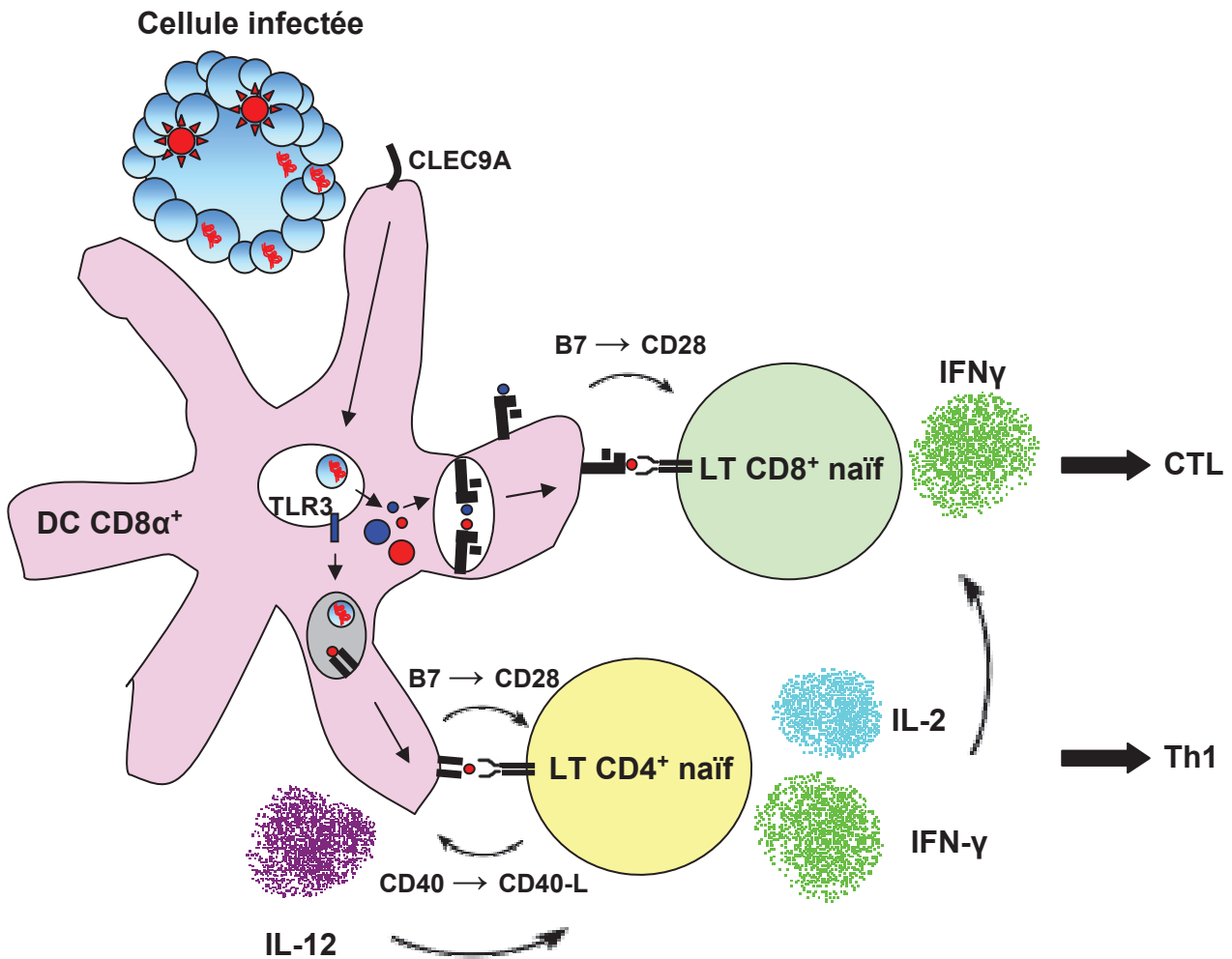


Figure 3 : Mécanisme d'induction d'immunité par les DC CD8 α^+

La reconnaissance des cellules infectées par les DC CD8 α^+ induit leur internalisation. Les antigènes sont rapidement transférés des endosomes vers le cytoplasme. La reconnaissance de ligands de TLR3 dans l'endosome induit la dégradation partielle du contenu endosomal et le chargement des molécules du CMH-II, l'export des complexes CMH-IIp à la membrane, l'expression des molécules de costimulation T CD80, CD86 et CD40. La reconnaissance des complexes CMH-II:peptide par les lymphocytes T CD4 $^+$ spécifiques en présence de signaux de costimulation induit leur expression de CD40-L. L'interaction CD40-L-CD40 induit la sécrétion d'IL-12 par les DC CD8 α^+ . Celle-ci induit la polarisation Th1 des lymphocytes T CD4 $^+$. Les antigènes cytoplasmiques sont dégradés par le protéasome puis rejoignent le réticulum endoplasmique où les peptides du soi et viraux sont associés avec les molécules du CMH-I. Les complexes CMH-Ip sont exportés à la membrane et présentés aux lymphocytes T CD8 $^+$ spécifiques en présence de signaux de costimulation et d'un support Th1. Cette présentation aboutit à l'activation des lymphocytes T CD8 $^+$ anti-viraux, les lymphocytes T CD8 $^+$ autoréactifs ayant été éliminés.

forte prolifération et la différenciation des LT CD8⁺ endogènes ou transgéniques en effecteurs cytotoxiques aussi efficacement que l'injection d'anti-CD40 (Schulz et al., 2005). De plus, la différenciation des effecteurs cytotoxiques est dépendante de l'expression du TLR3 par les cellules présentatrices d'antigènes. Le TLR3 est sélectivement exprimé par les DC CD8α⁺ (Edwards et al., 2003) et reconnaît spécifiquement les ARN doubles brins viraux et leur analogue synthétique Poly(I:C) (Alexopoulou et al., 2001). Son engagement par les cellules infectées ou chargées en Poly(I:C) dans les DC CD8α⁺ induit leur production de cytokines inflammatoires et leur expression de molécules de costimulation (Schulz et al., 2005) (Figure 3).

Ainsi, les DC CD8α⁺, pourvu qu'elles soient phénotypiquement et fonctionnellement matures, sont capables d'induire une réponse T CD8⁺ effectrice par présentation croisée des antigènes. Dans le cas d'une infection virale, la reconnaissance d'ARN doubles brins suffit à les éduquer pour induire une réponse effectrice. En conséquence, certaines réponses cytotoxiques antivirales apparaissent indépendantes d'un support par les LT CD4⁺ pour leur induction (Ahmed et al., 1988; Buller et al., 1987; Hou et al., 1995; Tripp et al., 1995). En revanche, les LT CD4⁺ sont indispensables à la survie des LT CD8⁺ et au maintien d'une réponse mémoire (Bevan, 2004; Hamilton-Williams et al., 2005; Smith et al., 2004).

1.3.3 Relativisation du modèle et implication des DC migratrices dans l'induction d'immunité et de tolérance

Toutes les études précédemment citées soulignent le rôle crucial des DC CD8α⁺ dans l'induction de tolérance ou d'immunité par présentation croisée des antigènes cellulaires. Ces conclusions restent cependant à nuancer du fait de la prévalence de modèles récurrents. En effet, la plupart des études utilisent le même modèle antigénique Ovalbumine/OT-I. De plus, lorsque les antigènes tels que les splénocytes chargés sont apportés par voie intraveineuse, seules les DC spléniques qui ne contiennent pas de DC migratrices sont visées. Enfin, certaines DC possèdent la capacité d'acquérir le marqueur CD8α et pourraient contaminer la population CD8α⁺ résidente dans les ganglions.

Ainsi, dans d'autres modèles, l'implication des DC migratrices dans l'induction de la tolérance au soi a été démontrée. Notamment, dans le modèle de tolérance induite aux antigènes pancréatiques chez la souris NOD précédemment cité, les antigènes pancréatiques sont présentés aux LT CD8⁺ par les DC migratrices CMH-II^{hi} CD11b⁺ du ganglion drainant (Hugues et al., 2002). Dans d'autres modèles, les DC migratrices sont également impliquées

dans l'induction de la tolérance périphérique. Les variations observées dans la contribution relative de ces populations semblent dépendre du modèle antigénique utilisé, de la localisation des antigènes du soi étudiés, ou de la voie d'administration de l'antigène. Ainsi, les cellules de Langerhans sont impliquées dans la prévention de l'hypersensibilité de contact (Kaplan et al., 2005) et dans l'induction de tolérance aux antigènes du soi épithéliaux (Stoitzner et al., 2006; Waithman et al., 2007). De même, les DC interstitielles migratrices CD11b⁺ et les DC interstitielles migratrices CD103⁺ sont respectivement impliquées dans l'induction de tolérance par présentation croisée de l'ovalbumine délivrée par voie intra-gastrique (Chung et al., 2005) et par voie aérienne (del Rio et al., 2007).

Dans l'induction d'immunité anti-virale également, l'implication sélective des DC CD8 α ⁺ ganglionnaires dans la présentation croisée des antigènes viraux après infection par HSV1 a récemment été remise en question. En effet, le groupe d'Iwasaki, a démontré un rôle au moins équivalent des DC CD8 α ⁻ (Lee et al., 2009). Ces DC CD8 α ⁻ contiennent les DC interstitielles migratrices DEC205^{int} et les DC CD8 α ⁻ résidentes DEC205⁻ qui présentent toutes deux les antigènes viraux. Les auteurs ont expliqué cette discordance avec les résultats du groupe de Heath et Carbone par des différences dans le protocole de purification des sous populations de DC. Les DC CD8 α ⁻ purifiées selon le protocole initial (Allan et al., 2003; Belz et al., 2004a; Smith et al., 2003) sont en effet contaminées par des cellules NK qui interfèrent dans l'activation des LT CD8⁺ (Lee et al., 2009). De plus, la supériorité numérique des DC CD8 α ⁻ suggère que ces cellules sont majoritairement responsables de l'induction de la réponse T CD8⁺ anti-virale. De même, durant la seconde phase de l'infection par HSV1 la présentation croisée des antigènes viraux est majoritairement le fait des DC dermiques migratrices DEC205^{int} CD103⁺ (Bedoui et al., 2009).

1.3.4 La présentation croisée par les DC CD8 α ⁻ est inductible

1.3.4.1 L'absence de présentation croisée par les CD8 α ⁻ en condition physiologique n'est pas liée à une absence de capture des antigènes

Si la présentation croisée de l'ovalbumine soluble (Pooley et al., 2001), cellulaire (den Haan et al., 2000) ou associée à des particules inertes (Schnorrer et al., 2006) injectées par voie intraveineuse est restreinte aux DC CD8 α ⁺ spléniques, les DC CD8 α ⁻ présentent efficacement l'ovalbumine aux LT CD4⁺ spécifiques sous ces trois formes (Pooley et al., 2001; Schnorrer et al., 2006). Bien que les DC CD8 α ⁺ capturent sélectivement les cellules apoptotiques (Iyoda

et al., 2002; Schulz and Reis e Sousa, 2002), les DC CD8 α ⁻ capturent efficacement toutes les autres formes antigéniques suggérant que la fonction de présentation croisée n'est pas limitée par la capture des antigènes. Dans ce sens, la délivrance dirigée d'ovalbumine aux DC CD8 α ⁺ et CD8 α ⁻ par des anticorps ciblant respectivement les molécules DEC205 et 33D1/DCIR2 conduit à l'activation des OT-I par les DC CD8 α ⁺ et des OT-II par les DC CD8 α ⁻. De plus, l'expression réciproque des protéines impliquées dans le traitement des antigènes associés aux molécules du CMH-I et II par ces deux sous populations serait en faveur de la présentation croisée par les DC CD8 α ⁺ et de la présentation classique par les DC CD8 α ⁻ (Dudziak et al., 2007). Ainsi, chacune des deux populations semble spécialisée dans un mode de présentation en condition physiologique. Il a ainsi été proposé initialement que les CD8 α ⁻ ne possédaient pas la machinerie nécessaire pour réaliser la présentation croisée.

1.3.4.2 Induction de la présentation croisée par des récepteurs activateurs

Les DC CD8 α ⁻ présentent cependant efficacement l'ovalbumine aux cellules OT-I lorsque celle-ci est associée en complexes immuns (OVA-IC) (den Haan and Bevan, 2002). L'acquisition de cette capacité ne semble pas liée à une augmentation de la capture mais plutôt à un signal positif fourni par les récepteurs Fc γ . En effet, les DC CD8 α ⁻ issues de souris déficientes pour la chaîne γ des FcR sont encore capables de capturer et de présenter les complexes OVA-IC aux cellules OT-II mais perdent la capacité à effectuer la présentation croisée. De même, le ciblage des récepteurs Fc γ R induit la maturation d'une lignée de DC myéloïdes spléniques (CD11b⁺ CD8 α ⁻) semblable aux DC CD8 α ⁻ et favorise la présentation croisée des antigènes (Regnault et al., 1999; Rodriguez et al., 1999; Schuurhuis et al., 2002). Cependant, la maturation des DC par elle-même n'est pas suffisante pour induire la présentation croisée qui dépend également dans ce modèle d'un signal fourni par les récepteurs Fc γ R (Schuurhuis et al., 2002). Ce signal n'est en revanche pas nécessaire à la présentation croisée des complexes immuns par les DC CD8 α ⁺ confirmant la compétence constitutive de ces cellules pour cette fonction (den Haan and Bevan, 2002).

Ainsi, le ciblage de récepteurs possédant des domaines de signalisation intracellulaire activateurs, impliqués ou non dans la capture, tels que les Fc γ R pour les DC CD8 α ⁻ mais également le récepteur du mannose (MR) (Burgdorf et al., 2006; Burgdorf et al., 2007) et CLEC9A (Sancho et al., 2009) pour les DC CD8 α ⁺ peut favoriser le traitement des antigènes exogènes en faveur de la présentation croisée en activant la machinerie de présentation croisée ou en protégeant les endosomes de la dégradation.

1.3.4.3 Induction de la présentation croisée par des ligands des TLR

Les DC CD8 α^- sont également capables de présenter l'ovalbumine aux cellules OT-I lorsque celle-ci est exprimée par la bactérie *Escherichia Coli* (Schulz and Reis e Sousa, 2002). De même l'injection de LPS *in vivo* amplifie considérablement la présentation croisée de l'ovalbumine soluble par les DC CD8 α^- (Pooley et al., 2001). De plus, l'ovalbumine conjuguée à des oligodésoxyribonucléotides contenant des séquences CpG immunostimulatrices (ODN-CpG) est beaucoup plus efficacement présentée aux LT CD8 $^+$ *in vivo* que l'ovalbumine soluble injectée en présence d'ODN-CpG. Dans ce cas cependant, la capture de l'ovalbumine est augmentée par des récepteurs de l'ADN et pourrait expliquer cet effet bien que le recrutement d'autres sous populations de DC pour la présentation croisée ne puisse être exclu (Maurer et al., 2002). Le rôle des TLR-L et notamment des composés microbiens dans l'induction de la production de cytokines et de l'expression des molécules de costimulation qui participent à la construction d'une réponse adaptative est bien connu (Akira et al., 2001). Pour la présentation croisée par les DC dérivées de cultures de moelle osseuse, les TLR-L ont été également impliqués dans l'activation de la machinerie intracellulaire (Datta et al., 2003). Plus récemment, la présence d'endotoxine contaminant les lots d'ovalbumine a été associée à la translocation des transporteurs TAP dans les endosomes favorisant le chargement des molécules du CMH-I (Burgdorf et al., 2008).

Ainsi, l'engagement des TLR, en addition avec l'induction de la maturation des DC, peut fournir un signal complémentaire favorisant le traitement et la présentation croisée des antigènes. Dans ce sens, les souris déficientes pour la molécule adaptatrice MyD88 impliquée dans la signalisation par tous les TLR sauf TLR3 présentent un défaut pour la présentation croisée indépendamment de l'état de maturation des DC (Palliser et al., 2004).

1.3.4.4 Induction de la présentation croisée lors d'infections virales

Enfin, les DC CD8 α^- présentent efficacement l'ovalbumine apportée sous une forme particulière très immunogénique telle que les pseudo-particules virales (Moron et al., 2002). De façon intéressante, ces pseudo-particules sont d'abord présentées par les DC CD8 α^- puis plus tardivement par les DC CD8 α^+ . Cette présentation croisée tardive par les DC CD8 α^+ s'accompagne de l'apparition d'une nouvelle population mixte CD11b $^+$ CD8 α^+ qui représente une part importante des DC CD8 α^+ . L'acquisition du marqueur CD8 α par les DC CD11b $^+$ en

réponse aux pseudo-particules virales n'est pas associée à une synthèse de *novo* ce qui distingue ces cellules des DC CD8 α^+ conventionnelles mais plutôt à un transfert et s'accompagne d'une maturation phénotypique. L'implication relative des DC CD11b $^+$ CD8 α^+ et des DC CD8 α^+ conventionnelles dans la présentation croisée tardive n'est pas identifiée. Cependant, l'apparition de cette nouvelle population et la présentation croisée par les DC CD8 α^+ est abrogée dans les souris déficientes pour l'enzyme de recombinaison du TCR Rag 2 suggérant d'une part que les LT sont impliqués dans ce phénomène et d'autre part que les DC CD11b $^+$ CD8 α^+ sont les cellules présentatrices. En revanche, la présentation croisée précoce par les DC CD8 α^- n'est pas ou peu affectée par l'absence de LT. Ainsi, les pseudo-particules virales apportent un signal non identifié qui active rapidement la machinerie de présentation croisée des DC CD8 α^- . Par la suite, les LT induisent l'acquisition du marqueur CD8 α par certaines de ces DC et favorisent ainsi la présentation croisée par les DC CD8 α^+ .

Ainsi, les DC CD8 α^- possèdent la machinerie pour présenter les antigènes exogènes aux LT CD8 $^+$ spécifiques, mais contrairement aux DC CD8 α^+ , cette machinerie est contrôlée par des facteurs induits par l'activation. En revanche, les DC CD8 α^- présentent efficacement les antigènes exogènes aux LT CD4 $^+$ en condition physiologique alors que les DC CD8 α^+ acquièrent cette capacité après activation. Cette dichotomie pourrait protéger l'organisme contre l'induction de réponses auto-réactives et le développement de maladie auto-immune. En revanche, en conditions pathologiques, toutes les sous populations peuvent participer à l'élaboration d'une réponse adaptative effectrice.

1.4 Cellules dendritiques conventionnelles humaines et équivalence possible avec les populations murines

L'homme et la souris présentent de grandes différences quant à l'accessibilité et la quantité des prélèvements. Ainsi, chez l'homme, nombre d'études sont réalisées à partir de prélèvements sanguins qui contiennent les précurseurs des DC périphériques et des organes lymphoïdes. Cependant, dans les deux espèces, les DC sont caractérisées par l'expression des molécules du CMH-II et par l'absence des marqueurs de lignage. Deux populations de précurseurs de DC ont été caractérisées dans le sang humain. L'une exprime l'intégrine CD11c, les marqueurs myéloïdes CD13, CD33, CD45RO et le récepteur du GM-CSF (GM-CSFR) et présente une morphologie proche des monocytes (O'Doherty et al., 1994; Robinson et al., 1999). Ces cellules acquièrent la morphologie caractéristique des cellules dendritiques

en culture. Les DC CD11c⁺ circulantes ainsi que les DC CD11c⁺ des organes lymphoïdes sont qualifiées de myéloïdes chez l'homme et leur correspondance aux DC conventionnelles CD11c^{high} murines a été proposée. Comme chez la souris, les DC CD11c⁺ humaines regroupent au moins deux sous populations distinguées par l'expression relative des antigènes CD1c (BDCA-1) et CD141 (BDCA-3) (Dzionek et al., 2000; Narbutt et al., 2004). Aucune de ces populations n'exprime le marqueur CD8 α . Cependant, les DC BDCA-3⁺ expriment sélectivement CLEC9A et sont ainsi supposées représenter l'équivalent humain des DC CD8 α ⁺ murines (Huysamen et al., 2008). De plus, une analyse de transcriptome extensive réalisée par le groupe de Marc Dalod a démontré un profil génomique commun entre les DC BDCA1⁺ humaines et les cDC CD11b⁺ murines d'une part et les DC BDCA-3⁺ humaines et les cDC CD8 α ⁺ murines d'autre part (Robbins et al., 2008). Notamment, les DC BDCA1⁺ et les cDC CD11b⁺ partagent l'expression préférentielle des gènes impliqués dans le traitement des antigènes associés aux molécules du CMH-II (Dudziak et al., 2007). De même, les DC BDCA-3⁺ partagent avec les cDC CD8 α ⁺ l'expression sélective du TLR3 (Schulz et al., 2005). Les sous populations sont cependant plus proches au sein d'une même espèce que de leur probable équivalent chez l'autre espèce (Robbins et al., 2008) et aucune homologie fonctionnelle n'a encore été établie.

CHAPITRE II
Rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans
l'immunité

2.1 Découverte et description des cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines et murines

Une seconde population de DC décrite dans le sang humain est caractérisée par son phénotype plus immature que les DC CD11c⁺, par l'expression des marqueurs CD4 CD45RA et IL-3R α /CD123 en l'absence des marqueurs de lignage, du CD11c et des marqueurs myéloïdes ainsi que par sa morphologie particulière rappelant les plasmocytes (O'Doherty et al., 1994; Robinson et al., 1999). Des cellules présentant une morphologie et un phénotype similaires avaient été décrites dès 1958 dans les zones T des organes lymphoïdes inflammés et nommées successivement plasmocytes associés aux T (Lennert et al., 1975) (1^{ère} publication en 1958 en allemand), cellules T plasmacytoïdes (Feller et al., 1983) puis monocytes plasmacytoïdes (Facchetti et al., 1988). En 1997, Grouard et al. et Olweus et al ont caractérisé ces cellules isolées à partir des amygdales et démontré leur correspondance phénotypique et fonctionnelle avec les DC CD11c⁻ immatures du sang périphérique (Grouard et al., 1997; Olweus et al., 1997). En conséquence, le terme descriptif de DC plasmacytoïdes (pDC) a été communément adopté pour désigner ces cellules à la fois dans le sang et les organes lymphoïdes. En 1999, Siegal et al. et Cella et al ont démontré que les pDC immatures du sang périphérique (Siegal et al., 1999) et des organes lymphoïdes secondaires (Cella et al., 1999) correspondent aux cellules productrices d'interférons (IFN) naturelles (IPC ou NIPC) décrites depuis le début des années 80 comme la population du sang responsable de la production d'IFN de type I en réponse à la plupart des virus et des bactéries (Fitzgerald-Bocarsly, 1993). En tant que cellules productrices d'IFN de type I, les pDC sont impliquées de façon cruciale dans l'immunité anti-virale. Les IFN de type I sont en effet reconnus depuis 1957 pour leurs propriétés anti-virales. Ils jouent un rôle direct majeur en inhibant la réplication et la dissémination virale et en activant les mécanismes de résistance cellulaire aux infections (Katze et al., 2002). Les pDC sont ainsi nécessaires à la limitation de l'expansion virale lors de l'infection pulmonaire par le virus respiratoire syncytial (RSV) (Smit et al., 2006; Wang et al., 2006).

L'identification plus tardive des pDC murines a initialement conduit les chercheurs à considérer que les DC conventionnelles CD8 α ⁺ murines constituaient l'équivalent murin des pDC humaines. En effet, ces deux populations ont été suggérées d'origine lymphoïde et sont peu immuno-stimulatrices en réactions allogéniques en comparaison avec les DC myéloïdes CD11c⁺ chez l'homme et CD8 α ⁻ chez la souris (O'Doherty et al., 1994; Suss and Shortman,

1996). Cependant, sur la base de leur capacité à produire de l'interféron en réponse à une stimulation virale, l'équivalent murin des pDC a finalement été identifié simultanément par plusieurs groupes (Asselin-Paturel et al., 2001; Bjorck, 2001; Nakano et al., 2001). Les pDC murines partagent beaucoup de caractéristiques phénotypiques avec les pDC humaines telles que l'absence d'expression des marqueurs des LT (CD3 CD8 β et TCR), des LB (CD19, CD20 et Ig de surfaces), et de la lignée myéloïde (CD14 CD13 CD33 et CD11b). Contrairement aux pDC humaines, les pDC murines expriment l'intégrine CD11c bien que plus faiblement que les cDC. De plus, les pDC murines diffèrent de leur homologue humain par leur faible expression du récepteur de l'IL-3, par leur expression inductible du marqueur CD8 α et par leur forte expression des marqueurs Ly6C et CD45R/B220 (Asselin-Paturel et al., 2001; O'Keeffe et al., 2002). Les pDC humaines et murines expriment également un certain nombre d'antigènes de surface plus ou moins spécifiques qui diffèrent selon l'espèce étudiée. Ainsi, les pDC humaines expriment les antigènes BDCA-2 et BDCA-4 dont les équivalents murins n'ont pas été identifiés (Dzionek et al., 2000). BDCA-2 est une lectine de type C dont l'expression sélective par les pDC est régulée négativement au cours de la maturation (Dzionek et al., 2001). BDCA-4 ou neuropiline-1 est un récepteur multifonctionnel également exprimé par d'autres types cellulaires mais plus fortement exprimé par les pDC dans le sang et les amygdales et dont la fonction exacte dans la biologie des pDC est encore inconnue (Dzionek et al., 2002). Les pDC murines expriment pour leur part sélectivement la lectine de type I Siglec-H (Blasius et al., 2004; Blasius et al., 2006a; Zhang et al., 2006) et la lectine de type C Ly49Q récepteur spécifique de la molécule du CMH-I H-2K^b (Kamogawa-Schifter et al., 2005; Tai et al., 2007). De même, la forte expression de BST2 (mPDCA1) par les pDC murines permet d'identifier sélectivement ces cellules en condition d'homéostasie (Asselin-Paturel et al., 2003). Cependant, cet antigène est également exprimé par différentes lignées cellulaires murines et humaines de diverses origines et est inductible sur de nombreux types cellulaires par les IFN de type I (Blasius et al., 2006b; Cao et al., 2009). BST2 n'est que peu ou pas exprimé par les pDC humaines qui expriment en revanche spécifiquement ILT7, un récepteur de BST2 absent chez la souris (Cao et al., 2006; Cao et al., 2009).

	Organe d'origine	Traitement <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Enrichissement			Critère de tri par cytométrie en flux
			Gradient	Déplétion	MACS®	
Asselin Paturel 2001	rates moelle osseuse			CD3 CD8 β CD19 CD11b		(CD19 CD3 ϵ CD5 DX5 CD11b)- CD11c+ Ly6G/C+
Bjorck 2001	rates	Flt3L <i>in vivo</i>			CD11c	(CD11b, slg, CD3)- B220+
Martin 2002	Thymus		Optiprep	CD3 slg DEC205	CD11c	
O'Keeffe 2002	rates thymus ganglions		Nicodenz	CD3 Thy 1 CD19 GR1 TER119		CD11c+ CD45RA+
Krug 2003	rates				CD11c	CD11b- CD11c+ Ly6G/C+
Boonstra 2003	rates			CD3 CD19 TER119		CD11c+ B220+
Dalod 2003	rates				CD11c	CD11c+ Ly6G/C+
Bilsborough 2003	ganglions	Flt3L <i>in vivo</i>	Nycodenz			CD11c ^{low} CD8 α +
Schelcht 2004	rates				CD11c	CD11c+ B220+
Salio 2004	moelle osseuse	Culture en Flt3L			CD11c	CD11b- CD19- CD11c+ B220+
	rates				CD11c	CD11c+ B220+ Ly6G/C+
De Heer 2004	ganglions					CD11c+ B220+ Ly6G/C+
	moelle osseuse	Culture en Flt3L				CD11b- CD11c+ B220+
Wang 2006	moelle osseuse	Culture en Flt3L				CD11b- CD11c+ B220+
Lou 2007	moelle osseuse	Flt3L <i>in vivo</i>				CD11b- CD11c+ B220+
Sapoznikov 2007	rates ganglions souris CD11c-DTR	Toxine diphtérique			PDC	
Mouries 2008	rates				PDCA1	
Young 2008	rates ganglions		Nicodenz	CD3 Thy 1 CD19 GR1 TER119		CD11c+ CD45RA+
Liu 2008	moelle osseuse	Flt3L <i>in vivo</i>				CD11b- CD11c+ B220+
Goubier 2008	Foie				CD11c	CD11b- NK1.1- CD11c+ 120G8+
Colvin 2009	moelle osseuse	Culture en Flt3L			B220	
Kool 2009	moelle osseuse	Culture en Flt3L				CD11b- CD11c+ B220+ 120G8+

Table 2 : Modèles d'études des pDC murines

Légende

Flt3L : fms-like tyrosine kinase 3 ligand

slg : Immunoglobulines de surface

MACS® : Magnetic cell sorting (tri cellulaire magnétique)

Encadré 2 : Modèles d'étude des pDC

Les pDC sont des cellules rares qui ne représentent chez l'homme qu'une très faible proportion des cellules mononucléées du sang (0.01% à 0.05%) (Cella et al., 1999) et environ 0.5% des cellules de l'amygdale (Lindstedt et al., 2005). La plupart des études sur les pDC humaines ont ainsi été réalisées *in vitro* à partir de pDC isolées du sang ou des amygdales par sélection positive des cellules BDCA4⁺ par des billes magnétiques (Dalgaard et al., 2005; Dzionek et al., 2001; Ito et al., 2006; Krug et al., 2001; Salio et al., 2003; Schnurr et al., 2005) ou par tri par cytométrie en flux sur la base de l'absence d'expression des marqueurs de lignage et du CD11c, et l'expression des marqueurs CD4 (Fonteneau et al., 2003; Grouard et al., 1997; Kadowaki et al., 2000; Siegal et al., 1999) et/ou CD123 (Ito et al., 2006; Moseman et al., 2004). Ces protocoles conduisent à l'obtention de préparations plus ou moins pures dont les cellules contaminantes ont parfois amené à des résultats contradictoires notamment vis-à-vis de la capacité des pDC humaines à sécréter de l'IL-12, capacité qui a été réfutée par la suite (Ito et al., 2006; Krug et al., 2001). Chez la souris, les pDC isolées *ex-vivo* proviennent généralement de la rate où elles représentent également une faible proportion des cellules qui est de plus variable selon la souche de souris étudiée de ~0.1% des cellules spléniques totales chez les souris C57BL/6 à ~0.8% chez les souris 129Sv (Asselin-Paturel et al., 2003). Les pDC murines sont généralement enrichies par sélection positive des cellules CD11c⁺ ou BST2⁺ par des billes magnétiques et/ou purifiée par tri en cytométrie en flux bien que les combinaisons de marqueurs utilisés pour les identifier varient selon les études (Table 2).

Le nombre de pDC peut être augmenté *in vivo* dans le sang et les organes lymphoïdes chez l'homme (Pulendran et al., 2000) et la souris (Bjorck, 2001; Kool et al., 2009; Smit et al., 2008) par traitement par le Flt3L (*fms-like tyrosine kinase 3 ligand*). Le Flt3L apparaît ainsi comme la cytokine critique pour le développement des pDC à partir des cellules souches hématopoïétiques. Les pDC humaines peuvent également être générées *in vitro* à partir de progéniteurs CD34⁺ isolés du foie foetal, de la moelle osseuse ou du sang de cordon en présence de Flt3L (Blom et al., 2000), ou sous l'action de la thrombopoïétine et du Flt3L (Chen et al., 2004). Bien qu'elles permettent d'obtenir un nombre conséquent de pDC (jusqu'à 6.10⁶ pDC pour 1.10⁶ progéniteurs), ces cultures sont très longues (20 à 25 jours) et n'ont que peu été utilisées. En revanche, il existe une lignée dérivée d'une leucémie à pDC (Chaperot et al., 2001) partageant des caractéristiques communes avec les pDC humaines normales (Chaperot et al., 2004) qui est plus couramment utilisée pour modéliser les pDC en première approche expérimentale (Chaperot et al., 2006; Di Domizio et al., 2009; Lui et al., 2009; Manches et al., 2008).

Chez la souris, les pDC peuvent également être générées *in vitro* en présence de Flt3L à partir de progéniteurs de la moelle osseuse (Brawand et al., 2002). Cependant, les pDC générées *in vitro* semblent présenter certaines différences fonctionnelles avec les pDC isolées *ex vivo* (Boonstra et al., 2003; Mouries et al., 2008; Salio et al., 2004).

Peu d'études fonctionnelles des pDC ont été réalisées *in vivo*. Le rôle des pDC dans les réponses immunes a cependant été abordé *in vivo* par des stratégies de déplétion des pDC par injection d'anticorps anti-Ly6G/C (Barchet et al., 2002; Dalod et al., 2002) bien que cet anticorps ne soit pas spécifique des pDC ou par injection d'anti-BST2 (anticorps 120G8) (Asselin-Paturel et al., 2003; GeurtsvanKessel et al., 2008; Kool et al., 2009; Smit et al., 2008; Wang et al., 2006; Yoneyama et al., 2005). Le rôle des pDC peut également être évalué indirectement par déplétion des cDC par la toxine diphtérique chez les souris CD11c-DTR. Cette déplétion n'affecte pas les pDC du fait de leur plus faible expression du CD11c (Sapozhnikov et al., 2007). Par ailleurs, les souris déficientes pour des facteurs de transcription essentiels pour le développement des pDC tels qu'Ikaros (Allman et al., 2006) et E2-2 (Cisse et al., 2008) constituent deux modèles murins dépourvus de pDC permettant l'étude du rôle spécifique des pDC dans les réponses immunes.

2.2 Localisation et migration des pDC en condition physiologique et inflammatoire

Initialement identifiées dans le sang et les zones T des organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) inflammés autour des veinules post capillaires (HEV), les pDC sont également présentes dans la moelle osseuse et le thymus chez l'homme comme chez la souris (Asselin-Paturel et al., 2001; Bendriss-Vermare et al., 2001; Martin et al., 2002; O'Keeffe et al., 2003).

La présence des pDC dans les ganglions lymphatiques fœtaux stériles atteste de leur migration constitutive vers ces organes (Olweus et al., 1997). Les pDC à l'inverse des cDC sont généralement supposées entrer dans les organes lymphoïdes par la voie sanguine et non par la lymphe par un processus similaire aux LT (Yoneyama et al., 2004). En effet, les pDC du sang expriment la sélectine L (CD62-L) et celle-ci est perdue dans les amygdales (Cella et al., 1999) suggérant son implication dans l'adhésion des pDC aux cellules endothéliales des HEV. De plus, la fréquence des pDC est très fortement diminuée dans les organes lymphoïdes des souris déficientes en CD62L (Nakano et al., 2001). La chimiokine CXCL12/SDF-1 et la Chémérine constitutivement produites au niveau des HEV et reconnues respectivement par les récepteurs CXCR4 et ChemR23 semblent préférentiellement impliquées dans le recrutement et l'extravasation des pDC (Krug et al., 2002; Vermi et al., 2005). En effet, bien que les pDC fraîchement isolées expriment d'autres récepteurs dont CXCR3, seuls CXCR4 et ChemR23 semblent fonctionnels et induisent la migration des pDC en réponse à leurs ligands respectifs *in vitro* (Krug et al., 2002; Penna et al., 2001; Penna et al., 2002; Vanbervliet et al., 2003; Vermi et al., 2005).

La migration des pDC vers les organes lymphoïdes secondaires est également considérablement amplifiée en condition d'inflammation. Ce phénomène impliquerait une coopération fonctionnelle entre la chimiokine CXCL12 constitutive et les chimiokines inflammatoires inductibles telles que CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG et CXCL11/I-TAC libérées par les HEV pendant l'inflammation et reconnues par CXCR3. En effet, les ligands de CXCR3 amplifient la migration des pDC en réponse à CXCL12 *in vitro* (Krug et al., 2002; Vanbervliet et al., 2003). Dans ce sens, les pDC murines déficientes pour CXCR3 échouent à rejoindre les ganglions inflammés dans un modèle d'infection cutanée par HSV (Yoneyama et al., 2005). La sélectine E induite lors d'une infection semblerait également impliquée dans le recrutement des pDC au niveau des ganglions inflammés *in vivo*. Ainsi, lors d'une infection systémique ou locale, les pDC et les cDC présentent un profil de migration distinct, les pDC

se dirigeant vers les ganglions inflammés et les mDC vers les tissus (Yoneyama et al., 2004; Yoneyama et al., 2005). *In vivo*, d'autres signaux plus tardifs tel que l'induction de CCR7 et ses ligands CCL19/ECL et CCL21/MIP-3 β , peuvent contribuer au recrutement des pDC mais également des cDC matures dans les zones T des organes lymphoïdes inflammés (Asselin-Paturel et al., 2005).

Contrairement aux cDC, les pDC ne sont généralement pas présentes dans les tissus périphériques tels que la peau et les muqueuses en condition physiologique (Wollenberg et al., 2002) mais peuvent être retrouvées en faible quantité dans les poumons et le foie (Asselin-Paturel et al., 2001). En revanche les pDC sont recrutées en grand nombre dans les tissus inflammés. Notamment, les pDC s'accumulent dans les poumons des souris infectées par le virus Influenza (GeurtsvanKessel et al., 2008) ou par le virus respiratoire syncytial (RSV) (Smit et al., 2006). De même, le traitement de patients allergiques avec les allergènes correspondants induit un recrutement massif de pDC dans la muqueuse nasale (Jahnsen et al., 2000). Dans un modèle murin d'allergie, les pDC sont également fortement recrutées dans les poumons des souris lors d'une exposition à l'antigène (Kool et al., 2009).

Les pDC s'accumulent également dans les lésions cutanées induites par diverses pathologies inflammatoires infectieuses telles que les éruptions cutanées associées à l'infection par les virus de l'herpès et de la varicelle (Kohrgruber et al., 2004) ou non infectieuses telles que la dermatite de contact allergique, le lupus érythémateux systémique (SLE), le lichen plan buccal et le psoriasis (Parolini et al., 2007; Wollenberg et al., 2002). Dans ces trois dernières pathologies, la Chémérine, absente dans la peau saine est sélectivement exprimée par les cellules endothéliales dermales dans les lésions cutanées et cette expression est corrélée à la présence à proximité de pDC ChemR23⁺ (Albanesi et al., 2009; Parolini et al., 2007; Vermi et al., 2005).

Les pDC infiltrent également de nombreuses tumeurs telles que les mélanomes (Palamara et al., 2004; Salio et al., 2003; Vermi et al., 2003), les tumeurs cervicales (Bontkes et al., 2005), les tumeurs de la tête et du cou (Hartmann et al., 2003), les tumeurs de la thyroïde (Tsuge et al., 2005), les tumeurs ovariennes métastatiques (Zou et al., 2001), les tumeurs du poumon (Perrot et al., 2007) et les tumeurs mammaires (Treilleux et al., 2004). Dans le cas des tumeurs ovariennes, CXCL12 est produite par le tissu tumoral et semble recruter spécifiquement les pDC à partir du sang. Notamment, CXCL12 induit l'expression de l'intégrine VLA-5 sur les pDC et favorise ainsi leur transmigration endothéliale (Zou et al., 2001). En revanche, CXCL12 ne semble pas impliqué dans le recrutement des pDC au niveau des tumeurs de la tête et du cou (Hartmann et al., 2003).

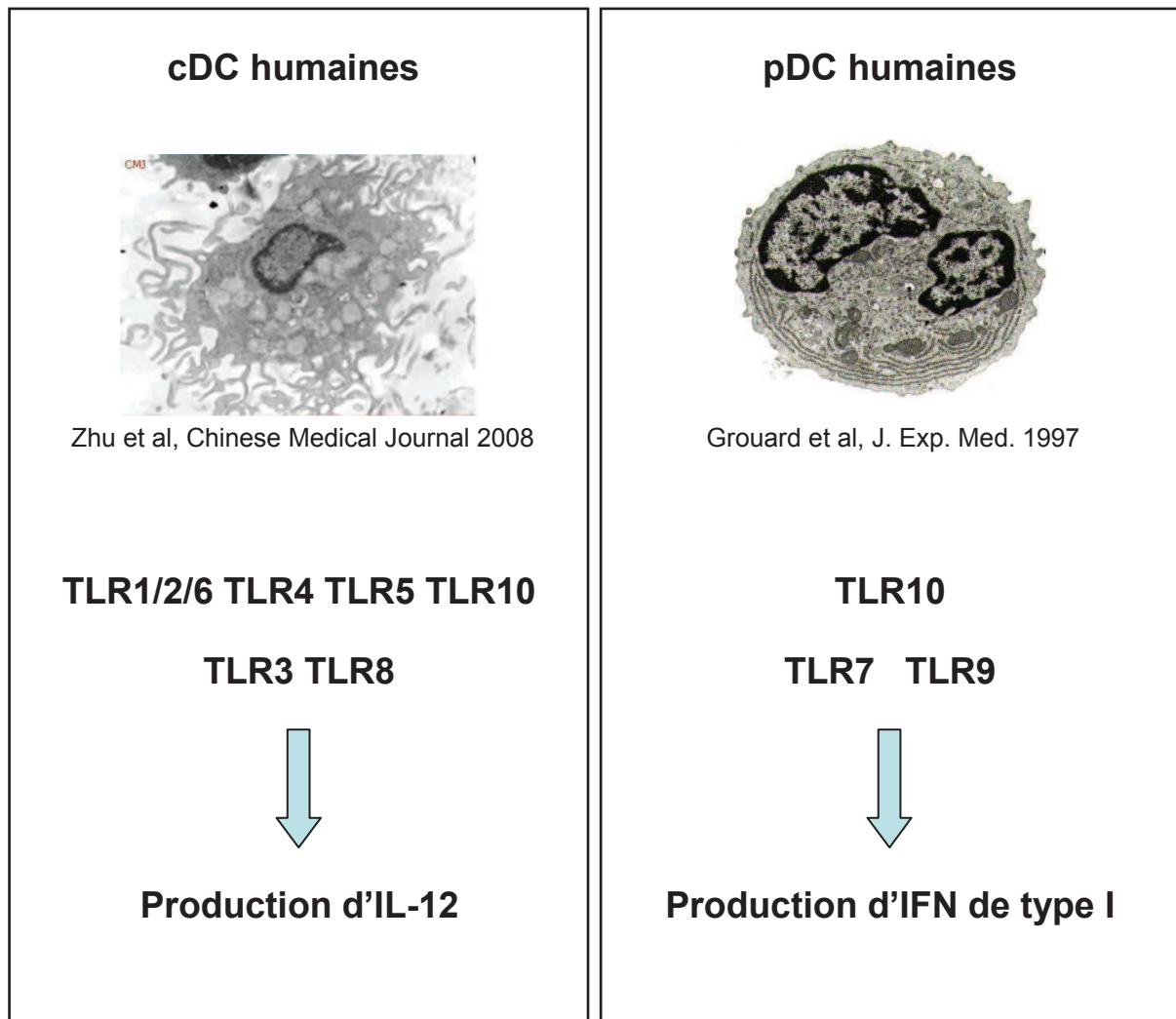


Figure 4 : Expression relative des TLR par les cDC et les pDC humaines.

Les cDC humaines isolées du sang ou dérivées de monocytes expriment un large répertoire de TLR extracellulaires spécialisant ces cellules dans la détection des bactéries et la production d'IL-12. En revanche, les pDC humaines expriment sélectivement les TLR7 et -9 et sont spécialisées dans la détection des virus et la production d'IFN de type I.

D'après Kadowaki et al, J. Exp. Med. 2001

2.3 Reconnaissance des pathogènes par les pDC et production d'IFN de type I

2.3.1 Reconnaissance des pathogènes par les pDC

De nombreux récepteurs de l'immunité innée définis précédemment sont impliqués dans la reconnaissance des virus et d'autres pathogènes (Voir encadré Récepteurs de reconnaissance de motifs). Tandis que les cDC humaines expriment les TLR1, -2, -4, -5, -6, et -10 à leur surface permettant la reconnaissance des bactéries et les TLR-3 et -8 dans leurs compartiments endosomaux permettant la reconnaissance des virus, les pDC expriment sélectivement les TLR7 et -9 dans leurs compartiments endosomaux (Figure 4) (Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001). Ces deux récepteurs sont impliqués respectivement dans la reconnaissance 1) des virus à ARN simple brin (Diebold et al., 2004; Lund et al., 2004) et des composés antiviraux synthétiques de type imidazoquinolines tels que l'imiquimod et le resiquimod R-848 (Hemmi et al., 2002) et 2) des motifs CpG hypométhylés naturels ou synthétiques caractéristiques de l'ADN viral (Lund et al., 2003) et bactérien (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000). Ces TLR sont également très fortement exprimés par les pDC murines bien que leur expression soit partagée par d'autres sous populations de cDC (Edwards et al., 2003). A l'inverse des récepteurs cytoplasmiques des ARN doubles brins RIG-I et MDA-5 utilisés par l'ensemble des cellules pour détecter les virus (Kato et al., 2005), la localisation endosomale des TLR spécialisés dans la reconnaissance des nucléotides viraux permet aux pDC de détecter après internalisation de nombreux virus à ADN ou à ARN vivants ou inactivés sans être nécessairement infectées (Asselin-Paturel et al., 2001; Diebold et al., 2004; Krug et al., 2004b; Lund et al., 2003). Cependant, certains virus tels que RSV et le virus Sendai (SV) ne sont reconnus par les pDC qu'après infection et réplication dans le cytoplasme, les nucléotides viraux rejoignant les endosomes par autophagie (Lee et al., 2007).

La majorité des cellules humaines sont capables de produire des IFN de type I lors d'infections virales. Néanmoins, les quantités produites n'ont aucune commune mesure avec les taux énormes sécrétés par les pDC. En effet, ces dernières peuvent produire jusqu'à 1000 fois plus d'IFN- α que les autres populations cellulaires (Siegal et al., 1999). Cette production est de plus extrêmement rapide et détectable dès 8h d'activation bien que les pDC non activées ne contiennent pas d'ARN messager (ARNm) préexistants codants pour les IFN de type I. Cependant, après 6h de stimulation virale près de 60% des ARNm exprimés par les

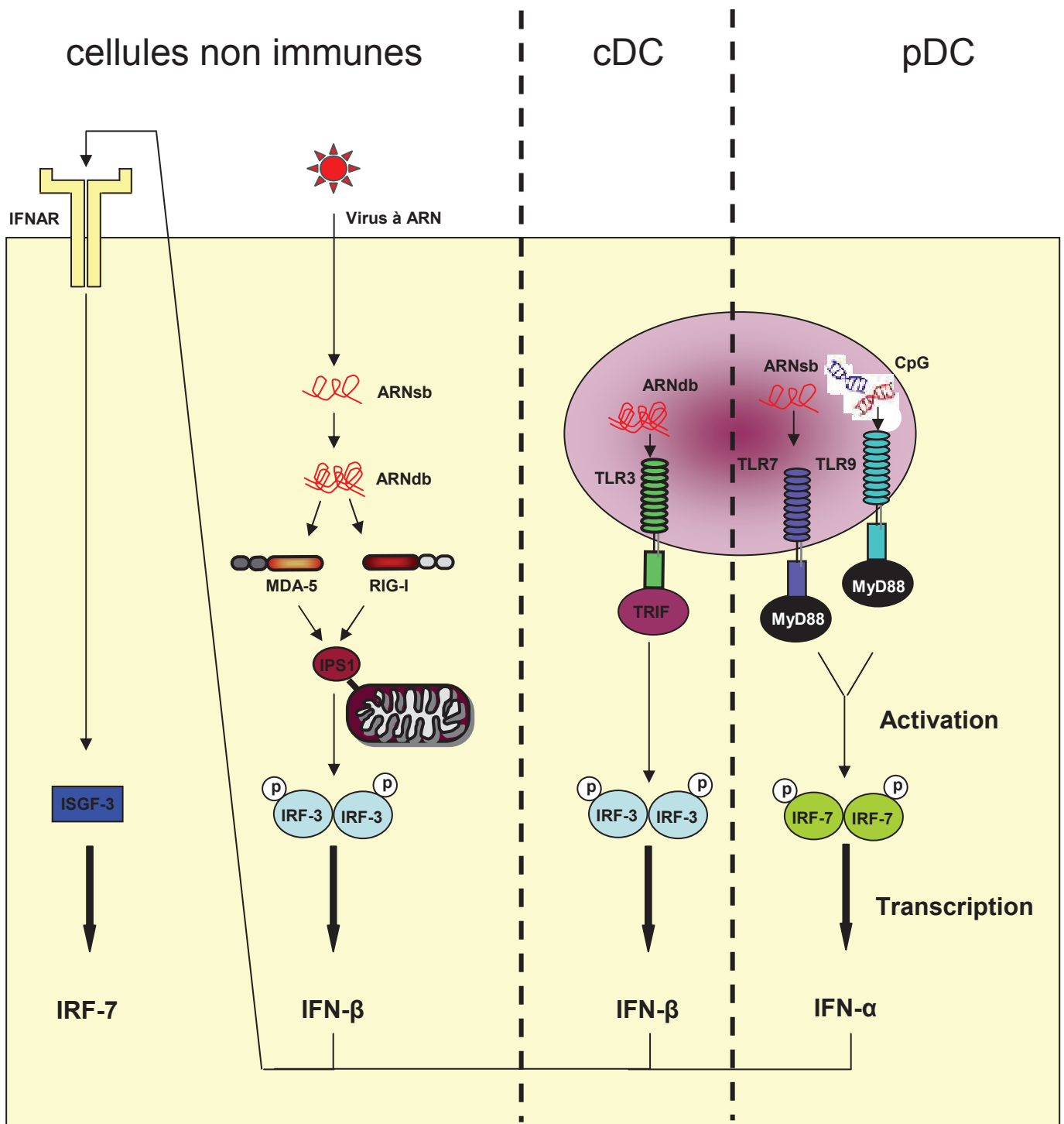


Figure 5 : Régulation précoce de la synthèse d'IFN de type I en réponse à une stimulation virale selon les types cellulaires.

Dans les cellules non immunes et les cDC la production d'IFN-α suite à la reconnaissance de nucléotides viraux nécessite la mise en place d'une boucle autocrine impliquant la synthèse initiale d'IFN-β et sa reconnaissance par le récepteur des IFN de type I (IFNAR) pour produire le facteur de transcription IRF7 nécessaire à l'expression des gènes codant pour les IFN-α. Au contraire, les pDC expriment constitutivement IRF7 et produisent rapidement de grandes quantités d'IFN-α de façon indépendante du récepteur IFNAR.

pDC codent pour les différents membres de la famille des IFN de type I dont la majeure partie pour les IFN- α (Ito et al., 2006).

2.3.2 Voies de signalisation induites par les TLR7 et -9

Pour la majorité des cellules dont les cDC, la production optimale d'IFN de type I induite par les récepteurs cytoplasmiques ou le TLR3 lors d'une infection virale nécessite une production initiale d'IFN- β induite par l'activation du facteur de transcription IRF3 et la mise en place d'une boucle autocrine passant par le récepteur aux IFN de type I (IFNAR) induisant la transcription du facteur de transcription IRF7. L'IRF7 nouvellement synthétisé, potentialise alors la signalisation des PRR (Honda and Taniguchi, 2006). En revanche la sécrétion précoce d'IFN- α par les pDC en réponse aux TLR-L est indépendante de l'expression d'IFNAR (Barchet et al., 2002) et est associée à leur expression constitutive du facteur de transcription IRF7 (Ito et al., 2006; Kerkmann et al., 2003) (Figure 5). La production par les pDC de telles quantités d'IFN de type I est également liée à leur capacité unique par rapport aux cDC à retenir certains TLR-L tel que le CpG-A dans les endosomes précoces où ils peuvent activer durablement la voie IRF7 qui y est restreinte (Honda et al., 2005). Enfin, l'hyper-développement du réticulum endoplasmique dans les pDC, responsable de leur dénomination plasmacytoïde, pourrait également expliquer leur facilité à produire et à sécréter de grandes quantités de protéines. La première vague d'IFN de type I produite par les pDC pourra alors activer via le récepteur IFNAR ubiquitaire la sécrétion d'une seconde vague de façon autocrine sur les pDC (Honda et al., 2005; Kerkmann et al., 2003) ou paracrine sur les autres cellules dépendante cependant de l'activation des PRR.

Les pDC murines et humaines exposées aux ligands des TLR7 et -9 produisent également des quantités significatives de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6 (Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2000; O'Keeffe et al., 2002) et de nombreuses chimiokines dont CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β et CCL5/RANTES (Fonteneau et al., 2003; Piqueras et al., 2006). Au contraire de la sécrétion des IFN de type I, la production de cytokines/chimiokines induite par les TLR-L est dépendante de l'activation des facteurs de transcription IRF5, NF- κ B, STAT-1 et de la voie des MAP kinases (Di Domizio et al., 2009; Honda et al., 2005; Kawai and Akira, 2008; O'Keeffe et al., 2005).

Les TLR-L induisent plus ou moins fortement ces deux types de voies de signalisation. Par exemple, le CpG-A active fortement la voie IRF7 et la sécrétion d'IFN de type I par sa capacité à former des complexes multimériques induisant sa rétention dans les endosomes

précoces dans les pDC mais n'induit qu'une faible maturation. En revanche, le CpG-B monomérique, rapidement transféré dans les endosomes tardifs n'induit qu'une faible production d'IFN de type I mais active fortement les autres voies de signalisation (Honda et al., 2005; Kerkmann et al., 2003; Kerkmann et al., 2005).

De façon importante, les pDC murines et humaines diffèrent grandement pour leur capacité à produire de l'IL-12 et de l'IL-10. En effet, les pDC murines sont communément admises comme capables de produire la forme bioactive de l'IL-12 (Asselin-Paturel et al., 2001; Bjorck, 2001; Nakano et al., 2001) ainsi que de l'IL-10 (Martin et al., 2002). En revanche, les pDC humaines hautement purifiées ne semblent pas sécréter d'IL-12 ni d'IL-10 (Ito et al., 2006).

2.3.3 Régulation de la synthèse d'IFN de type I par les pDC

De nombreux récepteurs exprimés par les pDC sont impliqués dans la régulation négative de leur sécrétion d'IFN de type I. Notamment, le ciblage des récepteurs BDCA-2 (Dzionek et al., 2001), ILT7 (Cao et al., 2006; Cao et al., 2009), NKp44 (Fuchs et al., 2005) FcεR1 (Schroeder et al., 2005) et FcγRII (Green et al., 2004) sur les pDC humaines ou de BST2 (Blasius et al., 2006b) et Siglec-H (Blasius et al., 2004; Blasius et al., 2006a) sur les pDC murines par des anticorps spécifiques ou leurs ligands respectifs lorsqu'ils sont connus inhibe leur production d'IFN de type I en réponse aux TLR-L. Ces récepteurs induisent alors un signal intracellulaire direct pour FcγRII ou en s'associant avec des molécules adaptatrices possédant un motif de signalisation ITAM telles que la chaîne γ du récepteur FcεR1 pour BDCA-2 (Cao et al., 2007) et ILT7 (Cao et al., 2006; Cao et al., 2009) et FcεR1 ou DAP12 pour NKp44 et Siglec-H (Blasius et al., 2006a; Fuchs et al., 2005). La signalisation par les motifs ITAM semble activer spécifiquement dans les pDC une voie similaire à celle activée par l'engagement du BCR dans les LB (Cao et al., 2007). En revanche, l'engagement du récepteur PDC-TREM augmente la sécrétion d'IFN de type I par les pDC murines bien qu'il induise également un signal intracellulaire par DAP12. Cependant, au contraire des récepteurs précédemment cités dont l'expression par les pDC est constitutive, PDC-TREM est induit par la stimulation des TLR et pourrait intervenir à un second niveau de régulation (Watarai et al., 2008).

En contrepartie, l'engagement de la lectine Ly49Q possédant un domaine de signalisation ITIM, par son ligand naturel, la molécule du CMH-I H-2K^b, est nécessaire à la production d'IFN de type I par les pDC murines en réponse aux TLR-L (Tai et al., 2008). En revanche, le

ciblage par un anticorps de la lectine DCIR possédant également un motif ITIM inhibe la production d'IFN de type I par les pDC humaines (Meyer-Wentrup et al., 2008).

De plus, un certain nombre de facteurs solubles tels que les nucléotides (UDP, UTP, ATP)(Shin et al., 2008), la PGE2, l'IL-10 et le TGF- β (Contractor et al., 2007; Li et al., 2008; Son et al., 2006) associés ou non sont également impliqués dans l'inhibition de la production d'IFN de type I par les pDC en réponse aux TLR-L. Notamment, ces trois derniers facteurs sont retrouvés au niveau de la muqueuse intestinale (Contractor et al., 2007) et pourraient être impliqués dans la promotion d'un environnement immuno-tolérant évitant une réponse inappropriée aux antigènes ingérés ou à la flore commensale.

2.4 Rôle des pDC dans l'immunité adaptative

2.4.1 Différenciation des pDC en DC matures

Fraichement isolées du sang, des organes lymphoïdes (Asselin-Paturel et al., 2001; Grouard et al., 1997) ou du thymus (Martin et al., 2002), les pDC présentent une morphologie ronde, une absence d'expression des molécules de costimulation T, une faible expression en surface des molécules du CMH-II et une activité immuno-stimulatrice inexistante en réaction allogénique (MLR). Cette dernière caractéristique les exclut à priori des DC au sens strict (Steinman et al., 1983; Steinman and Witmer, 1978). Cependant, 3 états de différenciation peuvent être distingués pour les pDC *in vitro*. Le premier, le stade plasmacytoïde, est celui retrouvé *in vivo* en condition physiologique et correspond à un stade de précurseur de cellule dendritique mais également au stade d'IPC. Les pDC fraîchement isolées devraient donc être nommées pré-pDC comme le proposent certains auteurs, cependant, pour des raisons de clarté, je continuerais à les désigner par le terme de pDC. Le second stade correspond à un stade dendritique immature et peut être induit *in vitro* pour les pDC humaines en présence d'IL-3 (Grouard et al., 1997). J'appellerai par la suite ces cellules pDC immatures. Enfin, le dernier stade, induit par le CD40-L ou les TLR-L correspond à un stade de pDC matures (Asselin-Paturel et al., 2001; Bauer et al., 2001; Cella et al., 2000; Grouard et al., 1997; Kadowaki et al., 2000).

La différenciation/maturation des pDC humaine et murines est caractérisé par des changements progressifs au niveau morphologique (acquisition de dendrites), phénotypique (augmentation de l'expression en surface des molécules du CMH-II et des molécules de costimulation T) et fonctionnel (augmentation de l'activité immuno-stimulatrice en MLR,

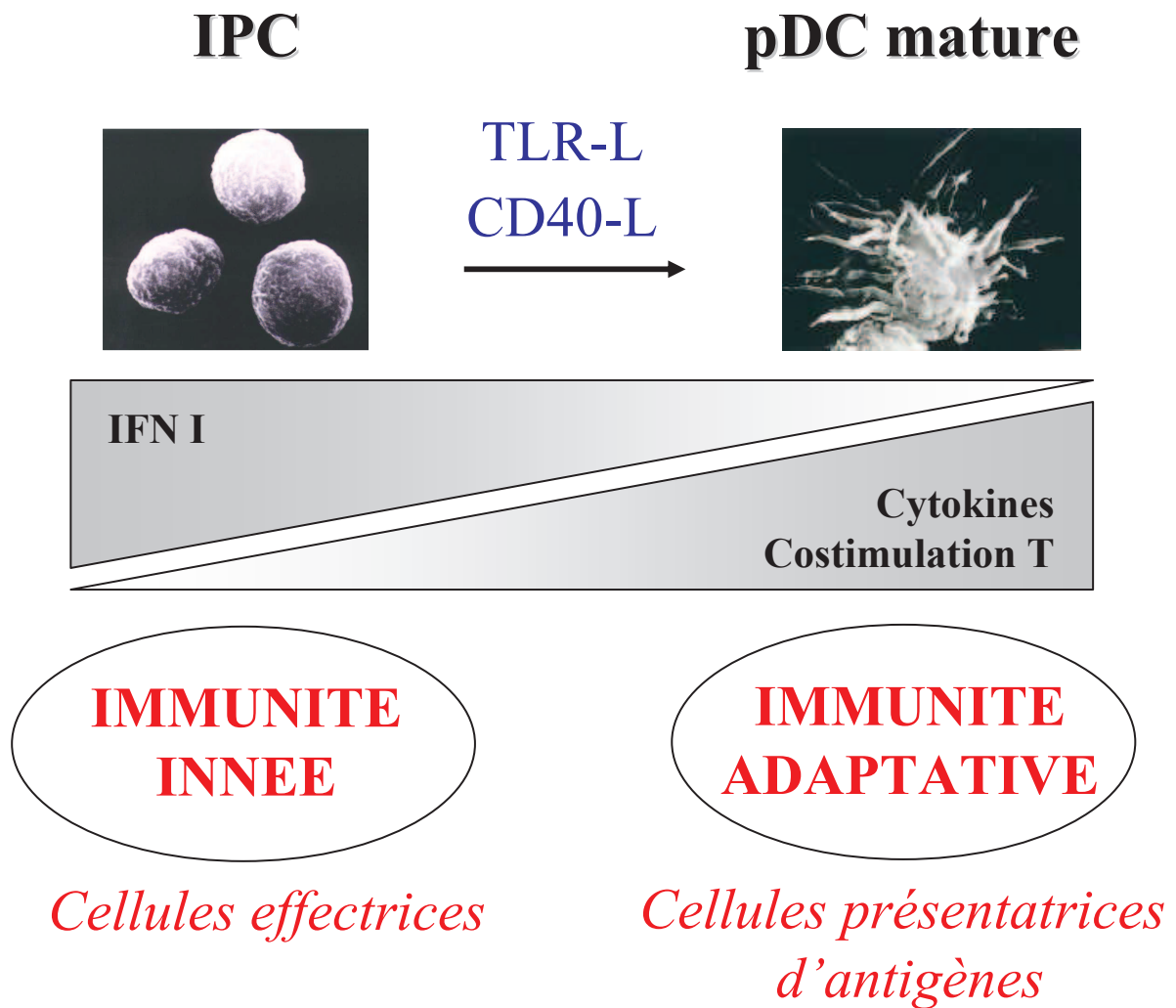


Figure 6 : Différenciation des pDC en DC matures

Photographies Grouard et al, J. Exp. Med. 1997

production de cytokines/chimiokines inflammatoires) et s'accompagne de la perte de la capacité à sécréter des IFN de type I (Figure 6). L'expression des molécules de costimulation T par les pDC activées par les TLR-L semble majoritairement dépendre de l'activation du facteur de transcription NF- κ B (O'Keeffe et al., 2005). De plus, la maturation phénotypique induite par les TLR-L est considérablement diminuée *in vitro* par un anticorps anti-TNF- α suggérant que cette cytokine agit également de façon autocrine sur les pDC comme facteur de différenciation (Kadowaki et al., 2000). Pour les pDC murines, la maturation phénotypique s'accompagne également de l'augmentation de l'expression du marqueur CD8 α (O'Keeffe et al., 2002).

Enfin, O'Keeffe et al, ont clairement démontré par transfert adoptif la capacité des pDC murines à se différencier en pDC matures *in vivo* suite à une stimulation virale des souris receveuses (O'Keeffe et al., 2002). De plus, l'injection intraveineuse de ligands des TLR7 et -9, induit la maturation phénotypique des pDC spléniques murines (Asselin-Paturel et al., 2005; Schlecht et al., 2004). Ainsi, la différenciation/maturation des pDC est un phénomène qui peut s'opérer *in vivo*, notamment en condition pathologique et les pDC, cellules clefs de l'immunité innée par leur production d'IFN de type I constituent alors un lien direct entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

2.4.2 Présentation des antigènes et activation des réponses T par les pDC

L'induction de réponses T primaires spécifiques implique deux étapes. La première inclut la synthèse ou la capture des antigènes par les APC et leur traitement intracellulaire résultant en l'exposition à la membrane plasmique des complexes CMH-peptide. La seconde inclut les événements qui suivent la reconnaissance de ces complexes CMH-peptide par les LT CD4⁺ et CD8⁺ naïfs (prolifération et polarisation de la réponse) et implique l'expression des molécules de costimulation ainsi que la sécrétion de cytokines par les APC. Ce deuxième aspect peut être modélisé artificiellement par chargement des APC en peptides antigéniques synthétiques ou par des réactions allogéniques telles que la MLR.

2.4.2.1 Activation des réponses T primaires par les pDC

Contrairement aux pDC fraîchement isolées, les pDC matures et les pDC immatures dans une moindre mesure induisent la prolifération de LT CD4⁺ allogéniques naïfs (Asselin-Paturel et al., 2001; Grouard et al., 1997; Kadowaki et al., 2000). Les pDC humaines activées par le

virus Influenza ou RSV induisent également la prolifération de LT CD8⁺ allogéniques naïfs et semblent notamment plus efficaces que les cDC (Di Pucchio et al., 2008).

De plus, les pDC humaines immatures chargées en peptides viraux activent les clones T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques et réactivent des réponses T anti-virales mémoires aussi efficacement que les cDC (Fonteneau et al., 2003). De même, les pDC humaines immatures ou activées par CD40-L sont également capables d'activer les LT CD8⁺ naïfs spécifiques de peptides tumoraux (Salio et al., 2003).

Les pDC murines spléniques chargées en peptide induisent également des réponses T CD8⁺ primaires *in vitro* (Dalod et al., 2003) et *in vivo* (Schlecht et al., 2004) après activation par des virus. De plus, les pDC murines dérivées de cultures de moelle osseuse ou expandues *in vivo* par le Flt3L, chargées en peptide et activées par CpG induisent une réponse T CD8⁺ primaire effectrice *in vivo* (Lou et al., 2007; Salio et al., 2004). Enfin, les pDC spléniques murines chargées en peptide activent également la prolifération de LT CD4⁺ spécifiques naïfs après activation par CpG (Boonstra et al., 2003).

Si ces modèles ne renseignent pas sur la capacité physiologique des pDC à effectivement présenter les antigènes qu'elles rencontrent ou qu'elles expriment, ils permettent cependant d'illustrer leur capacité à induire des réponses T primaires en se plaçant dans des conditions où la capture et l'apprêtement des antigènes ne sont pas les facteurs limitant. Ainsi, les pDC murines et humaines une fois différenciées et/ou matures sont capables d'induire des réponses T CD4⁺ et CD8⁺ primaires allogéniques ou dirigées contre des peptides antigéniques synthétiques suggérant leur potentiel immunogénique.

Les pDC isolées de souris transgéniques exprimant l'ovalbumine de façon ubiquitaire et activées par CpG sont également capables d'activer les cellules OT-II naïves toutefois moins efficacement que les cDC en corrélation avec leur plus faible expression des molécules du CMH-II (Young et al., 2008). En revanche, les pDC isolées de souris transgéniques exprimant l'antigène modèle HEL dans les APC activées par le virus Influenza, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou CpG semblent seulement capables de réactiver et d'induire la polarisation Th1 des LT CD4⁺ mémoires non polarisés (Krug et al., 2003). Bien que différentes dans leurs conclusions sur la capacité des pDC à induire une réponse T CD4⁺ primaire, ces études confirment cependant leur capacité à présenter les antigènes endogènes en association avec les molécules du CMH-II.

Les pDC murines spléniques mâles activées *in vitro* par CpG (Salio et al., 2004) ou *in vivo* par le virus Influenza (Schlecht et al., 2004), activent également des réponses T CD8⁺ primaires *in vivo* après injection à des souris femelles. Krug et al suggèrent cependant que les pDC

activées par VSV sont incapables d'induire une réponse T CD8⁺ primaire contre l'antigène mâle (Krug et al., 2003). Certaines contradictions dans les conclusions de ces auteurs peuvent néanmoins s'expliquer par des différences méthodologiques.

Les pDC humaines infectées (et ainsi activées) par le virus Influenza (vivant ou inactivé) sont également capables de présenter les peptides viraux et d'activer les clones T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques et de réactiver des réponses T anti-virales mémoires aussi efficacement que les cDC (Fonteneau et al., 2003).

Ainsi, les pDC humaines et murines sont pourvues d'une machinerie de traitement des antigènes intracellulaires et de chargement des molécules du CMH de classe I et II fonctionnelle et pourvu qu'elles soient matures, sont capables dans certaines conditions d'induire des réponses T CD4⁺ et CD8⁺ primaires dirigées contre des antigènes endogènes et viraux.

2.4.2.2 Capture des antigènes exogènes par les pDC

L'internalisation des composés extracellulaires par les DC peut emprunter différentes voies telles que la macropinocytose, la phagocytose et l'endocytose. Les cDC humaines et murines expriment de nombreux récepteurs facilitant la phagocytose et l'endocytose qui peuvent participer à la présentation des antigènes. Les pDC expriment également un certain nombre de récepteurs qui pourraient être impliqués dans la capture des antigènes tels que les FcR (Benitez-Ribas et al., 2006), le récepteur scavenger CD36 (Facchetti et al., 1988; Seeds et al., 2009), BST2 (Blasius et al., 2006b), les lectines de type C BDCA-2 (Dzionek et al., 2001), DCIR (Meyer-Wentrup et al., 2008), Dectin-1 et Dectin-2 (Seeds et al., 2009) ou la lectine de type I Siglec-H (Blasius and Colonna, 2006). Notamment, les pDC murines expriment également CLEC9A (Sancho et al., 2008). En revanche, les études diffèrent dans leur conclusion sur l'expression ou non du récepteur au mannose par les pDC humaines (Fanning et al., 2006; Meyer-Wentrup et al., 2008) et murines (Ochando et al., 2006; Seeds et al., 2009). Les différences d'expression des récepteurs d'endocytose par les pDC et les cDC pourraient suggérer des différences de spécificité dans la reconnaissance des antigènes (Table 1).

Cependant, la capacité des pDC à internaliser les antigènes exogènes de différentes origines a longtemps été controversée. Les premières études ont d'abord souligné en comparaison avec les cDC, la faible capacité des pDC humaines fraîchement isolées du sang ou des amygdales à internaliser le dextran (Grouard et al., 1997; Robinson et al., 1999), des billes de latex (Stent

et al., 2002) ou des cellules mortes (Dalgaard et al., 2005). Néanmoins, des études plus récentes suggèrent que les pDC humaines et/ou murines sont cependant capables d'internaliser *in vitro* et/ou *in vivo*, le dextran (Mouries et al., 2008), le Lucifer Yellow (Dzionic et al., 2001) l'ovalbumine (de Heer et al., 2004; Sapoznikov et al., 2007) et des billes (Ochando et al., 2006). Trois études montrent également la capacité des pDC humaines ou murines à internaliser des fragments de cellules infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Hoeffel et al., 2007), le virus Influenza (Lui et al., 2009) ou à acquérir des antigènes au niveau de transplants cardiaques (Ochando et al., 2006).

2.4.2.3 Présentation des antigènes exogènes aux LT CD4⁺ par les pDC

Le ciblage d'antigènes *in vitro* ou *in vivo* sur les pDC humaines et murines par l'utilisation d'anticorps dirigés contre des molécules de surface supposées impliquées dans la capture des antigènes tels que BDCA-2, DCIR et BST2 conduit à une activation efficace des LT CD4⁺ spécifiques naïfs (Dzionic et al., 2001; Sapoznikov et al., 2007) ou mémoires (Jaehn et al., 2008; Meyer-Wentrup et al., 2008). De même, l'opsonisation d'antigènes par des anticorps facilite l'internalisation des complexes immuns par le FcγRII/CD32 et induit une présentation des antigènes aux LT CD4⁺ spécifiques mémoires autologues par les pDC humaines (Benitez-Ribas et al., 2006).

Des modèles animaux ont également permis de démontrer *in vivo* la capacité des pDC murines à présenter les antigènes exogènes en association avec les molécules du CMH-II. Notamment, après transplantation cardiaque allogénique, les pDC infiltrant la greffe sont marquées positivement par un anticorps spécifique du complexe CMH-II:peptide constitué d'un épitope dérivé du CMH du donneur associé au CMH du receveur suggérant que les pDC ont effectivement capturé et traité des antigènes dérivés du greffon (Ochando et al., 2006). La déplétion sélective des cDC *in vivo* chez les souris CD11c-DTR n'affecte pas les pDC et constitue ainsi un modèle privilégié pour étudier la présentation des antigènes par les pDC en l'absence de compétition. Après injection sous cutanée d'ovalbumine, les pDC des ganglions drainant activent efficacement les cellules OT-II *in vivo* et génèrent une réponse Th1 effectrice et mémoire. En revanche, les pDC spléniques de ces souris injectées par voie intraveineuse ne semblent pas capable d'activer les OT-II (Sapoznikov et al., 2007). De même, Young et al ont démontré que les pDC contrairement au cDC ne présentent pas efficacement, les antigènes exogènes rencontrés de façon brève comme ceux injectés par voie intraveineuse mais sont en revanche capables de présenter les antigènes présents en continu.

Contrairement aux cDC, les pDC humaines et murines synthétisent continuellement de nouvelles molécules du CMH-II après activation (Sadaka et al., 2009; Young et al., 2008). Cette distinction viendrait du fait que l'expression de CIITA impliqué dans la régulation de la synthèse des molécules du CMH-II est contrôlée par des promoteurs différents dans les cDC et le pDC (LeibundGut-Landmann et al., 2004). De plus, les pDC poursuivent également leur dégradation des complexes CMH-II:peptide après activation. Ainsi, alors que les cDC matures exposent en grande quantité des complexes CMH-II:peptide à longue durée de vie présentant majoritairement les antigènes rencontrés juste avant ou au moment de l'activation, les pDC immature ou matures, renouvellent constamment les complexes CMH-II:peptide à leur surface et sont ainsi capable de présenter les antigènes endogènes ou des antigènes viraux nouvellement rencontrés (Young et al., 2008).

2.4.2.4 Présentation croisée par les pDC

Les premières études ont fait état de l'incapacité des pDC humaines et murines à effectuer la présentation croisée des antigènes exogènes aux LT CD8⁺ spécifiques *in vitro* (Salio et al., 2004; Schnurr et al., 2005) et *in vivo* (Sapoznikov et al., 2007). Cette incapacité fut initialement associée à une absence de capture des antigènes exogènes tels que l'ovalbumine (Salio et al., 2004). Cependant, la présentation de ces mêmes antigènes aux LT CD4⁺ suggère que l'internalisation des antigènes n'est pas le facteur limitant (Sapoznikov et al., 2007). De plus, le ciblage de l'ovalbumine sur les pDC par un anticorps dirigé contre BST2 permet une présentation aux OT-II mais pas aux OT-I *in vivo* (Sapoznikov et al., 2007).

Il a été ainsi proposé que les pDC ne disposent pas de la capacité à transférer les antigènes des endosomes vers le cytosol. Cependant, un certain nombre d'études suggèrent que de même que pour les cDC CD8 α ⁻ murines, la machinerie de présentation croisée dans les pDC est contrôlée par l'activation ou restreinte à certains types d'antigènes.

En effet, il a été montré que les pDC murines sont capables de réaliser la présentation croisée d'antigènes exogènes solubles *in vitro* et *in vivo* à condition d'être activées par des ligands du TLR7 et dans une moindre mesure du TLR9. Ainsi, après injection d'ovalbumine *in vivo*, les pDC isolées de rate n'activent les cellules OT-I *in vitro* qu'après activation *in vitro* ou *in vivo* par des ligands synthétiques ou naturels des TLR7 et -9. Cette présentation croisée, dépendante des transporteurs TAP, ne s'explique pas par une augmentation de la capture mais plutôt par une activation de la machinerie intracellulaire de présentation croisée. Les pDC sont alors également capables d'activer des réponses T CD8⁺ primaires effectrices *in vivo*

après transfert adoptif (Mouries et al., 2008). Cette étude semble en contradiction avec une publication préalable qui avait étudié *in vitro* la présentation croisée de l'ovalbumine aux cellules OT-I en présence de CpG et conclu à une incapacité des pDC (Salio et al., 2004). Cependant, ces derniers avaient utilisé des pDC dérivées de culture de moelle osseuse qui ne partagent pas toujours les caractéristiques des pDC isolées *ex vivo* (Boonstra et al., 2003). En revanche, les pDC humaines ne semblent pas capables de présentation croisée à partir de complexes immuns même après activation par CD40-L ou différents ligands des TLR7 et -9 (Schnurr et al., 2005).

Cependant, les pDC humaines semblent capables d'acquérir des fragments de cellules apoptotiques infectées par HIV et de présenter différents peptides viraux *in vitro* aux LT CD8⁺ spécifiques après activation par des ligands des TLR7 et -9. La présentation croisée des peptides viraux par les pDC conduit à l'activation d'une réponse effectrice caractérisée par la production d'IFN- γ par les lignées T spécifiques et la prolifération des LT de patients infectés par HIV. De façon importante, cette présentation s'opère en présence d'inhibiteurs de la fusion des virus et est dépendante de la polymérisation d'actine et du protéasome. De plus, l'internalisation par endocytose de vaccins lipopeptidiques fluorescents par les pDC conduit à une diffusion de la fluorescence dans le cytoplasme suggérant un transfert cytoplasmique des antigènes (Hoeffel et al., 2007). Les pDC semblent ainsi utiliser le même mécanisme que les cDC pour effectuer la présentation croisée des antigènes. Récemment, la présentation croisée d'antigènes viraux acquis à partir de cellules infectées par les pDC humaines a été confirmée dans un autre modèle viral non répliatif. Notamment, les pDC ne semblent internaliser des fragments cellulaires qu'à condition que les cellules cibles soient infectées. Dans ce modèle, la phagocytose de LB infectés par le virus Influenza inactivé suffit à induire la sécrétion d'IFN- α et la maturation des pDC. Celles-ci activent alors la production d'IFN- γ par des LT CD8⁺ autologues mémoires anti-viraux (Lui et al., 2009).

L'existence d'un mécanisme alternatif de chargement des molécules du CMH-I a également été proposée pour les pDC humaines. Après exposition au virus Influenza vivant ou inactivé, les pDC humaines activent beaucoup plus rapidement les LT CD8⁺ autologues mémoires que les cDC. La rapidité de cette présentation est associée et dépendante de la présence d'un stock intracellulaire de molécules du CMH-I dans les endosomes de recyclage. De plus, la présentation des peptides viraux est alors indépendante du protéasome mais dépendante de l'activité des cathepsines et de l'acidification endosomale suggérant un traitement et un chargement des antigènes directement dans les endosomes. Ce mécanisme alternatif de

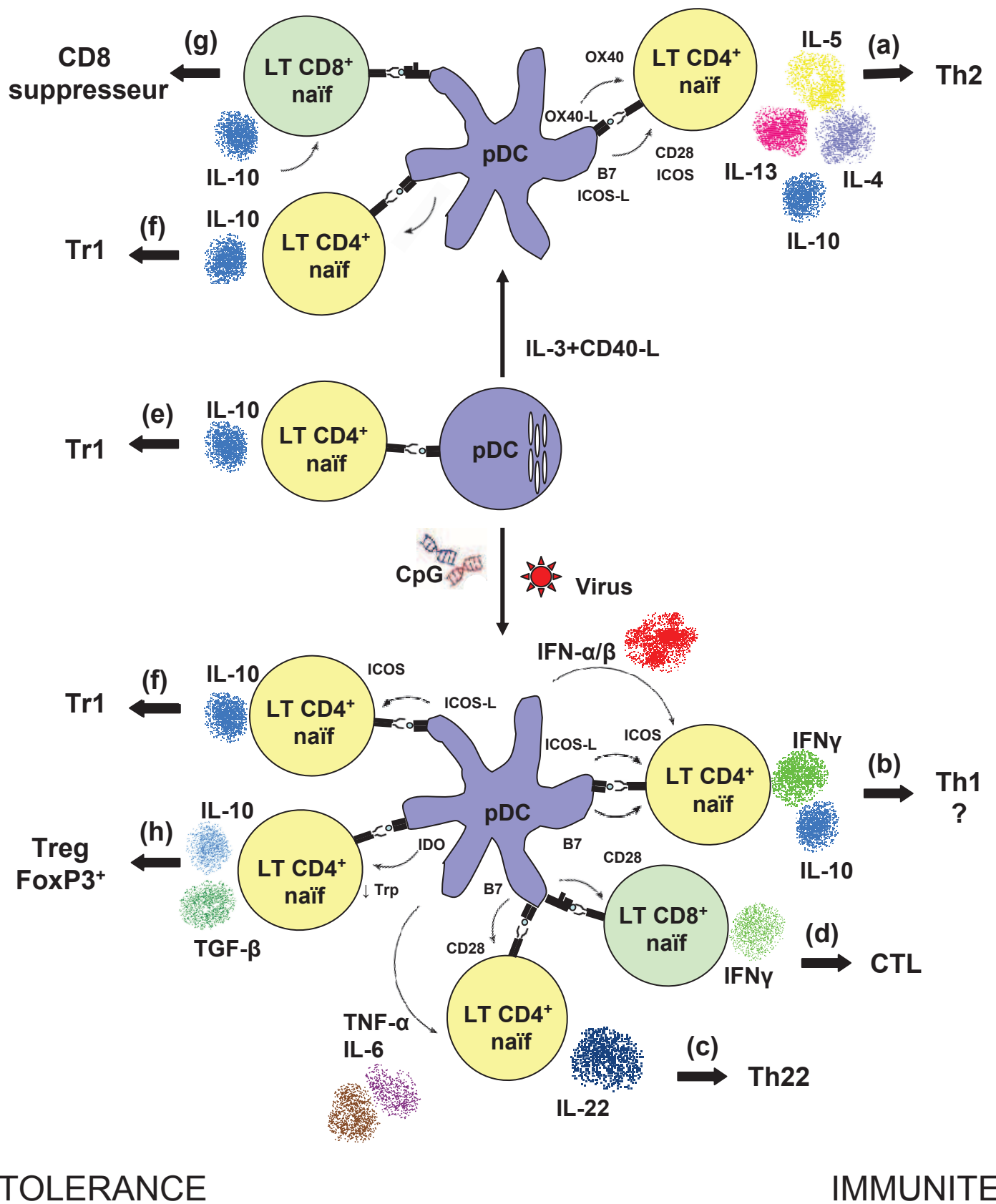


Figure 7 : Flexibilité des pDC dans l'induction de réponses effectrices ou tolérogènes

présentation croisée pourrait permettre au pDC d'activer très rapidement les réponses cytotoxiques anti-virales mémoires lors d'une nouvelle infection (Di Pucchio et al., 2008).

Ainsi, dans certaines conditions, les pDC humaines et murines seraient capables de réaliser la présentation croisée par deux mécanismes. Cette capacité serait contrôlée par l'activation (Mouries et al., 2008) ou liée à la reconnaissance de cellules infectées (Hoeffel et al., 2007; Lui et al., 2009) ou de virus (Di Pucchio et al., 2008). Cependant, la pertinence de ces résultats dans des modèles physiologiques d'infections virales *in vivo* n'a encore jamais été formellement démontrée.

2.5 Importance des pDC dans l'immunité et la tolérance

2.5.1 Flexibilité des réponses induites par les pDC

2.5.1.1 Capacité des pDC à induire la polarisation Th1, Th2 et Th22 des lymphocytes T naïfs

Les pDC présentent une considérable flexibilité dans la polarisation des réponses T en fonction des signaux qu'elles reçoivent.

Ainsi, les pDC humaines immatures ou activées par CD40-L induisent une forte production d'IL-10, -4 -5 et -13 par les LT CD4⁺ allogéniques caractéristiques d'une polarisation Th2 (Kadowaki et al., 2000; Rissoan et al., 1999). Celle-ci semble associée à l'expression de la molécule de costimulation OX40-L par les pDC car sa neutralisation diminue considérablement la production des cytokines de type 2 (Ito et al., 2004) (Figure 7 (a)). En revanche, les pDC humaines activées par les virus HSV et SV ou par CpG, induisent la production de grandes quantités d'IFN- γ et d'IL-10 par les LT CD4⁺ allogéniques (Ito et al., 2004; Ito et al., 2007; Kadowaki et al., 2000) (Figure 7 (b)). Les pDC murines activées par CpG induisent également une polarisation Th1 des LT CD4⁺ (Boonstra et al., 2003). Dans ces conditions, la capacité des pDC à induire la production d'IFN- γ dépend de façon critique de leur production d'IFN de type I. En effet, la neutralisation des IFN- α/β , réduit la production d'IFN- γ (mais pas celle d'IL-10) et augmente la production des IL-4, -5 et -13 (Ito et al., 2004; Kadowaki et al., 2000). La polarisation Th2 par les pDC immatures ou activées par CD40-L semble donc s'opérer par défaut en l'absence d'IFN de type I. Les pDC humaines activées par CpG induisent également la différenciation d'une population de LT CD4⁺ ne

produisant que de l'IL-22. Cette différenciation s'opère en revanche de façon dépendante de la production d'IL-6 et de TNF- α par les pDC (Duhon et al., 2009) (Figure 7 (c)).

Les pDC humaines activées par le virus Influenza ou RSV induisent également la production d'IFN- γ par les LT CD8⁺ allogéniques et semblent notamment plus efficaces que les cDC (Di Pucchio et al., 2008) (Figure 7 (d)).

2.5.1.2 Induction de lymphocytes T suppresseurs par les pDC

2.5.1.2.1 Induction de Tr1 par les pDC

Contrairement aux pDC immatures et aux cDC fraîchement isolées, les pDC humaines fraîchement isolées et chargées en peptides n'activent pas la prolifération des LT CD4⁺ naïfs spécifiques mais induisent leur production d'IL-10 et leur anergie lors d'une stimulation ultérieure (Kuwana et al., 2001). Ce phénotype anergique et la production d'IL-10 sont caractéristiques des LT suppresseur de type Tr1. Les pDC murines thymiques fraîchement isolées et chargées en peptide, induisent également la différenciation de Tr1 capables de supprimer la prolifération de LT CD4⁺ naïfs (Martin et al., 2002) (Figure 7 (e)). Initialement associée à leur phénotype très immature, la différenciation de LT producteurs d'IL-10 par les pDC ne semble cependant pas liée à leur état de maturation. En effet, les pDC humaines activées par HSV (Kawamura et al., 2006), CpG ou CD40-L (Ito et al., 2007) et les pDC murines activées par CpG (Bilsborough et al., 2003) ou RSV (Wang et al., 2006) induisent également la différenciation de Tr1 anergiques, producteurs d'IL-10 et suppresseurs (Figure 7 (f)). Enfin, les pDC humaines activées par CD40-L induisent également la différenciation des LT CD8⁺ allogéniques naïfs en cellules productrices d'IL-10 et suppressives (Gilliet and Liu, 2002) (Figure 7 (g)).

Ainsi, de façon remarquable, les pDC humaines et murines fraîchement isolées, immatures ou matures, induiraient la production d'IL-10 par les LT CD4⁺ et CD8⁺ allogéniques ou spécifiques de l'antigène de façon indépendante de la polarisation Th1 ou Th2 initiale (Gilliet and Liu, 2002; Kadowaki et al., 2000; Rissoan et al., 1999). De plus, si les pDC matures sont capables d'induire la prolifération primaire des LT, cette prolifération est suivie d'une anergie spécifique de l'antigène et d'une activité suppressive dépendante de l'IL-10 (Bilsborough et al., 2003; Gilliet and Liu, 2002; Ito et al., 2007; Kawamura et al., 2006).

L'induction de ces Tr1 (CD4 ou CD8) par les pDC semble dans certains cas partiellement dépendante de l'IFN- α (Kawamura et al., 2006) et/ou de l'IL-10 produite par les LT qui

agirait de façon autocrine (Gilliet and Liu, 2002; Kawamura et al., 2006) mais semble en revanche indépendante de l'absence de sécrétion d'IL-12 par les pDC humaines matures (Gilliet and Liu, 2002). En revanche, l'expression de la molécule de costimulation ICOS-L par les pDC humaines (Ito et al., 2007) et murine (Colvin et al., 2009) semble impliquée de façon critique dans l'induction de la production d'IL-10 par les LT CD4⁺. Cette molécule est augmentée lors de la maturation des pDC quel que soit le stimulus utilisé et sa neutralisation lors de la MLR augmente la prolifération primaire des LT CD4⁺, inhibe spécifiquement leur production d'IL-10 sans affecter les autres cytokines et réverse leur anergie secondaire et leur activité suppressive (Colvin et al., 2009; Ito et al., 2007).

2.5.1.2.2 Induction de Treg par les pDC

Les pDC humaines activées par HIV ou CpG induisent également la différenciation des LT CD4⁺ allogéniques naïfs en LT régulateurs (Treg) CD25⁺ CTLA-4⁺ et FoxP3⁺ (Manches et al., 2008; Moseman et al., 2004) (Figure 7 (h)). Ces Treg induits sont également anergiques et suppriment la prolifération de LT CD4⁺ naïfs de façon non spécifique soit par la production de fortes quantités d'IL-10 et de TGF-β (Moseman et al., 2004) soit par contact cellulaire (Manches et al., 2008).

Différentes études suggèrent un rôle de l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) dans l'induction de Treg par les pDC humaines activées par HIV ou CpG (Chen et al., 2008; Manches et al., 2008). IDO est une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane dont l'expression peut être induite dans les pDC humaines suite à l'activation par HIV (Boasso et al., 2007), CpG (Chen et al., 2008) ou par un ligand synthétique de TLR7 (Manches 2006). Notamment, dans le cas de HIV, l'induction d'IDO est dépendante de la signalisation par le TLR7 (Manches et al., 2008). L'inhibition de la fonction d'IDO abroge la différenciation des Treg CD25⁺ et rétablit l'alloréaction primaire. Les LT instruits par les pDC ne sont alors plus supresseurs (Chen et al., 2008; Manches et al., 2008). En outre, l'induction de Treg peut être restaurée par l'ajout de kynurénine, un métabolite du tryptophane (Chen et al., 2008).

L'expression d'IDO peut également être induite dans les pDC murines par les interactions GITR/GITR-L (Grohmann et al., 2007), CTLA-4/CD80 et CD200/CD200R (Fallarino et al., 2004; Fallarino et al., 2005). L'expression d'IDO par les pDC murines conduit alors à un effet supresseur direct sur la réponse immune induite par des cDC chargées en peptides lors d'un co-transfert (Fallarino et al., 2004; Fallarino et al., 2005; Grohmann et al., 2007; Puccetti and Fallarino, 2008).

2.5.2 Rôle des pDC dans l'induction d'immunité

2.5.2.1 Rôle des pDC dans l'immunité anti-virale

En plus de leurs actions directes sur les cellules infectées, les IFN de type I produits par les pDC conduisent par leur action pleiotropique à l'activation des différentes voies de l'immunité (Haeryfar, 2005).

Notamment, la production d'IFN de type I par les pDC lors d'une infection par MCMV (Krug et al., 2004a) ou en réponse au virus Influenza et au CpG (Gerosa et al., 2005) active la cytotoxicité des cellules NK. Par voie autocrine ou paracrine, les IFN de type I activent également la cytotoxicité médiée par les pDC elles-mêmes (Chaperot et al., 2006; Hardy et al., 2007; Stary et al., 2007) et par les monocytes (Kemp et al., 2003) en induisant leur expression de TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Les pDC sont ainsi capables d'induire directement l'apoptose de cellules infectées.

Les IFN de type I produits par les pDC en réponse à une stimulation virale tiennent également une place importante dans l'immunité adaptative cellulaire en favorisant la différenciation des monocytes (Gursel et al., 2002) et la maturation des cDC par effet de voisinage (Fonteneau et al., 2004; Yoneyama et al., 2005). De plus, lors d'une infection par LCMV, les IFN de type I potentialisent la présentation croisée des antigènes par les cDC et permettent également l'induction d'une réponse cytotoxique primaire indépendante d'un support T CD4⁺ (Le Bon et al., 2003). De plus, les IFN de type I augmentent la survie et la prolifération des LT (Kolumam et al., 2005) et favorisent la différenciation des LT CD4⁺ vers un profil Th1 (Ito et al., 2004). Les pDC, par leur production d'IFN de type I et d'IL-6 activent également la réponse humorale en favorisant la différenciation des LB en plasmocytes et en induisant leur sécrétion d'anticorps (Jego et al., 2003).

Enfin, les pDC s'accumulent sur les sites d'inflammations et participent au recrutement des différents acteurs de l'immunité par leur production de nombreuses chimiokines (Liu et al., 2008; Piqueras et al., 2006).

Ainsi, par leur production d'IFN de type I et de cytokines et de chimiokines inflammatoires suite à la reconnaissance des nucléotides viraux, les pDC occupent une place centrale dans l'immunité anti-virale en initiant et en activant toutes les étapes nécessaires à l'élaboration d'une réponse effectrice.

Cependant, le rôle des pDC dans l'immunité antivirale en tant qu'APC n'est pas formellement établi. Dans un modèle d'infection pulmonaire par le virus Influenza, les pDC ne semblent pas impliquées de façon cruciale dans la résolution de l'infection et l'induction des réponses T CD8⁺ antivirales mais sont nécessaires à la production d'anticorps spécifiques (GeurtsvanKessel et al., 2008). En revanche, l'augmentation du nombre de cDC et de pDC par traitement avec du Flt3-L lors d'une infection pulmonaire par RSV renforce la réponse T CD8⁺ spécifique et facilite la résolution de l'infection de façon dépendante des pDC (Smit et al., 2008). Dans un modèle d'infection cutanée par HSV, les pDC recrutées au niveau du ganglion drainant, sont également indispensables à l'induction de la réponse effectrice cytotoxique et à l'élimination du virus. Cependant, dans ce modèle, les pDC ne seraient pas responsables de la présentation des antigènes viraux aux LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques fonctions exercées respectivement par les DC CD11b⁺ et CD8α⁺. Les pDC opèreraient dans ce système comme cellules accessoires en permettant par contact cellulaire et par leur production d'IFN-α, l'induction des réponses cytotoxiques par les DC CD8α⁺ (Yoneyama et al., 2005).

2.5.2.2 Rôle des pDC dans l'auto-immunité

La localisation endosomale des TLR spécialisés dans la reconnaissance des nucléotides devrait normalement permettre d'empêcher la reconnaissance inopportune des nucléotides du soi inaccessibles aux endosomes.

Lors de lésions cutanées, la mort cellulaire s'accompagne d'un relargage d'ADN et d'ARN du soi normalement dégradés par les DNAses et RNAses extracellulaires. Chez les patients atteints de psoriasis, le peptide antimicrobien LL37 libéré au niveau des lésions, par sa liaison avec les molécules d'ADN (Lande et al., 2007) ou d'ARN (Ganguly et al., 2009), protège les nucléotides du soi de la dégradation et facilite leur internalisation par les pDC (Gilliet et al., 2008). Ces complexes macromoléculaires sont alors retenus dans les endosomes précoces de façon similaire au CpG-A et activent une production intense d'IFN de type I via les TLR7 et -9. Chez les patients souffrant de lupus érythémateux systémique (SLE), des complexes immuns circulants constitués d'auto-anticorps dirigés contre des particules ribonucléiques contenant de l'ARN ou contre de l'ADN du soi facilitent l'internalisation des nucléotides par les pDC via le récepteur FcγRII/CD32. Ces complexes activent également la production d'IFN de type I par les pDC (Means et al., 2005; Vollmer et al., 2005). Le peptide LL37 serait également impliqué dans la pathologie du SLE (Gilliet et al., 2008) et permettrait une

première phase d'activation des pDC, qui par leur production d'IFN de type I et d'IL-6, activeraient la différenciation des LB auto-réactifs en plasmocytes (Jego et al., 2003).

Dans ces deux pathologies auto-immunes, les IFN de type I produits par les pDC initient des réponses T auto-réactives responsables des symptômes (Blanco et al., 2001; Nestle et al., 2005). La capacité des pDC à présenter les antigènes internalisés par FcγRII/CD32 supporte l'hypothèse de leur implication en tant qu'APC (Benitez-Ribas et al., 2006). Cependant la présentation des auto-antigènes par les pDC dans le cadre de ces pathologies n'a jamais été étudiée.

2.5.2.3 Rôle des pDC dans l'immunité anti-tumorale

Plusieurs études attestent de la capacité des pDC à initier une réponse anti-tumorale, notamment suite à un traitement par l'imiquimod. L'imiquimod est un composé synthétique ligand des TLR7 et -8 aux propriétés anti-virales et anti-tumorales reconnues pour sa capacité à induire la production d'IFN de type I. L'application externe d'imiquimod chez des patients atteints de carcinomes basocellulaires ou de lymphomes T cutanés induit un recrutement des pDC au niveau des lésions. L'imiquimod induit également leur production d'IFN-α via sa reconnaissance par le TLR7 (Stary et al., 2007; Urošević et al., 2005). Dans un modèle murin de mélanome, la réponse clinique au traitement par l'imiquimod est par ailleurs corrélée au nombre de pDC (Palamara et al., 2004). Le rôle des pDC dans la réponse au traitement à l'imiquimod semblerait lié à leur capacité, suite à l'activation par des ligands du TLR7, à acquérir l'expression de TRAIL et à induire directement l'apoptose des cellules tumorales (Stary et al., 2007).

Les pDC murines chargées en peptides et activées par CpG procurent également un bénéfice thérapeutique sur des mélanomes établis après injection intra-tumorale. Cet effet est systémique et dépendant des LT CD8⁺. Ce traitement résulte en une augmentation majeure de la présentation croisée des antigènes tumoraux dans les ganglions drainants par les cDC mais pas par les pDC injectées ni par les pDC de l'hôte. Dans ce modèle, les pDC sont de plus impliquées dans le recrutement massif des cellules NK sur le site tumoral par leur production de chimiokines mais également dans l'activation de leur cytotoxicité par leur production d'IFN de type I et l'induction de leur sécrétion d'IFN-γ par leur production d'IL-12 et leur expression de la molécule OX40-L (Liu et al., 2008).

Deux études ont cependant montré la capacité des pDC murines à induire après transfert *in vivo* une réponse T CD8⁺ primaire effectrice après chargement en peptides et activation par

CpG. Cette réponse est de plus protectrice contre une implantation tumorale (Lou et al., 2007; Salio et al., 2004) et retarde la croissance de tumeurs établies (Lou et al., 2007). Notamment dans ces deux modèles, utilisant des antigènes différents, les pDC semblent aussi efficaces que les cDC. Ainsi, les pDC sont capables d'induire une immunité *in vivo* en tant qu'APC. De plus, si les pDC sont injectées en même temps que des cDC, la réponse est considérablement augmentée. Cependant la synergie observée ne dépend alors plus de l'expression des molécules du CMH-I par les pDC mais semble liée à une activation des cDC par les pDC (Lou et al., 2007).

Ainsi, par leur production d'IFN de type I et de chimiokines inflammatoires, les pDC participent à l'induction des réponses effectrices anti-virales, anti-tumorales mais également dans le développement de pathologies auto-immunes. Bien qu'elles soient capables d'induire une immunité effectrice *in vivo*, le rôle des pDC en tant qu'APC dans l'immunité n'est cependant pas encore clairement établi.

2.5.3 Rôle des pDC dans l'induction de tolérance *in vivo*

2.5.3.1 Les pDC sont responsables de la tolérance physiologique aux antigènes inhalés et limitent les immuno-pathologies inflammatoires pulmonaires

L'inhalation d'antigènes, modélisée par l'injection intra-trachéale d'ovalbumine, conduit normalement à l'induction de tolérance immune caractérisée par une absence de réponse à une exposition secondaire même si celle-ci s'accompagne d'un d'adjuvant fort. La déplétion sélective des pDC durant l'exposition primaire conduit cependant à une sensibilisation des souris (de Heer et al., 2004). Les cDC jouent en revanche un rôle inverse dans le sens où leur injection en présence de peptide suffit à sensibiliser les souris (Lambrecht et al., 2000). Dans les deux cas, la sensibilisation conduit lors d'une restimulation antigénique au développement d'un asthme allergique caractérisée par une réponse Th2 chronique excessive, une sécrétion d'IgE, et une hyperéosinophilie broncho-alvéolaire. Ainsi, les pDC à l'inverse des cDC, protègent l'organisme contre le développement d'allergies respiratoires en réponse aux antigènes de l'environnement. Durant la phase initiale de tolérisation, les pDC présentes en faible proportion dans les poumons sains capturent l'ovalbumine et migrent dans les ganglions médiastinaux. Les pDC migrantes inhibent alors l'acquisition des fonctions effectrices (production de cytokines) par les LT CD4⁺ spécifiques activés par les cDC *in vivo* sans altérer leur prolifération (de Heer et al., 2004). Ainsi, les pDC, par leur capacité à inhiber

les réponses délétères induites par les cDC, sont nécessaire à la tolérance physiologique aux antigènes inhalés.

A l'inverse, l'inhalation d'allergènes, modélisés par l'adjonction d'un adjuvant à l'ovalbumine, induit une sensibilisation immédiate des souris. Les pDC mais également les cDC sont recrutées en grand nombre dans les poumons des souris allergiques lors d'une seconde exposition. Dans ce cas encore, les pDC et les cDC jouent des rôles antagonistes. Alors que la déplétion des cDC par la toxine diphtérique durant la restimulation inhibe le développement d'asthme chez les souris sensibilisées (van Rijt et al., 2005), la déplétion des pDC aggrave les manifestations de la réaction allergique. De plus, l'injection intra-trachéale de pDC durant la seconde phase diminue l'inflammation pulmonaire (Kool et al., 2009). L'effet protecteur des pDC dépend alors de leur expression de B7-H1/PDL1 mais est indépendant de leur expression d'IDO ou d'ICOS-L (Kool et al., 2009). Ainsi, à l'inverse des cDC, les pDC sont également impliquées dans la réduction de l'immuno-pathologie allergique. Dans le même sens, l'infection sévère par le virus RSV est associée à une inflammation excessive conduisant à une hypersensibilité pulmonaire. Les pDC sont également recrutées en grand nombre dans les poumons des souris infectées par RSV et leur déplétion aggrave l'inflammation pulmonaire (Smit et al., 2006; Wang et al., 2006). De plus, les pDC infectées par RSV n'induisent qu'une faible prolifération des LT CD4⁺ et leur production d'IL-10 *in vitro* (Wang et al., 2006). Ainsi, dans le cas d'infections par RSV, les pDC limitent la réplication virale par la production d'IFN de type I mais limitent également l'inflammation pulmonaire par la différenciation de Tr1.

2.5.3.2 Les pDC sont responsables de tolérance orale

Les antigènes ingérés tels que les protéines alimentaires, les haptènes contenus dans les aliments et les antigènes dérivés de la flore intestinale sont également soumis à une tolérance induite qui permet d'éviter des réactions allergiques de type hypersensibilité retardée (DTH) lors d'une exposition ultérieure. Dans un modèle murin d'hypersensibilité retardée de contact (CHS) la sensibilisation est réalisée par application cutanée d'un haptène fort (DNFB) suivie d'une seconde application sur l'oreille qui conduit alors à un oedème inflammatoire mesurable. Le gavage préalable des souris par le DNFB conduit à une diminution du nombre de LT CD8⁺ spécifiques capables de se différencier en effecteurs cytotoxiques *in vivo* et les souris sont alors tolérantes vis-à-vis de l'antigène et résistante à la CHS. La déplétion des pDC durant le gavage inhibe l'induction de cette tolérance orale et l'ingestion de l'antigène

devient alors suffisante pour sensibiliser les souris. En revanche, l'injection au moment de la sensibilisation de souris naïves de pDC isolées du foie des souris gavées par le DNFB inhibe le développement de la CHS de façon spécifique de l'antigène. Ainsi, les pDC du foie sont responsables de la tolérance orale. Notamment, cette tolérance est indépendante de la présence des LT CD4⁺. De plus, suite au gavage, les pDC du foie mais pas de la rate sont capables de supprimer *in vitro* et de façon spécifique de l'antigène, la prolifération des LT CD8⁺ issus de souris sensibilisées suggérant que la présentation des antigènes par les pDC du foie induit directement l'anergie ou la délétion de LT CD8⁺ spécifiques (Goubier et al., 2008).

2.5.3.3 Les pDC favorisent la tolérance aux greffes

Les pDC sont également impliquées dans l'induction de tolérance aux greffes d'organes et la prévention des maladies du greffon contre l'hôte lors de greffes de cellules hématopoïétiques allogéniques.

Dans un modèle murin de greffe cardiaque allogénique, les greffons, le sang et les ganglions des souris tolérantes contiennent des pDC présentant un complexe CMH-II peptide constitué d'un allopeptide issu du donneur et d'une molécule du CMH-II de l'hôte. Les pDC présentatrices semblent migrer préférentiellement vers les ganglions et y recruter les Treg via la sécrétion de la chimiokine CCL17. Alors que la déplétion des pDC ou l'inhibition de leur migration vers les ganglions abroge l'efficacité du protocole de tolérisation, le transfert adoptif de pDC présentatrices prolonge la survie de la greffe et augmente le nombre de Treg chez les souris non tolérisées. Enfin, les pDC présentatrices isolées des ganglions des souris tolérantes induisent l'acquisition des marqueurs spécifiques des Treg par les LT CD4⁺ transgéniques naïfs *in vitro*. Ainsi, les pDC semblent bénéfiques pour la prise de greffe par leur capacité à présenter les antigènes issus du donneur et à induire ou expandre des Treg spécifiques des alloantigènes (Ochando et al., 2006). De plus, en conséquence de leur capacité à induire la différenciation des LT allogéniques en cellules Tr1, l'injection de pDC du donneur favorise également la prise de greffe d'organes (Abe et al., 2005), de peau, ou de cellules hématopoïétiques (Fugier-Vivier et al., 2005) en inhibant la réponse allogénique de l'hôte contre la greffe. En parallèle, la présence d'un plus grand nombre de pDC dans le greffon, est associée à une protection accrue vis-à-vis de la maladie du greffon contre l'hôte suggérant que les pDC du donneur suppriment également la réponse inverse (Arpinati et al., 2000).

Ainsi, en tant qu'APC, les pDC sont également impliquées dans le contrôle négatif des réponses immunes permettant d'empêcher le développement d'allergies aux antigènes de l'environnement, d'immuno-pathologies inflammatoires lors d'infection et favorisent la tolérance aux greffes.

CHAPITRE III
Altérations fonctionnelles des cellules dendritiques
associées au cancer

La capacité des tumeurs à échapper à l'immuno-surveillance est associée à un grand nombre de défauts des cellules du système immunitaire et en particulier des DC. Les altérations liées au cancer concernent toutes les étapes du cycle des DC, de leur développement à leur capacité d'induction des réponses T.

3.1 Altération de la différenciation des cDC

3.1.1 Altération du nombre de cDC chez les individus porteurs de tumeurs

Chez l'homme, de nombreux cancers tels que le cancer de la tête et du cou, du poumon, du foie, de la prostate, du pancréas et du sein sont associés à une diminution du nombre de cDC circulantes corrélée au stade clinique des tumeurs (Almand et al., 2000; Beckebaum et al., 2004; Della et al., 2003; Sciarra et al., 2007). Notamment, les cDC ou DC myéloïdes sont généralement plus affectées par cette diminution que les pDC (Bellone et al., 2006; Della et al., 2003; Sakakura et al., 2006; Tabarkiewicz et al., 2008). A cette diminution est associée l'apparition d'une population myéloïde immature hétérogène $Lin^- CD33^+ CMH-II^-$ n'exprimant pas les molécules de costimulation et constituée d'un mélange de précurseurs de monocytes/macrophages ($M-CSFR^+$) et de cDC ($CD11c^+$) ainsi que de cellules à des stades de différenciation plus précoces. Cette population présente une activité suppressive mais conserve cependant la capacité de se différencier en cDC matures allo-stimulatrices *in vitro* (Almand et al., 2000; Almand et al., 2001). L'importance de cette population est par ailleurs corrélée au stade clinique des tumeurs (Almand et al., 2000; Pinzon-Charry et al., 2005). Une population myéloïde suppressive similaire (MDSC), caractérisée par son phénotype $CD11b^+ GR1^+$, s'accumule également dans la moelle osseuse, la rate et les ganglions des souris porteuses de tumeurs dans de nombreux modèles (Pour revue (Marigo et al., 2008)). Chez l'homme comme chez la souris, cette population disparaît ou diminue après la chirurgie (Almand et al., 2000; Salvadori et al., 2000) et/ou les cDC retrouvent une proportion normale (Della et al., 2003; Hoffmann et al., 2002).

Ainsi, les tumeurs semblent induire par un effet systémique, une différenciation anormale des cellules myéloïdes conduisant à l'apparition de cette population immature et suppressive au dépend des cDC circulantes mais également des cellules de Langerhans (Ishida et al., 1998). Dans ce sens, les cDC générées *in vitro* à partir de moelle osseuse issue de souris porteuses de tumeurs et donc en l'absence de tout signal inhibiteur systémique induisent une réponse anti-tumorale efficace *in vivo* au contraire des cDC isolées de rates de ces même souris exposées à

l'effet tumoral pendant leur différenciation (Gabrilovich et al., 1996b; Gabrilovich et al., 1996c).

3.1.2 Facteurs impliqués dans l'altération de la différenciation des cellules myéloïdes

Un certain nombre de facteurs présents dans le sérum de patients atteints de tumeurs et/ou dans les surnageants tumoraux, produits par les cellules tumorales elles mêmes ou par les cellules infiltrant les tumeurs, a été décrit pour altérer la différenciation des cDC humaines et murines à partir de monocytes, de progéniteurs CD34⁺ ou de cellules de moelle osseuse. Le premier facteur identifié pour altérer la différenciation des progéniteurs CD34⁺ humains *in vitro* fût le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Gabrilovich et al., 1996a). *In vivo*, un taux élevé de VEGF plasmatique est corrélé positivement à l'occurrence des MDSC chez les patients atteints de cancer (Almand et al., 2000) et négativement au nombre de DC différenciées infiltrant les tumeurs (Saito et al., 1998). De plus, la perfusion de VEGF chez l'animal naïf induit une augmentation de la population GR1⁺ et une diminution des DC matures (Gabrilovich et al., 1998). En revanche la neutralisation du VEGF diminue la population de MDSC chez les patients atteints de cancer du poumon (Almand et al., 2000) et restaure le nombre et la fonction des cDC spléniques (Gabrilovich et al., 1999) et des cellules de Langerhans (Ishida et al., 1998) chez les souris porteuses de tumeurs. D'autres facteurs solubles tels que la PGE2 (Sharma et al., 2003; Sombroek et al., 2002), l'IL-6, le M-CSF (Menetrier-Caux et al., 1998), l'IL-10 (Allavena et al., 1998; Beckebaum et al., 2004) ainsi que des métabolites tumoraux tels que l'acide lactique (Gottfried et al., 2006) et les gangliosides (Peguet-Navarro et al., 2003) mais également les exosomes tumoraux (Yu et al., 2007) ont également été décrits pour affecter *in vitro* ou *in vivo* la différenciation des cDC murines et humaines en faveur de cellules présentant un phénotype de MDSC (CD11b⁺ GR1⁺ chez la souris) ou de type monocytaire (CD14⁺ CD16⁺ chez l'homme) ou macrophagique (F4/80⁺ chez la souris, ou GM-CSFR⁻ M-CSFR⁺ chez l'homme). Notamment, la majorité de ces facteurs (solubles ou exosomes) activent de façon directe ou indirecte, via la sécrétion d'IL-6 et/ou de M-CSF, la voie de signalisation du facteur de transcription STAT3 indispensable à la différenciation des MDSC (Gottfried et al., 2006; Nefedova et al., 2004; Yu et al., 2007). En effet, l'activation de la voie STAT3 par les facteurs tumoraux, induit l'expression de la protéine S100A9/MRP14 qui inhibe alors via la promotion de la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) la différenciation des cDC et favorise l'accumulation de MDSC *in vitro* et *in vivo* (Cheng et al., 2008). De plus, l'IL-6 et le M-CSF semblent

également agir de façon autocrine ou paracrine (Gottfried et al., 2006; Yu et al., 2007) en favorisant l'expression de leurs propres récepteurs au dépend de celui du GM-CSF (Menetrier-Caux et al., 1998; Menetrier-Caux et al., 2001).

3.2 Altération de la maturation des cDC et de leur sécrétion de cytokines

3.2.1 Altération des cDC infiltrant les tumeurs

La plupart des études chez l'homme ont été réalisées à partir des cDC du sang de patients. Bien que des altérations fonctionnelles aient été observées (Gabrilovich et al., 1997), celles-ci ne reflètent probablement pas ce qui se passe dans les tumeurs de par la co-purification de la population de MDSC.

En effet, bien que la différenciation des cellules myéloïdes soit globalement altérée chez les individus porteurs de tumeurs, celles-ci sont cependant généralement infiltrées par des cDC périphériques (DC interstitielles et/ou cellules de Langerhans) (Bell et al., 1999; O'Donnell et al., 2007; Perrot et al., 2007; Tabarkiewicz et al., 2008; Treilleux et al., 2004; Vermi et al., 2003) mais également par des pDC (Bontkes et al., 2005; Hartmann et al., 2003; O'Donnell et al., 2007; Perrot et al., 2007; Salio et al., 2003; Tabarkiewicz et al., 2008; Treilleux et al., 2004; Vermi et al., 2003; Zou et al., 2001). Peu de données existent à ce jour sur la fonctionnalité des pDC associées aux tumeurs (TApDC). Celles-ci seront abordées dans la discussion et ne seront donc pas développées dans cette partie.

Les cDC associées aux tumeurs (TADC) humaines ou murines sont généralement phénotypiquement immatures (Chaux et al., 1996; Chaux et al., 1997; Perrot et al., 2007; Vicari et al., 2002) et non allo-stimulatrices (Chaux et al., 1997; Perrot et al., 2007; Troy et al., 1998; Vicari et al., 2002) alors que les cDC matures sont confinées à la périphérie des tumeurs (Bell et al., 1999; Ladanyi et al., 2007; Nestle et al., 1997; Sandel et al., 2005; Troy et al., 1998; Vermi et al., 2003). Certaines tumeurs expriment la chimiokine CCL20/MIP-3 α , et pourraient ainsi recruter spécifiquement les cDC immatures CCR6⁺ (Bell et al., 1999; Thomachot et al., 2004). La surexpression de CCL20 dans une lignée tumorale augmente en effet l'infiltration des tumeurs par des cDC immatures mais également la croissance tumorale suggérant que l'augmentation du nombre de cDC immatures dans les tumeurs n'est non

seulement pas suffisante pour induire une réponse anti-tumorale mais pourrait également être bénéfique à la tumeur (cf partie 3.4) (Bonnotte et al., 2004).

Dans ce sens, dans les rares études réalisées *ex vivo*, les TADC fraîchement isolées de diverses tumeurs humaines ou murines semblent réfractaires en terme de maturation phénotypique et fonctionnelle à de nombreux signaux induisant la maturation des DC tels que les signaux inflammatoires GM-CSF + TNF- α , le signal T CD40-L (Chaux et al., 1997), les TLR-L (Bonnotte et al., 2004; Perrot et al., 2007) ainsi que la combinaison LPS + IFN- γ + anti-CD40 associant un signal de danger microbien à des signaux T (Vicari et al., 2002). En parallèle, les TADC isolées de tumeurs du poumon humaines et/ou de tumeurs du colon murines sont également altérées pour la production d'IL-12, de TNF- α mais pas de l'IL-10 (Perrot et al., 2007; Vicari et al., 2002).

Ainsi, les tumeurs ne recrutent pas seulement des DC immatures mais agissent également négativement sur la capacité de maturation et de sécrétion de cytokines des cDC différenciées.

3.2.2 Rôle paracrine/autocrine de l'IL-10 dans l'inhibition des cDC

La majorité des études réalisées pour caractériser l'effet de l'environnement tumoral sur les fonctions des cDC a été réalisée *in vitro* sur des cDC isolées de donneurs sains ou de souris naïves ou générées *in vitro* à partir de précurseurs. L'environnement tumoral est généralement modélisé par des surnageants tumoraux ou par les facteurs supposés impliqués dans son effet. De nombreuses études montrent ainsi une diminution de la capacité allo-stimulatrice et de la production d'IL-12 associée ou non à une augmentation de la production d'IL-10 par les cDC différenciées *in vitro* en présence de surnageants tumoraux (Bellone et al., 2006; Gottfried et al., 2006; Kiertscher et al., 2000; Sombroek et al., 2002). Cependant, l'altération fonctionnelle des cDC dans ces conditions semble plus probablement liée à une altération de leur différenciation comme détaillée précédemment.

L'IL-10 est reconnue pour sa capacité à inhiber la maturation des cDC différenciées et leur production d'IL-12 en réponse à divers signaux (Kalinski et al., 1998; McBride et al., 2002). Cette cytokine anti-inflammatoire est produite par de nombreux types cellulaires dans les tumeurs dont les cellules tumorales, les LT, les Treg, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) et les cDC elles mêmes. Notamment, sa neutralisation *in vitro* ou *in vivo*, dans un modèle murin de tumeur du colon, restaure la capacité allo-stimulatrice des TADC ainsi que leur sécrétion d'IL-12 et de TNF- α en réponse au CpG (Vicari et al., 2002). De plus, les TADC isolées de souris déficientes pour l'IL-10 sont alors capables de produire de l'IL-12 en

réponse au CpG seul (Dercamp et al., 2005). Chez l'homme également, la neutralisation de l'IL-10 *in vitro* restaure la production d'IL-12 et de TNF- α par les TADC isolées de tumeurs du poumon en réponse au LPS mais pas au CpG (Perrot et al., 2007). La différence de réponse au CpG dans les études murines et humaines tient au fait que les cDC humaines au contraire des cDC murines n'expriment pas le TLR9.

Dans les tumeurs ovariennes, l'IL-10 produite par les macrophages altère également la fonction des cDC par induction de leur expression de B7-H1/PDL1. L'interaction de B7-H1/PDL1 avec son récepteur PD1 sur les LT inhibe alors la production d'IL-12 et induit la production d'IL-10 par les cDC en réponse aux signaux T (Curiel et al., 2003). Les cellules tumorales elles mêmes peuvent également altérer la réponse des DC aux ligands des TLR. En effet, l'incubation de cDC murines avec des lignées tumorales irradiées résulte en une inhibition de l'expression des molécules du CMH-II, des molécules de costimulation activatrices et de la sécrétion d'IL-12, de TNF- α et d'IL-6 en réponse à une stimulation simultanée ou ultérieure par les ligands des TLR3 et 4. En revanche, l'expression des molécules inhibitrices B7-H1/PDL1 et B7-DC/PDL2 est augmentée. Cette altération impliquerait l'association de contacts cellulaires et de facteurs solubles (Idoyaga et al., 2007). Dans ce sens, la PGE2 produite par les tumeurs a été impliquée dans l'induction de la sécrétion d'IL-10 par de nombreuses cellules (Huang et al., 1996b; Sharma et al., 1999; Stolina et al., 2000) et notamment par les cDC murines résultant ainsi en l'inhibition de leur maturation et de leur sécrétion d'IL-12 en réponse au LPS (Ahmadi et al., 2008). La PGE2 inhibe également la production d'IL-12 par les cDC humaines en réponse au LPS (Son et al., 2006).

Chez l'homme, les Treg activés inhibent la maturation phénotypique et fonctionnelle des cDC en réponse aux ligands des TLR. L'inhibition de la production des cytokines inflammatoire est médiée par l'IL-10 alors que l'inhibition de l'expression de molécules de costimulation est dépendante d'un contact cellulaire (Houot et al., 2006). Les Treg favorisent également par contact cellulaire la production d'IL-10 et l'expression de la molécule inhibitrice B7H3/PDL3 par les cDC murines au dépend de celle du CD86 résultant en une diminution de leur capacité allo-stimulatrice. Cependant, cet effet peut être réversé par le LPS (Mahnke et al., 2007). De plus, ces deux études ne sont pas directement reliées au cancer et chez la souris, les Treg ne semblent pas impliqués dans l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 en réponse au CpG par les TADC qui est médiée par l'IL-10 endogène produite par les TAM ou par les TADC elles mêmes (Dercamp et al., 2005).

Ainsi, quel que soit le type cellulaire producteur d'IL-10, cette cytokine semble majoritairement impliquée dans l'inhibition fonctionnelle des cDC associées aux tumeurs. Elle agirait de façon paracrine ou autocrine sur les cDC en inhibant leur maturation phénotypique et fonctionnelle ainsi que leur production de cytokines inflammatoires en réponse aux signaux de danger microbiens ou inflammatoires et aux signaux associés aux LT.

3.3 Incapacité des TADC à induire des réponses anti-tumorales

L'induction d'une réponse anti-tumorale efficace suppose la capture des antigènes tumoraux par les TADC *in situ*, leur maturation phénotypique, leur migration vers les organes lymphoïdes et l'activation des effecteurs T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques. Toutes ces étapes peuvent alors être la cible d'altérations par l'environnement tumoral.

3.3.1 Capture *in situ* et présentation des antigènes tumoraux par les TADC *in vitro* et dans les ganglions drainant les tumeurs *in vivo*

De nombreuses études chez les animaux porteurs de tumeurs démontrent que les premières étapes de l'induction de la réponse cytotoxique anti-tumorale sont au moins en partie fonctionnelles. La première étude *ex vivo* des TADC isolées de tumeurs du colon de rat montre que ces cellules induisent la prolifération des LT spléniques d'animaux préalablement immunisés contre la tumeur (Chaux et al., 1993). Ce résultat a par la suite été étendu dans différents modèles. Ainsi, les TADC isolées de tumeurs de colon murines induisent l'activation des clones T CD8⁺ spécifiques des antigènes tumoraux (Chiodoni et al., 1999; Vicari et al., 2002). De plus, les TADC isolées de thymomes exprimant l'ovalbumine activent la prolifération des OT-I *in vitro* (Dercamp et al., 2005). Ces observations suggèrent indirectement que les TADCs sont capables d'acquérir les antigènes tumoraux *in situ* et de les présenter aux LT CD8⁺ spécifiques. En effet, les TADC capturent efficacement des billes injectées dans les tumeurs (Gerner and Mescher, 2009; Preynat-Seauve et al., 2006) et les TADC isolées de mélanomes présentent des inclusions cytoplasmiques de mélanine suggérant la capture de matériel tumoral (Stoitzner et al., 2008).

Enfin, les LT CD8⁺ transgéniques spécifiques d'antigènes tumoraux modèles (E1A, ovalbumine, gp100, Ag T du virus SV40) transférés à des souris porteuses de tumeurs de différentes origines (tumeurs embryonnaires, thymomes, mélanomes, tumeurs de la prostate)

prolifèrent dans les ganglions drainant les tumeurs (Anderson et al., 2007; Curtsinger et al., 2007; Dercamp et al., 2005; Gerner et al., 2008; Stoitzner et al., 2008; van Mierlo et al., 2004). Ainsi, la présentation croisée des antigènes tumoraux s'opère également *in vivo* suggérant que les TADC ayant capturé du matériel tumoral *in situ* migrent efficacement vers les ganglions drainants.

3.3.2 Induction de tolérance en l'absence de support par les lymphocytes T CD4⁺

Quel que soit le modèle tumoral étudié, la prolifération des LT CD8⁺ spécifiques induite *in vitro* par les TADC reste faible (Chaux et al., 1993; Chaux et al., 1997; Dercamp et al., 2005). De même, la stimulation de LT allogéniques par les TADC résulte en une anergie secondaire spécifique des allo-antigènes (Chaux et al., 1997). De plus, si l'injection de TADC à des souris naïves peut conduire à l'acquisition d'une cytotoxicité dirigée contre les antigènes tumoraux par les LT CD8⁺ endogènes naïfs, celle-ci ne s'accompagne pas de la production d'IFN- γ suggérant que l'activation des LT CD8⁺ spécifiques par les TADC est déficiente (Dercamp et al., 2005; Vicari et al., 2002). Enfin, malgré leur prolifération primaire dans les ganglions drainant les tumeurs, les LT CD8⁺ spécifiques des antigènes tumoraux ne produisent que peu d'IFN- γ *in vivo* et ne s'accumulent pas dans les tumeurs (Gerner et al., 2008).

En revanche, l'injection d'un anticorps dirigé contre le CD40 mimant le signal médié par les LT CD4⁺ peut restaurer la capacité des DC des ganglions drainant les tumeurs à induire la sécrétion d'IFN- γ par les LT CD8⁺ endogènes *in vivo* et conduire au rejet de la tumeur (van Mierlo et al., 2004). De même, des tumeurs du colon surexprimant le GM-CSF et le CD40-L sont rejetées après une croissance initiale dans 70% des souris et les DC infiltrant les tumeurs sont matures (Chiodoni et al., 1999). Ainsi, l'induction de tolérance suite à la présentation croisée des antigènes tumoraux semble résulter de l'absence d'un support médié par les LT CD4⁺ aux DC.

Dans ce sens, au contraire des cellules OT-I, les cellules OT-II ne prolifèrent pas *in vivo* chez les animaux porteurs de tumeurs exprimant l'ovalbumine suggérant un défaut de la présentation des antigènes associés aux molécules du CMH-II (Gerner et al., 2008; Stoitzner et al., 2008). De plus, si les cDC CD8 α ⁺ résidentes des ganglions drainants sont responsables de la présentation croisée de l'ovalbumine dans ce modèle, aucune des populations de cDC des ganglions n'activent la prolifération des OT-II. Les TADC isolées des tumeurs exprimant

l'ovalbumine n'activent également pas les OT-II à moins d'être incubées au préalable avec de l'ovalbumine suggérant d'une part que ce défaut n'est pas uniquement lié à une absence de migration des TADC vers les ganglions et d'autre part, que l'altération de la présentation des antigènes est liée à la tumeur. En effet, cette altération semble également restreinte à la proximité de la tumeur *in vivo*. Si l'injection d'ovalbumine dans les tumeurs conduit à la prolifération des OT-I mais pas des OT-II, la même injection dans le flan contralatéral des souris porteuses de tumeurs induit la prolifération des deux populations (Gerner et al., 2008). Les TADC semblent ainsi inférieures aux DC interstitielles dermales non associées aux tumeurs pour leur capacité à apprêter les antigènes associés aux molécules du CMH-II. Ce défaut résulterait en une ignorance des antigènes tumoraux par les LT CD4⁺ spécifiques transgéniques ou endogènes naïfs qui ne sont pas activés, ne prolifèrent pas et n'infiltrent pas la tumeur (Gerner and Mescher, 2009). Cependant, un certain niveau de présentation semble exister dans le sens où au contraire des LT CD4⁺ non régulateurs, les Treg endogènes infiltrant ces tumeurs expriment CD69 et sont donc activés (Gerner et al., 2008).

En revanche, les TADC réactivées *in vitro* par CpG combiné à un anticorps anti-IL-10R sont capables d'induire la production d'IFN- γ par les LT cytotoxiques endogènes naïfs *in vivo*. De plus, cette combinaison procure un effet thérapeutique dépendant des LT CD4⁺ et CD8⁺ dans différents modèles tumoraux suggérant la restauration de la présentation des antigènes aux LT CD4⁺ (Vicari et al., 2002). Dans ce sens, la combinaison CpG et anti-IL-10R n'est pas efficace chez les souris déficientes pour le CD40 (Guiducci et al., 2005). Ainsi, l'IL-10 présente dans l'environnement tumoral ainsi que l'immaturité des DC sont en partie responsable de l'inhibition de la présentation des antigènes tumoraux aux LT CD4⁺.

Ainsi, si la présentation croisée des antigènes tumoraux semble exister, les LT CD4⁺ non régulateurs resteraient ignorants et ne fourniraient pas aux cDC le signal nécessaire pour leur activation complète des fonctions effectrices des LT cytotoxiques. En revanche, la levée de l'inhibition fonctionnelle des cDC par un signal mimant l'interaction avec les LT CD4⁺ ou par un signal de danger microbien combiné à une neutralisation de l'IL-10 pourrait conduire à l'induction d'une réponse anti-tumorale.

3.4 Contribution active des DC à la progression tumorale

En parallèle de leur inaptitude à induire une réponse anti-tumorale efficace, les DC peuvent également contribuer activement à la progression tumorale par différents mécanismes qui

peuvent être directs en favorisant la prolifération de cellules tumorales ou indirects via la suppression active des réponses T. Dans ce sens, la présence de pDC est un facteur de mauvais pronostic pour les tumeurs mammaires humaines (Treilleux et al., 2004) ou les carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale (O'Donnell et al., 2007). En revanche, le facteur pronostic de l'infiltration des tumeurs par les cDC est variable selon le type de tumeur, les marqueurs utilisés pour les détecter, leur localisation ainsi que leur état d'activation. Ainsi, l'augmentation du nombre de DC immatures dans les tumeurs peut favoriser la croissance tumorale (Bonnotte et al., 2004). De plus, si l'infiltration des tumeurs par des cDC matures est parfois associée à un meilleur pronostic (Ladanyi et al., 2007), elle peut également être associée à un mauvais pronostic (O'Donnell et al., 2007; Sandel et al., 2005).

3.4.1 Promotion directe de la croissance tumorale

Les pDC au contraire des cDC, sont activement recrutées dans les ascites ovariennes malignes par la chimiokine CXCL12/SDF-1 (Zou et al., 2001). Les pDC isolées de ces ascites et réimplantées dans un implant de matrigel à des souris immuno-déficientes sont capables d'induire une angiogénèse *in vivo* par leur production de TNF- α et d'IL-8. En revanche, les cDC par leur production d'IL-12 inhibent l'angiogénèse induite par le VEGF (Curiel et al., 2004). Ainsi, le recrutement sélectif des pDC pro-angiogéniques par les tumeurs ovariennes favoriserait l'irrigation de la tumeur et la croissance tumorale.

Dans les tumeurs mammaires humaines, les TADC semblent également promouvoir la croissance tumorale en induisant la sécrétion d'IL-13 par les LT CD4⁺. L'IL-13 délivrerait alors un signal positif aux cellules tumorales en activant la voie STAT6 et favoriserait la croissance tumorale mammaire dans un modèle de souris humanisé (Aspord et al., 2007).

3.4.2 Suppression des réponses immunes

3.4.2.1 Inhibition directe de la prolifération des lymphocytes T par les DC

La présence de pDC exprimant IDO dans les ganglions drainant les mélanomes est associée à un mauvais pronostic. Chez la souris, cette expression semble restreinte à une sous population des pDC exprimant le marqueur CD19. En conséquence, les pDC isolées des ganglions drainant les tumeurs exercent une activité suppressive directe sur la prolifération primaire des

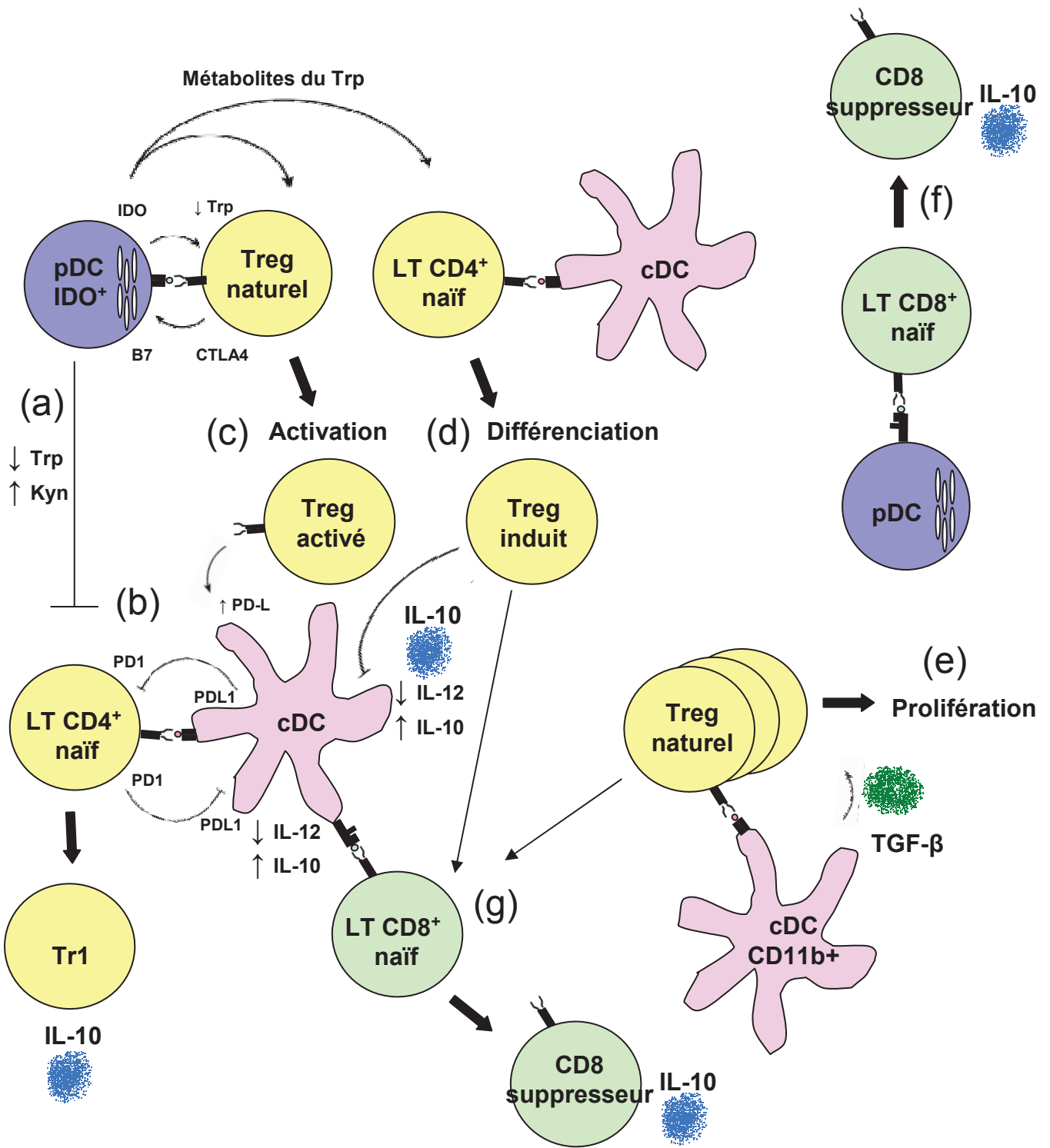


Figure 8 : Suppression des réponses immunes par les DC dans les ganglions drainants les tumeurs

LT et induisent également leur anergie secondaire par leur déplétion locale en tryptophane ou leur production de métabolites inhibiteurs tels que la kynurénine (Figure 8 (a)) (Munn et al., 2004).

Notamment, les TADC expriment également IDO dans différentes tumeurs humaines (Bergwelt-Baildon et al., 2006) et murines (Dercamp et al., 2005). La PGE2 a ainsi été impliquée dans l'induction de l'expression d'IDO ainsi que la forme sécrétée du récepteur de l'IL-2 (CD25s) par les cDC BDCA-1⁺ humaines. Cependant, la fonctionnalité de l'enzyme nécessite une activation supplémentaire par des signaux inflammatoires. Les surnageants de ces cDC inhibent alors directement la prolifération des LT par leur pauvreté en tryptophane, leur richesse en métabolites suppresseurs mais également par leur séquestration de l'IL-2. (Bergwelt-Baildon et al., 2006).

Enfin, les TADC isolées de tumeurs mammaires spontanées murines inhibent directement la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ par des LT CD8⁺ par un mécanisme dépendant du métabolisme de l'arginine. Dans un modèle de régression tumorale associé aux LT CD8⁺, le transfert de ces TADC favorise la reprise tumorale sans altérer la réponse T primaire et la régression initiale (Norian et al., 2009).

L'IL-10 produite par les macrophages des ascites ovariennes ainsi que le VEGF produit par les cellules tumorales elles-mêmes induisent également l'expression de la molécule inhibitrice B7-H1/PDL1 par les cDC. La reconnaissance de cette molécule par son ligand PD1 sur les LT inhibe leur prolifération et induit leur sécrétion d'IL-10 (Curiel et al., 2003) (Figure 8 (b)).

Ainsi, les cDC et les pDC sont capables d'inhiber directement les réponses T dans les ganglions et/ou les tumeurs par des mécanismes privant les LT en prolifération des métabolites fondamentaux tels que l'IL-2, le tryptophane et l'arginine, par leur production de métabolites suppresseurs ou leur expression de molécules inhibitrices.

3.4.2.2 Activation et induction de lymphocytes T suppresseurs par les DC

L'expression d'IDO par les pDC des ganglions drainants les mélanomes murins est également impliquée dans l'activation des Treg préexistants. Cette activation résulte d'un dialogue à double sens entre les pDC et les Treg. En effet, les interactions respectives entre les récepteur CTLA-4 et le TCR des Treg d'une part et les molécules de costimulation et les molécules du CMH-II des pDC d'autre part semblent nécessaires pour l'activation de la fonction d'IDO. La déplétion du tryptophane activerait alors la fonction suppressive des Treg (Figure 8 (c)). Les

Référence	Origine des DC	Cellule Facteur impliqués	Conséquence sur les DC	Conséquence sur la réponse T	Conséquence pour la tumeur	Espèce	Modèle		
							lignée / (Tg) souris transgénique	type de cancer	
CDC	Chaux 1997	Tumeur		Absence d'expression des molécules de costimulation	Absence de prolifération (MLR) Anergie secondaire		Rat	PROb	Colon
	Troy 1998	Tumeur		Absence d'expression des molécules de costimulation	Absence de prolifération (MLR)		Homme		Rein
	Vicari 2002	Tumeur	IL-10	Inhibition de la production d'IL-12	Absence de prolifération (MLR) Absence de production d'IFN γ par les LT CD8+		Souris	C26-6CK B16 TSA LL2 (Tg) X/myc	Colon Mélanome Mammaire Poumon Hépatique
	Curiel 2003	DC dérivées de macrophages	Macrophages IL-10	Expression de B7-H1 (interaction B7-H1/PD1) Inhibition de la production d'IL-12 Production d'IL-10	Absence de prolifération (MLR) Absence de production d'IFN γ et IL-2 Production d'IL-10		Homme		Ovaire
	Bonnotte 2004	Tumeur	MIP3- α	Recrutement dans la tumeur		Augmentation de la croissance tumorale	Rat	PROb-MIP3 α	Colon
	Dercamp 2005	Tumeur	IL-10 + Treg	Inhibition de la production d'IL-12 Expression d'IDO	Absence de prolifération des LT CD8+ Inhibition de la production d'IFN γ Différenciation de LT CD8+ suppresseurs		Souris	EG-7	Thymome
	Guiducci 2005	Tumeur	IL-10	Inhibition de la production d'IL-12	Absence de prolifération (MLR) Inhibition de la production d'IFN γ Absence de signal CD40-L Absence d'activation des LT CD8+		Souris	TSA 4T1 MCA38	Mammaire Colon
	Ghiringhelli 2005	Ganglion drainant	Survivants tumoraux	Production TGF- β	Prolifération des Treg		Souris Rat	B16 PROb/REGb	Mélanome Colon
	Bergwelt Baildon 2006	DC dérivées de monocytes	PGE2	Inhibition de la production d'IL-12 Expression d'IDO Sécrétion CD25s	Suppression de la prolifération des LT (induite par d'autres APC)		Homme		Mammaire Colon Gastrique
	Perrot 2007	Tumeur	IL10	Absence d'expression des molécules de costimulation Faible production d'IL-12	Absence de la prolifération des LT (MLR)		Homme		Poumon
	Idoyaga 2007	DC dérivées de moelle osseuse	Cellules tumorales	Expression de B7-H1 et B7-DC Inhibition de la production de cytokines (IL-6 TNF- α , IL-12)			Souris	B16 TC-1 J558	Mélanome Fibroblastes de poumon transformés Plasmocytome
	Aspod 2007				Production d'IL-13	Phosphorylation Stat6	Souris humanisées	Hs578T	Sein
	Ahmadi 2008		PGE2	Production d'IL-10	Inhibition de la production d'IFN γ par les LT CD8+ Activation abortive des LT CD8+		Souris	RencaHA	Rein
	Stoitzner 2008	Tumeur		Absence de présentation des antigènes aux LT CD4+	Absence d'activation des LT CD8+		Souris	B16	Mélanome
	Gerner 2008 2009			Absence de présentation des antigènes aux LT CD4+	Absence d'activation des LT CD8+		Souris	EG-7 B16	Thymome Mélanome
Tumeur			Migration réduite vers le ganglion drainant Capture réduite Présentation réduite des antigènes aux LT CD4+	Absence d'activation des LT CD4+	Peu d'infiltration par les LT CD4+	Souris	B16	Mélanome	
Norian 2009	Tumeur		Dégradation de l'arginine	Suppression de la prolifération et de la production d'IFN γ des LT CD8+ (induite par d'autres APC) Anergie secondaire		Souris	(Tg) NeuT	Mammaire	
pDC	Zou 2001	Ascite			Absence de prolifération des LT (MLR) Production d'IL-10 Différenciation de LT CD4+ suppresseurs		Homme		Ovaire
	Hartmann 2003	Sang	Survivants tumoraux	Inhibition de la production d'IFN- α			Homme		Tête et cou
	Curiel 2004	Ascite		Production de TNF- α et d'IL-8		Angiogénèse	Homme		Ovaire
	Treilleux 2004	Tumeur				Facteur de mauvais pronostic	Homme		Sein
	Munn 2004	Ganglion drainant		Expression d'IDO	Suppression de la prolifération des LT (induite par d'autres APC)		Souris	B16	Mélanome
	Wei 2005	Ascite			Production d'IL-10 Différenciation de LT CD8+ suppresseurs		Homme		Ovaire
	Perrot 2007	Tumeur		Absence d'expression des molécules de costimulation Faible production d'IFN- α	Absence de prolifération des LT (MLR)		Homme		Poumon
	Sharma 2007	Ganglion drainant	Treg	Expression/activation d'IDO	Activation des Treg		Souris	B16	Mélanome

Table 3 : Récapitulatif des modèles caractérisant les altérations des DC par les tumeurs

Treg activés par cette voie présentent une activité suppressive non spécifique distincte des Treg activés par d'autres voies. En effet, celle-ci ne s'opère pas par inhibition directe des réponses T via la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β mais de façon indirecte par induction de l'expression des molécules B7-H1/PDL1 et B7-DC/PDL2 sur les cDC (Figure 8 (b)). De plus, les métabolites du tryptophane conduisent également à la différenciation *de novo* des LT CD4⁺ naïfs instruits à proximité en Treg (Sharma et al., 2007) (Figure 8 (d)).

Les cDC sont également impliquées dans l'activation des Treg dans les ganglions drainants les tumeurs du colon chez le rat et les mélanomes chez la souris. En effet, une population de cDC immature CD11c⁺ CD11b⁺ CD103⁺ s'accumule dans les ganglions drainants ces tumeurs et induit par sa production de TGF- β , la prolifération des Treg naturels (Figure 8 (e)). Notamment, la production de TGF- β par ces DC est induite par des facteurs solubles provenant des cellules tumorales (Ghiringhelli et al., 2005).

Les pDC isolées d'ascites ovariennes et activées par le CD40-L induisent également la différenciation de LT CD8⁺ suppresseurs et producteurs d'IL-10 (Figure 8 (f)). De façon importante, ces cellules suppressives sont également retrouvées *in vivo*, dans les ascites des patientes mais pas dans le sang de donneurs sains (Wei et al., 2005). De plus, malgré la prolifération primaire des cellules OT-I dans les ganglions drainants les tumeurs murines exprimant l'ovalbumine, ceux ci suppriment également la prolifération des LT naïfs par leur production d'IL-10 et de TGF- β . Dans ce modèle, les Treg et l'IL-10 produite par les TAM ou par les TADC agissent en synergie pour inhiber l'acquisition des fonctions effectrices et favoriser l'acquisition d'une fonction suppressive par les LT CD8⁺ stimulés par les TADC (Dercamp et al., 2005)(Figure 8 (g)).

Ainsi, les cDC et les pDC détournent au profit de la tumeur les mécanismes de régulation des réponses immunes en activant les Treg naturels, la différenciation *de novo* de Treg et la différenciation de LT CD8⁺ suppresseurs spécifiques d'antigènes tumoraux.

RESULTATS

Objectifs

De nombreuses évidences suggèrent que les tumeurs sont au moins en partie reconnues par le système immunitaire. Cependant, peu de cas de régression spontanée ont été observés. Le cancer est associé à de nombreuses altérations des cellules du système immunitaire permettant aux tumeurs d'échapper à l'immuno-surveillance. Par leur position centrale dans l'induction des réponses immunes adaptative, les DC sont les cibles privilégiées pour ces altérations. Notre groupe a montré que l'infiltration des tumeurs mammaires par les pDC constituait un nouveau facteur indépendant de mauvais pronostic en terme de survie globale et de survie sans progression pour les patientes. Cette observation clinique est à la base de notre projet d'étude du rôle des pDC dans la progression tumorale et la réponse anti-tumorale.

Afin de comprendre le rôle négatif des pDC sur le pronostic des patientes atteintes de cancer du sein, nous avons développé un modèle murin de tumeur mammaire reflétant la pathologie humaine. A partir de tumeurs spontanées développées chez des souris transgéniques pour HER2/Neu, nous avons généré des lignées tumorales qui présentent un comportement différent suite à leur réimplantation orthotopique chez des souris immuno-compétentes. L'une d'elle semble échapper à l'immuno-surveillance par un processus d'immuno-edding alors que la lignée NEU15 semble utiliser un mécanisme d'échappement différent qui pourrait passer par son infiltration accrue en pDC et en Treg. Nous avons alors sélectionné ce modèle pour caractériser la fonctionnalité des pDC associées aux tumeurs (TApDC) en terme de réponse aux ligands des TLR et d'activation des réponses T.

Du fait de leur rôle clé dans les réponses anti-virales, les pDC apparaissent également comme des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cancer du sein. Cependant, la capacité des pDC à capturer des antigènes cellulaires exogènes et à réaliser la présentation croisée est encore largement méconnue. Nous avons ainsi souhaité déterminer les conditions nécessaires à l'induction d'une réponse anti-tumorale par les pDC. Nous avons émis l'hypothèse que l'infection virale des cellules tumorales pourrait provoquer leur reconnaissance et leur capture par les pDC résultant en l'activation de leur capacité à présenter les antigènes tumoraux et à induire une réponse effectrice.

Au-delà d'une question d'importance sur la physiopathologie des pDC associées aux tumeurs, ces données pourraient permettre d'améliorer les protocoles d'immunothérapie anti-tumorale dans le cancer du sein.

Article 1

Plasmacytoid dendritic cells infiltrating mouse mammary tumors display abrogated

TLR9 but conserved TLR7 responses

Isabelle Le Mercier, Nadège Goutagny, Dominique Pujol, Vanja Sisirak, Michael Gobert, Isabelle Durand, Isabelle Treilleux, Nathalie Bendriss-Vermare, Jacqueline Marvel, Jean-Yves Blay, Christophe Caux, and Isabelle Puisieux

Journal of Immunology : Soumis pour publication

PROBLEMATIQUE

De multiples altérations des cellules immunes, dont une partie a été détaillée dans l'introduction sont associées à la capacité des tumeurs à échapper à l'immuno-surveillance. Notre équipe a montré, dans le cancer du sein chez la femme, que l'infiltration des tumeurs par des pDC et/ou par des Treg constituaient de nouveaux facteurs de mauvais pronostic suggérant que ces deux populations participent à l'immuno-subversion des tumeurs. Parce qu'elles sont impliquées dans l'induction de tolérance dans différents modèles, les pDC associées aux tumeurs pourraient ainsi contribuer à la progression tumorale mammaire en favorisant l'induction de réponses suppressives. Cependant, ces cellules présentent une grande flexibilité dans leur capacité à induire l'immunité ou la tolérance. Bien qu'elles infiltrent de nombreuses tumeurs humaines, très peu de données existent sur la fonctionnalité des pDC dans les tumeurs. Leur rareté et la difficulté d'accès à un nombre suffisant de prélèvements humains rendent ainsi crucial le développement de modèles animaux permettant d'étudier l'effet du micro-environnement tumoral sur la fonction des pDC.

RESULTATS

Il existe de nombreux modèles murins de tumeurs mammaires orthotopiques, cependant, la plupart des tumeurs sont majoritairement infiltrées par des MDSC et des macrophages. Nous nous sommes donc initialement intéressés aux tumeurs mammaires spontanées développées chez les souris transgéniques FVB/N-MMTVneu-202Mul (MMTVneu) qui surexpriment le proto-oncogène de rat HER2/Neu sous la dépendance du promoteur MMTV spécifique de la

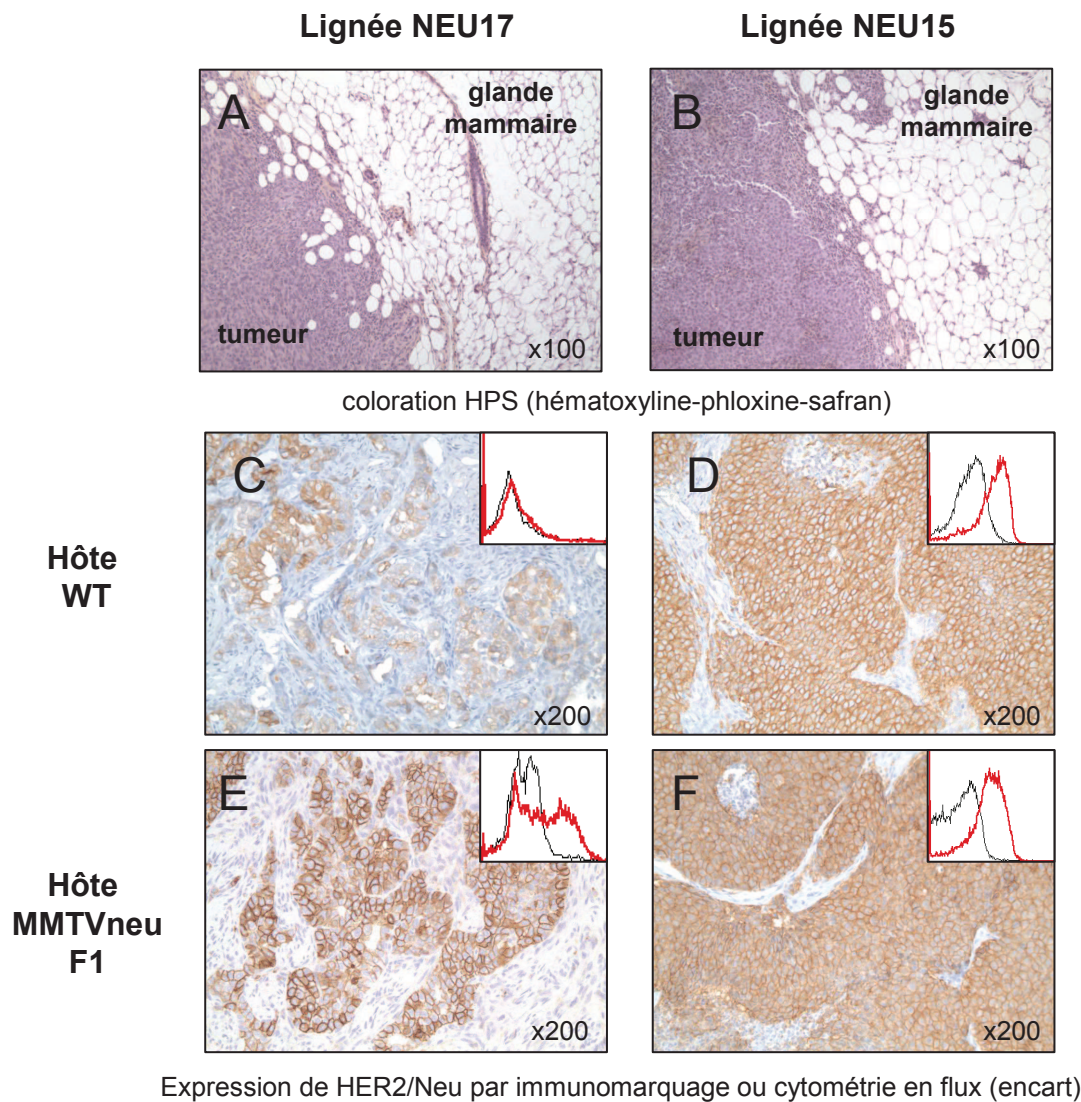


Figure R1 Modèles tumoraux mammaires par réimplantation orthotopique des lignées NEU15 et NEU17

A et B : La réimplantation orthotopique dans la glande mammaire de souris FVB WT des lignées NEU17 (A) et NEU15 (B) conduit au développement de tumeurs intramammaires. Les tumeurs NEU17 (E) et NEU15 (F) réimplantées par voie orthotopique chez des souris MMTVneu F1 transgéniques hétérozygotes pour HER2/Neu conservent l'expression de HER2/Neu visualisée par immunomarquage sur coupes fixées et cytométrie en flux (encart). En revanche, les tumeurs NEU17 (C) au contraire des tumeurs NEU15 (D) réimplantées par voie orthotopique chez des souris FVB WT perdent l'expression de HER2Neu.

glande mammaire. Nous avons en effet constaté que ces tumeurs présentent un infiltrat lymphocytaire plus représentatif de celui des tumeurs mammaires humaines. De plus, nous avons montré que ces tumeurs sont largement infiltrées par des DC CD11c⁺. Parmi celles-ci, une population majoritaire présente un phénotype CD11c⁺ CD11b⁺ CD4⁻ CD8⁻ B220⁻ semblable à celui des DC myéloïde interstitielles (mDC). Cependant, une faible proportion des DC présente le phénotype CD11c⁺ B220⁺ BST2⁺ Siglec-H⁺ CD11b⁻ caractéristique des pDC murines.

A partir de tumeurs spontanées, nous avons généré un grand nombre de lignées tumorales HER2/Neu positives. Toutes ces lignées conservent l'expression de HER2/Neu lorsqu'elles sont implantées par voie orthotopique à des hôtes immuno-tolérants vis-à-vis de HER2/Neu (transgéniques hétérozygotes MMTVneu F1). Cependant, la plupart, telle la lignée NEU17, perdent l'expression de HER2/Neu lorsqu'elles sont réimplantées chez des hôtes immuno-compétents vis-à-vis de HER2/Neu (non transgéniques FVB WT) (**Figure R1**). Cette perte spécifique de l'expression de HER2/Neu chez l'hôte immuno-compétent qui ne s'opère pas chez l'hôte immuno-tolérant suggère un processus d'immuno-edding qui pourrait être favorisé par la pression de sélection exercée par la forte réponse humorale développée par les souris FVB WT. En revanche, nous avons montré que les tumeurs dérivées de la lignée NEU15 conservent l'expression de HER2/Neu chez les hôtes immuno-compétents suggérant leur capacité à échapper à l'immuno-surveillance par un autre moyen que l'immuno-edding (**Figure R1**). En parallèle, nous avons montré que ces tumeurs sont significativement plus infiltrées par des pDC et des Treg que les tumeurs (spontanées ou réimplantées) développées chez les animaux immuno-tolérant vis-à-vis de HER2/Neu. Ces données suggèrent ainsi un modèle d'immuno-subversion médié par la lignée NEU15 mais pas la lignée NEU17, impliquant le recrutement de pDC et de Treg (**Figure R2**). Pour ses similitudes avec la pathologie humaine, nous avons donc sélectionné ce modèle afin de caractériser la fonctionnalité des pDC (TApDC) et des mDC (TAmDC) associées aux tumeurs.

Nous avons montré que les TApDC et les TAmDC isolées des tumeurs n'expriment pas les molécules de costimulation T. En accord avec leur immaturité phénotypique, les TApDC et les TAmDC conservent la capacité d'internaliser les antigènes modélisés par des billes fluorescentes *in vivo*.

Nous avons alors caractérisé la fonctionnalité de ces deux populations de façon individuelle après purification à partir des tumeurs en comparaison avec des pDC et des mDC normales isolées de rate ce qui n'a jamais été réalisé auparavant.

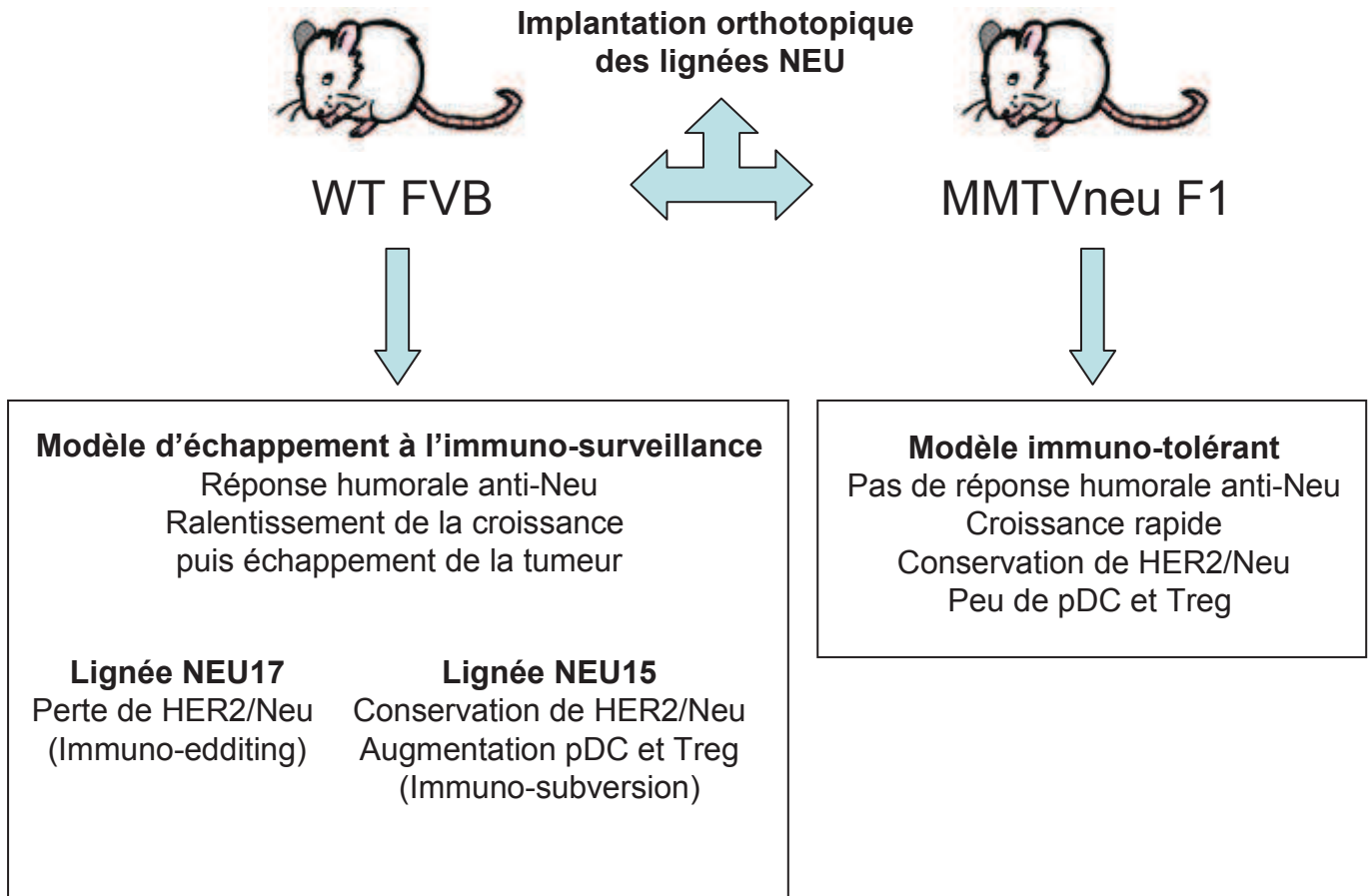


Figure R2 Modèles d'échappement à l'immuno-surveillance et modèle immuno-tolérant par reimplantation des lignées NEU chez les souris FVB WT ou MMTVneu F1

Nous avons ainsi montré que les TApDC isolées des tumeurs sont fonctionnellement altérées pour leur capacité à sécréter de l'IFN- α mais également de l'IL-6, du TNF- α , et les chimiokines MIP-1 α et RANTES en réponse aux deux ligands synthétiques du TLR9 CpG-A et CpG-B. En revanche et de façon particulièrement intéressante, la réponse des TApDC au virus Influenza et au CL075, ligands du TLR7 n'est pas ou peu altérée par l'environnement tumoral.

Au contraire, les TAmDC mûrissent spontanément en culture et produisent de grandes quantités de cytokines et de chimiokines mais pas d'IL-12. Notamment, par rapport à des mDC normales, les TAmDC produisent spécifiquement de grandes quantités d'IL-10.

Enfin, nous avons montré que les TAmDC, malgré leur maturation spontanée, et les TApDC sont bloquées pour leur capacité à activer la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques.

CONCLUSION

Ces résultats apportent donc de nouvelles connaissances sur la physiologie des pDC associées aux tumeurs et suggèrent l'importance de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les TApDC dans les tumeurs mammaires notamment via le TLR7. Le modèle que nous avons développé se prête également à de plus amples études des Treg et de leur interaction avec les pDC dans les tumeurs.

**Plasmacytoid dendritic cells infiltrating mouse mammary tumors display abrogated
TLR9 but conserved TLR7 responses**

Isabelle Le Mercier*, Nadège Goutagny*, Dominique Poujol*, Vanja Sisirak*, Michael Gobert*, Isabelle Durand*, Isabelle Treilleux[†], Nathalie Bendriss-Vermare*, Jacqueline Marvel[‡], Jean-Yves Blay*, Christophe Caux*, and Isabelle Puisieux*

Running title: Altered TLR9 response in mammary tumor infiltrating pDC

* UMR INSERM/CLB U590, Centre Léon Bérard, Equipe Cytokines et cancers,
Université Lyon1, ISPB, IFR62 Lyon France.

[†] Centre Léon Bérard, Département D'anatomie et Cytologie Pathologiques, Lyon France.

[‡] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U851, Lyon France.

Grant support: The Breast Cancer Research Foundation, la Ligue Nationale Contre le Cancer, comité de l'Ardèche, Institut National du Cancer" (CANCEROPOLE 2004-05, INCa ACI-63-04, and "METESCAPE"), ARC (ARC-3364) and Lyon Biopole (DEMINAP 2006-2010).

Address correspondence and reprint request to Dr Christophe CAUX, UMR Inserm/CLB U590, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon cedex 08, France; Tel : (33) 4 78 78 51 39; Fax : (33) 4 78 78 27 20; Email : cauxc@lyon.fnclcc.fr

Plasmacytoid dendritic cells infiltrating mouse mammary tumors display abrogated TLR9 but conserved TLR7 responses

Isabelle Le Mercier*, Nadège Goutagny*, Dominique Poujol*, Vanja Sisirak*, Michael Gobert*, Isabelle Durand*, Isabelle Treilleux[†], Nathalie Bendriss-Vermare*, Jacqueline Marvel[‡], Jean-Yves Blay*, Christophe Caux*, and Isabelle Puisieux*

ABSTRACT

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are key regulators of antiviral immunity. They rapidly secrete large amounts of interferon (IFN)- α , cross-present viral antigens and activate myeloid dendritic cells (mDC) to prime virus-specific T cells. In breast cancer, we previously reported that the pDC infiltrating primary tumors represent an independent prognostic factor associated with poor outcome. The current study was designed to understand this negative impact of tumor-associated pDC (TApDC). For this purpose, we have developed murine mammary tumor models that closely mimic the human pathology, including TApDC infiltration, thus allowing the analysis of their functionality in the tumor microenvironment. We showed that tumor-associated mDC (TAmDC) and TApDC are immature and preserve their ability to internalize antigens *in vivo*. Most importantly, TApDC are specifically altered for cytokine production in response to Toll-Like Receptor (TLR)9 ligands while preserving unaltered response to TLR7 ligands. TAmDC spontaneously mature and produce large amounts of cytokines, including IL-10, but are unable to secrete IL-12. Finally both subsets are inhibited in their ability to activate CD4⁺ T cells.

These results suggest that pDC and mDC are differentially altered in the tumor microenvironment. They further provide critical insights for developing new therapeutic strategies using TLR7 ligands to target TApDC activation in breast cancer.

INTRODUCTION

Clinical and experimental studies indicate that tumors are not ignored by the immune system. In breast cancer, patients frequently developed specific cellular and humoral antitumor immune responses against self tumor-associated antigens (Ag) such as the HER-2/neu protein (1,2). However, despite this active immunosurveillance, tumors still progress and escape through immunosubversion processes (3-5). In particular our team recently documented the intratumoral recruitment of regulatory T cells (Treg) as an escape mechanism in breast tumor (6). The understanding of the paradoxical role of the immune system during cancer development is a major challenge for new immunotherapy strategies.

Dendritic cells (DC), the most powerful antigen-presenting cells, play a key role in orchestrating adaptive immune responses. Two main populations of DC are recognized in mouse and human tissues, myeloid DC (mDC) and plasmacytoid DC (pDC). The effect of the

tumor microenvironment on DC functions has mainly been studied on the myeloid subset. In breast carcinomas, immature DC reside within the tumor, whereas mature DC are located in peritumoral areas (7). Our team contributes to show that several factors such as Interleukin (IL)-10, IL-6, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Transforming Growth factor (TGF)- α , Macrophages colony stimulating factor (M-CSF) and Prostaglandin E (PGE)-2 produced in the tumor environment impair mDC differentiation (8,9), maturation, and functions promoting tumor immunotolerance (10).

There is also increasing evidences implicating pDC in tumor immunity. pDC are key regulators of antiviral immunity at the interface of innate and adaptive immunity (11). pDC expressed Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9, which are endosomal sensors of microbial and self-RNA or DNA respectively. Activation of TLR7 or TLR9 by nucleic acids in pDC triggers signal transduction, leading to rapid secretion of large amounts of type I interferons (IFN), inflammatory cytokines, and chemokines (12-14).

After their encounter with viruses, they differentiate into mature DC and cross-present viral antigens directing T cell responses with considerable flexibility (15). pDC were also shown to suppress or limit inflammatory responses to respiratory syncytial virus (16,17), to airway allergens (18) or to oral Ag (19) and to promote allogeneic stem cell and solid cardiac engraftment (20,21) and tumor tolerance (22). At the opposite, uncontrolled activated pDC contribute to autoimmune disease breaking the tolerance against self Ag (23). In breast cancer, we have previously reported that pDC infiltrating the primary tumor represent an independent prognostic factor associated with poor outcome as measured by overall survival and time to disease progression (24). pDC also infiltrate other types of solid tumors including melanoma (25-28), cervical carcinoma (29), lung (30), head and neck (31), and ovarian carcinomas (32), with various consequences on immune response. In lung, head and neck, and ovarian carcinomas, tumor associated pDC (TApDC) have been shown to be immature (30), altered for IFN α production (30,31) and/or to promote tumor development through angiogenesis (33) and regulatory CD8⁺ T cells differentiation (22). Consequently, in oral squamous cell carcinoma as in breast cancer, pDC infiltration is correlated with poorer outcome. In contrast, TApDC can also become efficient therapeutic targets in melanoma, basal cell carcinoma and cutaneous T cell lymphoma after recruitment and activation by TLR7 ligands (26,34,35). pDC also demonstrate direct cytotoxic activity against tumor cells (36).

The current study was designed to understand the negative impact of TApDC on breast tumor patient prognosis. Because access to human breast tumor samples is limited, we developed

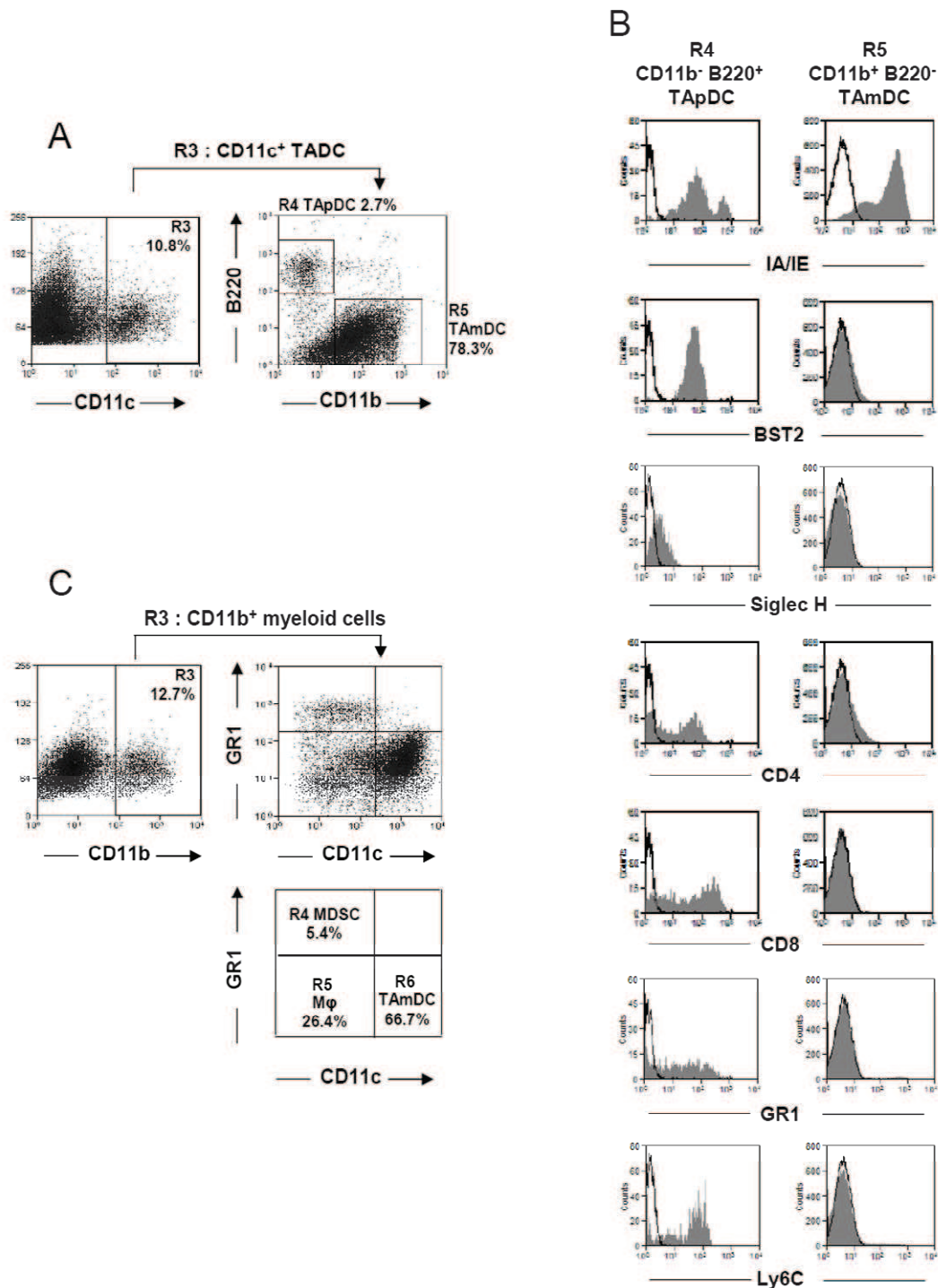


Figure 1: Identification of TApDC and TAmDC in MMTVneu spontaneous tumors

Single cell suspensions from MMTVneu spontaneous tumors were analysed for TADC subsets infiltration by flow cytometry after exclusion of dead cells and doublets (A) CD11c⁺ TADC were gated and TApDC were identified as B220⁺ CD11b⁻ cells and TAmDC as B220⁻ CD11b⁺ cells. (B) Gated on these settings, the expression profile of MHC class II molecules (IA/IE), BST2, Siglec H, CD4, CD8 α , Ly6G/C (GR1) and Ly6C on TApDC and TAmDC are shown (gray histograms). White histograms indicate the staining background obtained with an isotype-matched control monoclonal antibody. (C) CD11b⁺ myeloid cells were gated and MDSC identified as GR1⁺ CD11c⁻ cells, TAmDC identified as GR1⁻ CD11c⁺ cells and macrophages (M ϕ) identified as double negative cells were clearly distinguished.

preclinical animal models that closely mimic the human pathology, with sufficient pDC infiltration to analyze their functionality in the tumor microenvironment. We derived a murine mammary cell line, NEU15, from a tumor spontaneously arisen in the MMTVneu202Mul transgenic mice (MMTVneu) and expressing the wild-type rat HER-2/neu cDNA under the control of the mouse mammary tumor virus promoter (MMTV) (37). Spontaneous mammary tumors and NEU15 cell line implanted in the mammary fat pad of immunotolerant transgenic MMTVneu or immunocompetent FVB/N wild-type mice were infiltrated by mDC and pDC thus allowing to characterize their functions. We found that: 1) TAmDC and TApDC are immature and preserve their ability to internalize antigens *in vivo*, 2) more importantly, TApDC are specifically altered for cytokine production in response to TLR9 ligands while preserving unaltered response to TLR7 ligands, 3) TAmDC spontaneously mature and produce large amounts of cytokines including IL-10 but not IL-12 and 4) both subsets are blocked for the activation of CD4⁺ T cells.

RESULTS

Spontaneous HER-2/neu-expressing mammary tumors are infiltrated by different DC subsets

Female MMTVneu transgenic mice carrying the unactivated rat neu proto-oncogene under the control of the MMTV promoter developed focal, poorly differentiated ER- and HER-2/neu+ spontaneous tumors, after a long latency (Mean \pm SD: 10.5 \pm 2.6 months). Upon tumor dissociation and preparation of single cell suspension, the CD45⁺ leucocytic infiltrate was analyzed by flow cytometry for DC infiltration. Spontaneous tumors were highly infiltrated by CD45⁺ leucocytes which represented 14.3 \pm 9.2% of the total tumor cell dissociation. In particular, CD11c⁺ cells represented the most important infiltrating population (40.1 \pm 9.2%), thus identifying this model as particularly relevant for TADC functional characterization. The phenotypic characteristics of TADC were investigated using CD11b and B220 markers gated on CD11c⁺ cells. With these settings, TAmDC and TApDC can be easily identified by their exclusive expression of CD11b and B220, respectively (**Figure 1A**). We performed additional stainings gated on these two populations in order to confirm their identity.

CD11b⁻/B220⁺ TApDC represented 1 \pm 1.2% of CD11c⁺ TADC. TApDC expressed high levels of BST2 which further confirmed their identity (**Figure 1B**). They also expressed Siglec-H, even though at lower intensity than naive spleen pDC (data not shown). TApDC showed heterogeneous CD4 and CD8 α expressions, as previously described for naive spleen

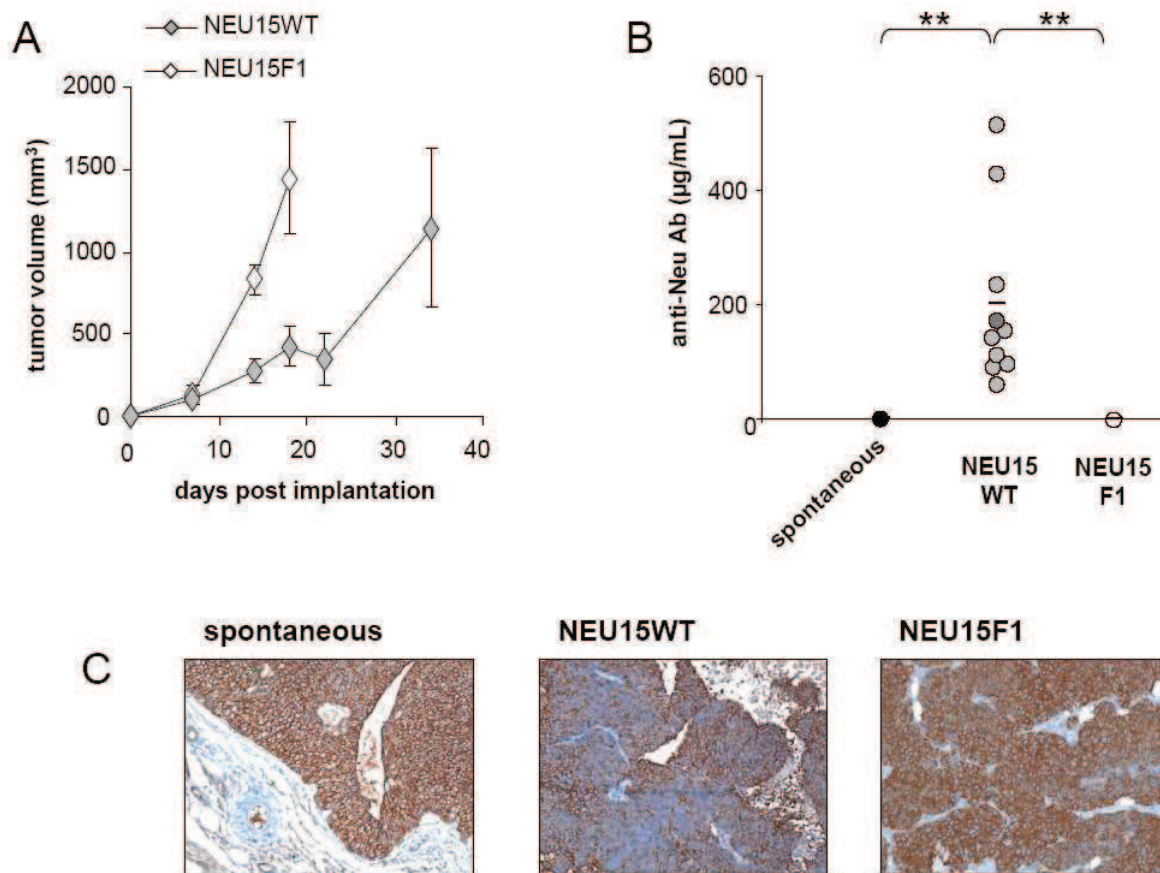


Figure 2: NEU15WT tumors escape immunosurveillance without immunoediting

(A) NEU15 tumor cells (5×10^6) derived from a MMTVneu spontaneous tumor as described in Material and Methods were injected into the fourth mammary fat pad of WT FVB (gray diamonds) or MMTVneu F1 (white diamonds) female mice and tumor diameters were measured twice a week. Data represent the mean \pm SD of the calculated tumor volume for five individual mice. (B) Sera from tumor bearing mice were used to stain NEU15 cell line. Bound antibodies were detected using PE-conjugated anti-mouse Ig antibody and MFI values were acquired by flow cytometry. Concentrations of anti-Neu antibodies in sera from MMTVneu mice bearing a spontaneous tumor (black dots) or NEU15WT (gray dots) or NEU15F1 (white dots) tumor bearing mice were calculated using a standard curve constructed with anti-Neu monoclonal antibody. Each symbol represents a single sample (MMTVneu spontaneous $n=10$, NEU15WT $n=10$, NEU15F1 $n=8$). Mean values are represented by horizontal lines in each series. **, $p < 0.01$. (C) Immunohistochemical staining on paraffin embedded section of MMTVneu spontaneous, NEU15WT and NEU15F1 tumors using anti-HER2/Neu antibody showing conserved HER2/Neu expression in all hosts. Magnification X200.

pDC 38. GR1 staining was also heterogeneous within this population whereas all TApDC expressed Ly6C Ab. Interestingly, if some scarce CD11b⁻/B220⁻ DC could sometimes be found in the CD11c⁺ infiltrate, CD8α⁺ DC were never detected.

The CD11b⁺/B220⁻ TAmDC represented 85 ± 10 % of all CD11c⁺ TADC. TAmDC highly expressed MHC classe II molecules demonstrating their DC identity and as expected did not express BST2 (also known as PDCA1, a pDC-specific antigen) and the lymphoid DC marker CD8α. Additionally, as interstitial myeloid DC, TAmDC appeared negative for the myeloid spleen/lymph-node resident DC marker CD4 (**Figure 1B**). Of note, TAmDC did not express GR1, thus excluding the possibility of highly autofluorescent myeloid derived suppressor cell (MDSC) contamination during the gating procedure. In addition, mDC and MDSC could clearly be distinguished from other CD11b⁺ myeloid cells by their respective expressions of CD11c and GR1 which remained exclusive whereas tumor-associated macrophages expressed none of these two markers (**Figure 1C**). However, TAmDC expressed relatively high levels of F4/80 (data not shown). Although commonly used to identify macrophage populations, this marker is also expressed on some DC of myeloid origin (39,40).

In conclusion, spontaneous mammary tumors were highly infiltrated by myeloid DC that displayed normal interstitial DC makers as well as a consequent number of pDC.

Transplantable HER2/neu-expressing tumors (NEU15) escape immune response in WT FVB mice while preserving HER2/neu expression

As spontaneous tumor models in MMTVneu transgenic mice are difficult to manipulate because of the long and variable latency of tumor appearance, a stable HER-2/neu expressing cell line referred to NEU15 was derived from a spontaneous tumor. We developed an orthotopic tumor implantation model by injection of NEU15 into the fourth mammary fat pad of mice. First, the tumorigenicity of the NEU15 cell line was evaluated in WT FVB female mice or heterozygous MMTVneu F1 female mice. We will further refer to the resulting tumors developed in WT FVB mice and MMTVneu F1 mice as NEU15WT and NEU15F1, respectively.

As previously described for homozygous MMTVneu mice (41), MMTVneu F1 mice tolerated the rat HER2/neu as a self protein, as evidenced by the highly aggressive tumorigenicity of NEU15F1 tumor (**Figure 2A**). As expected, no humoral response was detected in NEU15F1 tumor-bearing mice, thus demonstrating the immunotolerance to the transgene. As a

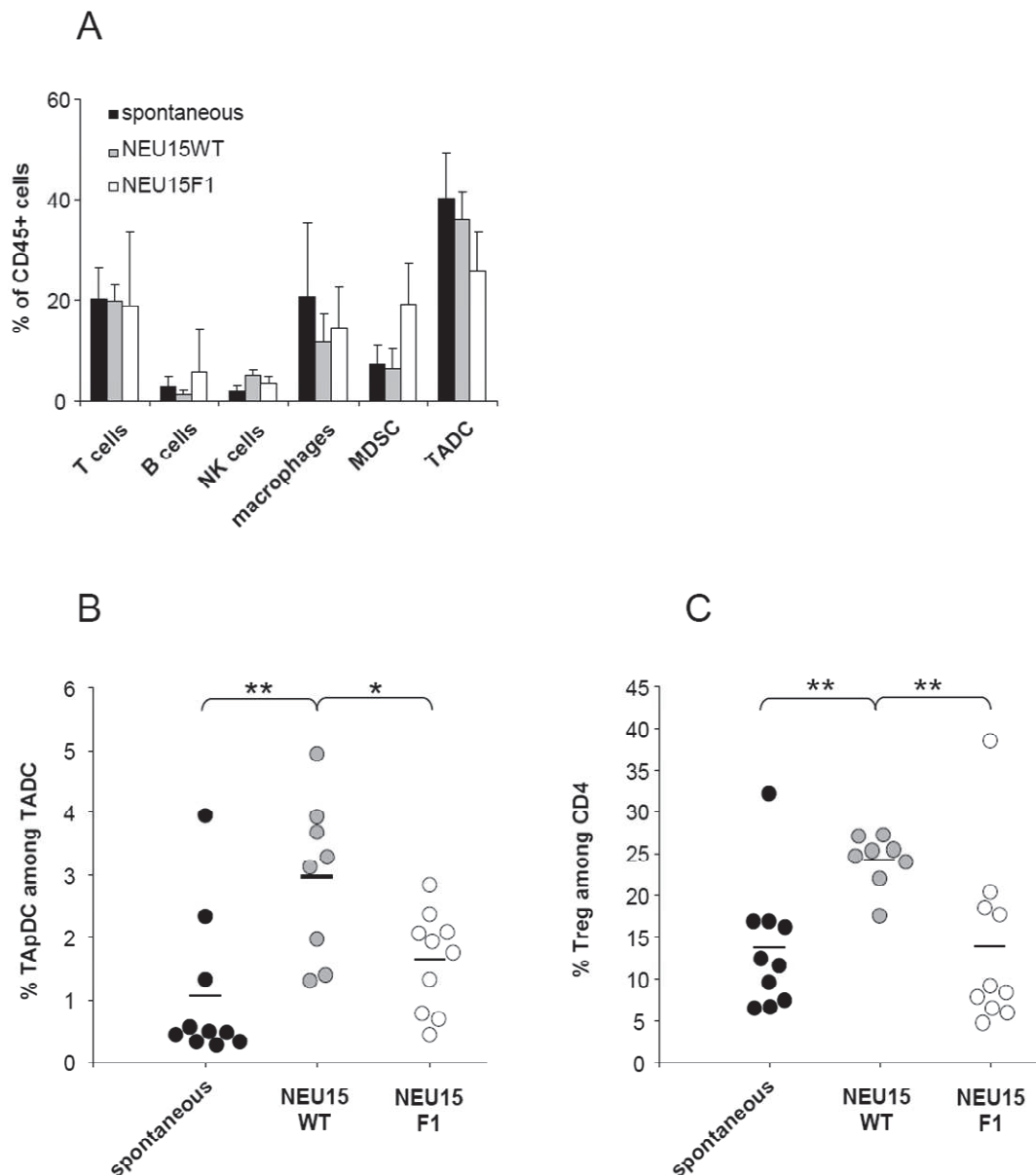


Figure 3: Increased TApDC and regulatory T cell infiltration in NEU15WT tumors escaping immunosurveillance

Single cell suspensions from MMTVneu spontaneous, NEU15WT and NEU15F1 tumors were analysed for immune infiltration by flow cytometry after exclusion of dead cells and doublets. (A) CD45⁺ leucocytes were gated, and percentages of T cells (CD3⁺), B cells (CD19⁺), NK cells (DX5⁺), macrophages (CD11b⁺ GR1⁻ CD11c⁻), MDSC (CD11b⁺ GR1⁺ CD11c⁻) and TADC (CD11c⁺) are shown for MMTVneu spontaneous (black bars) NEU15WT (gray bars) and NEU15F1 (white bars) tumors. Data represent the mean \pm SD of at least eight independent tumors. (B) CD11c⁺ TADC were gated and percentage of TApDC (B220⁺ CD11b⁻) was evaluated in MMTVneu spontaneous (black dots), NEU15WT (gray dots) or NEU15F1 (white dots) tumors (C) CD4⁺ T cells were gated and percentage of regulatory T cells (CD25⁺ CD45RB⁻) was evaluated in MMTVneu spontaneous (black dots), NEU15WT (gray dots) or NEU15F1 (white dots) tumors. (B and C) Each symbol represents a single sample. Mean values are represented by horizontal lines in each series. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$.

consequence, NEU15F1 tumors like spontaneous tumors highly expressed HER2/neu (**Figure 2B and C**).

In contrast, rat HER2/neu protein was perceived as a non-self antigen by the immune system of the WT FVB mice, resulting in delayed of NEU15WT tumor growth (**Figure 2A**) associated with strong anti-HER2/neu specific immune response measured in the sera of NEU15WT tumor-bearing mice ($202.8 \pm 152.8 \mu\text{g/mL}$) (**Figure 2B**). However, this antibody response, mainly of the IgG1 class (data not shown), was not sufficient to induce tumor rejection. Moreover in contrast to other tumor cell lines, the NEU15WT tumor still showed strong HER2/neu expression providing a unique model of immunosubversion (**Figure 2C**). In previous reports (MMC cell line) and as we also observed for other HER2/neu expressing cell lines, such immune responses lead to loss of HER2/neu expression by immunoediting (42,43) and data not shown). The resistance of NEU15WT tumor cells to immunoediting suggests an immunosubversion by the tumor microenvironment and implies that sustained HER2/neu expression is essential for NEU15 tumor cell survival.

NEU15WT tumors represent an immunosubversion model highly infiltrated by pDC and Treg

Immune infiltrates were then characterized in NEU15WT, NEU15F1 and spontaneous tumors. Briefly, T cells, B cells and NK cells were respectively identified by CD3, CD19 and DX5 expression, macrophages and MSC were respectively identified as $\text{CD11b}^+/\text{CD11c}^-/\text{GR1}^-$ and $\text{CD11b}^+/\text{GR1}^+$ cells and DC by CD11c expression (**Figure 1C**). Interestingly, almost all cellular components of the immune system were found in the infiltrate of all tumors (**Figure 3A**). As in human breast cancer, T cells represented about 25% of CD45^+ leucocytes, while B and NK cells represented a minor part of the immune infiltrate. Additionally, in contrast to the preponderant macrophage population and the MDSC infiltration observed in most highly aggressive transplantable mammary tumor models (4T1 and TS/A, data not shown), these cells represented only a minor part of the immune infiltrate.

Interestingly, NEU15WT tumors appeared significantly more infiltrated by CD45^+ immune cells than NEU15F1 tumors ($22,9 \pm 7,3\%$ versus $8,9 \pm 5,3\%$ $p=0.0005$). This was also observed for TADC which remained the most important infiltrating population with respectively $36 \pm 5.4\%$ and $25.8 \pm 7.7\%$ of CD45^+ leucocytes in NEU15WT and NEU15 F1 tumors.

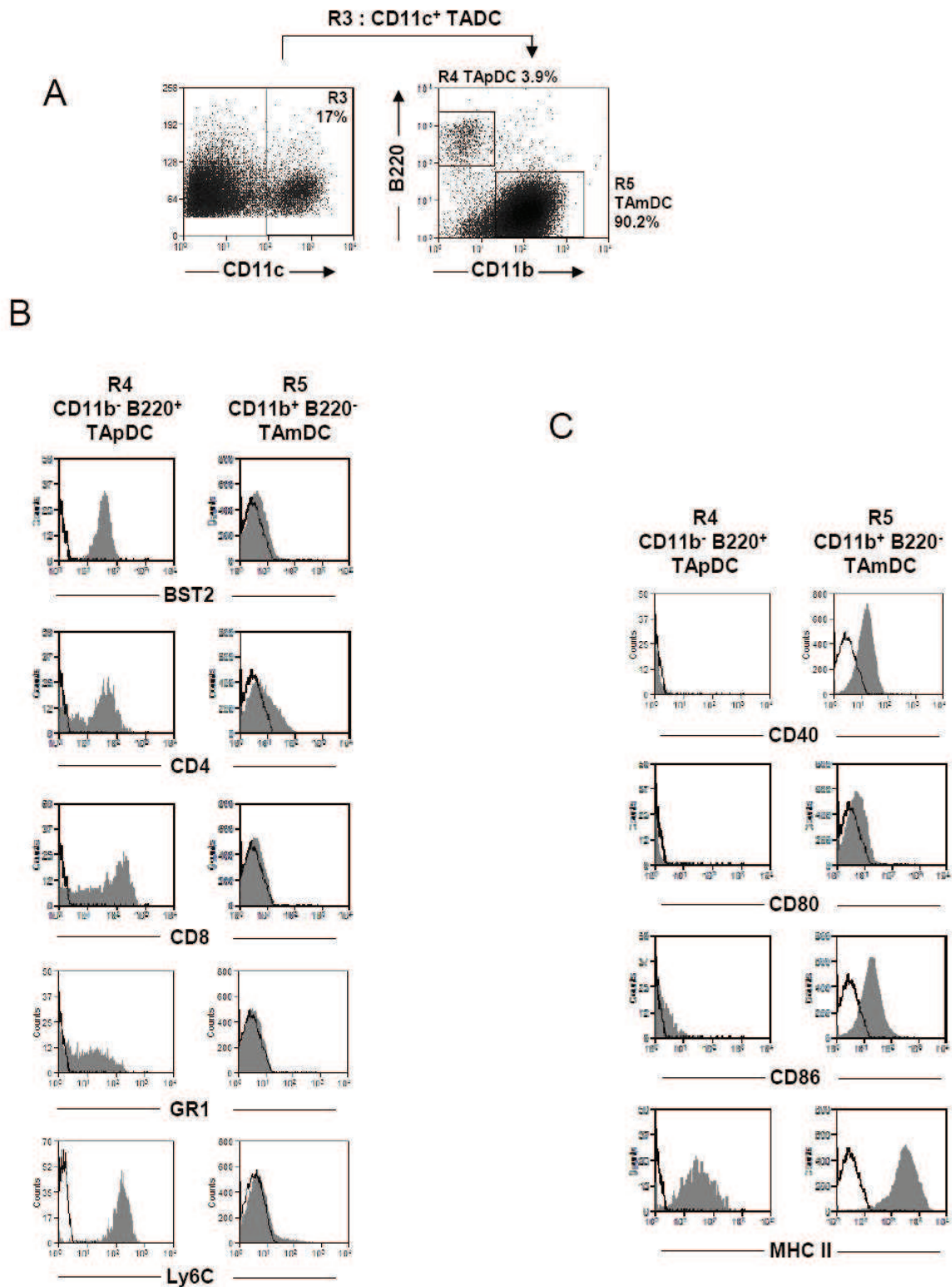


Figure 4: NEU15WT TApDC and TAmDC are immature

TApDC and TAmDC were identified (A) and characterized (B) in single cell suspensions from NEU15WT tumors as in Figure 1. (C) Expression profile of surface costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 and MHC class II molecules on gated TApDC and TAmDC are shown (gray histograms). White histograms indicate the staining background obtained with an isotype-matched control monoclonal antibody.

Regarding TADC infiltration, NEU15WT tumors were significantly more infiltrated by pDC than NEU15F1 tumors ($2.9 \pm 1.3\%$, $1.6 \pm 0.8\%$ respectively, $p=0.04$) and spontaneous tumors ($1 \pm 1.2\%$, $p=0.008$) (**Figure 3B**).

Additionally, when analyzing $CD4^+$ T cell infiltration, we found that NEU15WT tumors were also significantly more infiltrated by $CD25^+/CD45RB^-$ $CD4$ regulatory T cells ($26.7 \pm 6.2\%$) than the two other models (NEU15F1 tumors $13.7 \pm 10.4\%$, $p=0.005$; spontaneous tumors $13.6 \pm 7.7\%$, $p=0.008$) (**Figure 3C**). Indeed, in tumors as in naive spleen, all $CD4^+$ $CD25^+$ T cells were $CD45RB$ negative and expressed the Treg-specific transcription factor FoxP3 (**supplementary Figure 1**).

Taken together these results showed that NEU15WT tumors are an interesting immunosubversion mammary tumor model, as evidenced by tumor evasion from HER-2/neu-specific immune response and increased TApDC and Treg infiltrations as compared to the immunotolerant NEU15F1 and spontaneous models. This suggests that the NEU15WT tumor model closely mimics our observations made in human breast cancer such as the recruitment of pDC and Treg within the tumor possibly favoring tumor escape to immunosurveillance (6,24). For these reasons, we then focused on NEU15WT tumors for TADC functional characterization.

Tumor-associated pDC and mDC are phenotypically and functionally immature

First, an extensive phenotypic analysis of TApDC and TAmDC in NEU15WT tumors revealed that, except for the increased proportion of TApDC, both subsets exhibited exactly the same phenotype for DC-specific markers as spontaneous tumors (**Figures 4A and 4B**).

Then, we further characterized TADC activation status by analyzing the expression of MHC-II and costimulation molecules. TAmDC appeared slightly mature with intermediate $CD40$ and $CD86$ expressions, low $CD80$ expression, but high levels of surface MHC-II molecules (**Figure 4C**). TApDC were immature with no surface expression of $CD80$ and $CD40$, low expression of $CD86$ and intermediate levels of MHC-II (**Figure 4C**). This observation was confirmed in TADC infiltrating spontaneous tumors (data not shown). These phenotypes corresponded to the maturation state of mDC and pDC that were found in naive spleen in steady state (data not shown).

As immature DC are characterized by their high phagocytic ability, we examined *in vivo* the Ag uptake ability of TADC subsets compared to naive spleen counterparts. Green fluorescent beads ($1\mu m$) were injected i.t. in NEU15 WT tumor-bearing mice or i.v. in naive WT FVB mice. Twenty-four hours post injection, tumors and naive spleen were collected, $CD11c^+$

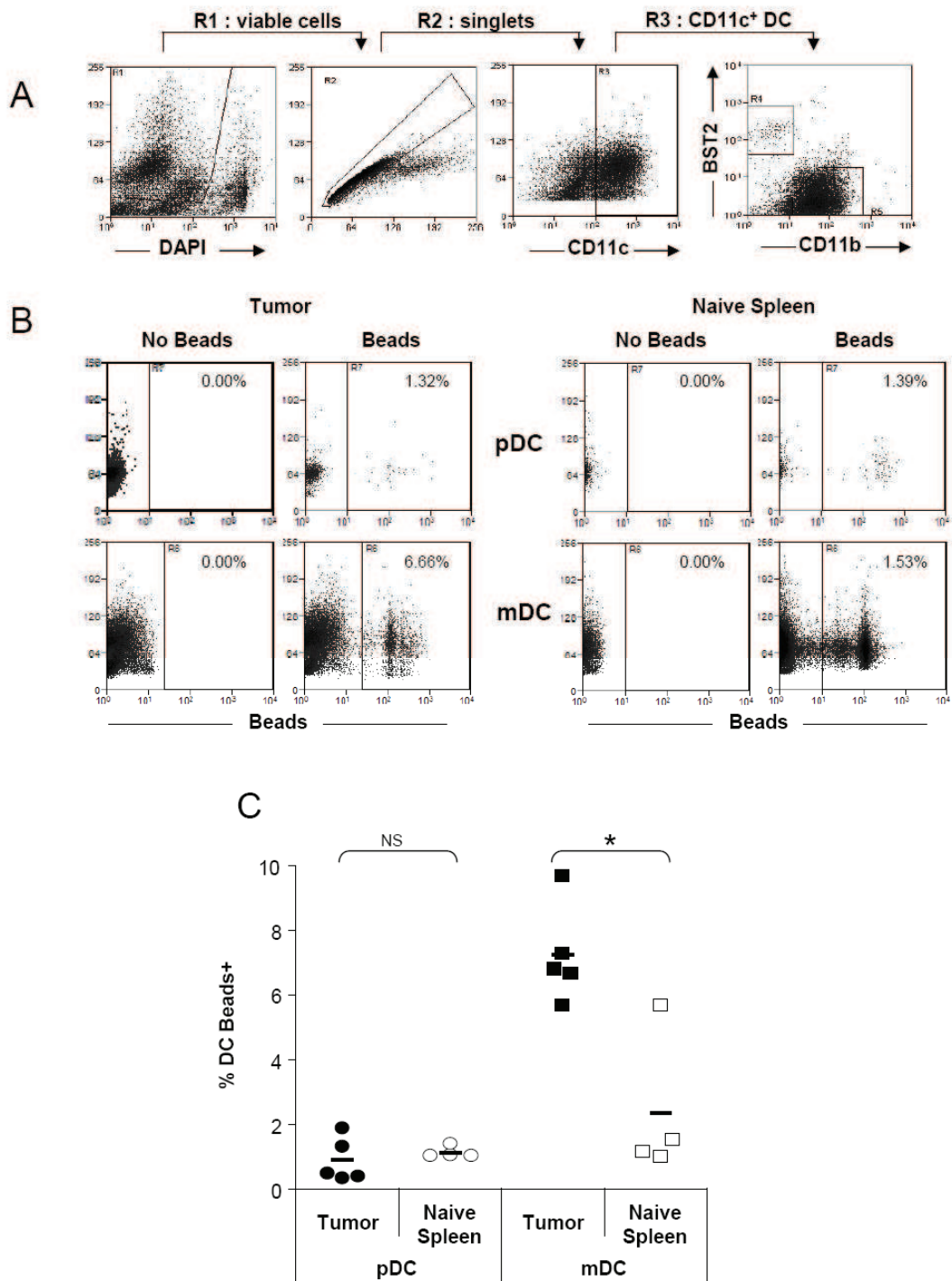


Figure 5: NEU15WT TApDC and TAmDC display unaltered phagocytic ability

Fluorescein loaded microbeads (2×10^8) were injected i.t. in NEU15WT tumor bearing mice or i.v. in naive WT FVB mice respectively. 24 hours later, single cell suspensions from tumors and spleen were enriched by MACS using anti-CD11c microbeads. (A) Gating procedure used for the identification of pDC ($CD11c^+ BST2^+ CD11b^-$) and mDC ($CD11c^+ BST2^- CD11b^+$). (B) Dot plots obtained for each population and organ is shown for a representative experiment and (C) summarized for all sample. Mean values are represented by horizontal lines in each series. *, $p < 0.05$. NS, not significant.

cells were enriched by MACS and phagocytosis was examined in each DC subset by direct fluorescence detection. **Figure 5A** showed the gating procedure used for TApDC and TAmDC, and representative dots plots. Relative to the percentage of bead-positive cells, TApDC appeared as efficient as naive spleen pDC to uptake beads injected i.t or i.v. (respectively $0.9 \pm 0.7\%$ and $1.1 \pm 0.2\%$, $p=0.53$) (**Figures 5B/5C**). In contrast, TAmDC appeared more efficient for phagocytic ability than naive spleen mDC (respectively $7.2 \pm 1.5\%$ and $2.3 \pm 2.2\%$, $p=0.015$). In conclusion, these results showed that the phagocytic ability of DC was not altered in tumors allowing TADC to efficiently uptake tumor Ags.

While TAmDC display spontaneous cytokine production, TApDC have an abrogated TLR9 but preserved TLR7 responses

We then investigated the respective ability of TAmDC and TApDC to secrete cytokines after *in vitro* TLR stimulation. After DC enrichment by MACS using CD11c-positive selection, mDC and pDC (purity>95%) were isolated from tumors and spleen of naive mice by cell sorting on the basis of their respective expression of CD11b and B220 respectively (**Figure 4A**). This gating procedure allowed the recovery of pure pDC (100% BST2⁺)(**Figure 4B**) Purified DC subsets were then cultured *in vitro* for 36 hours with various TLR ligands.

pDC are known to be the most potent type I IFN-producing cells in response to TLR7 or TLR9 ligands (44). Thus, we focused our initial analysis on TApDC IFN α production in response to inactivated influenza virus and CpG-A/ODN-2336 both known for their high efficiency for IFN α induction through TLR7 and TLR9 respectively. Strikingly, IFN α production by TApDC in response to CpG-A was highly inhibited, with 36-fold less IFN α than in naive spleen pDC (log scale, $p=0.0008$) (**Figure 6A**). In contrast, TApDC were nearly as potent as naive spleen pDC to produce IFN α in response to inactivated influenza virus (2-fold less reduction, $p=0.22$). The specific alteration of the TLR9 response was also confirmed with two other TLR9 and TLR7 synthetic ligands. TApDC secreted 9-fold less IFN α than naive spleen pDC in response to CpG-B/ODN-1826 but were fully competent in response to the TLR7 ligand CL075 (**Figure 6A**).

In order to further confirm the specific alteration of the TLR9 responsiveness of pDC, we investigated TApDC production of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12p40, MIP-1 α TNF α , and RANTES) following TLR7 or TLR9 stimulation. No IL-1 β or IL-12p40 were detected in pDC supernatants from naive spleen or tumor origin. For all other cytokines, the production by TApDC was also specifically altered in response to CpG-A and CpG-B

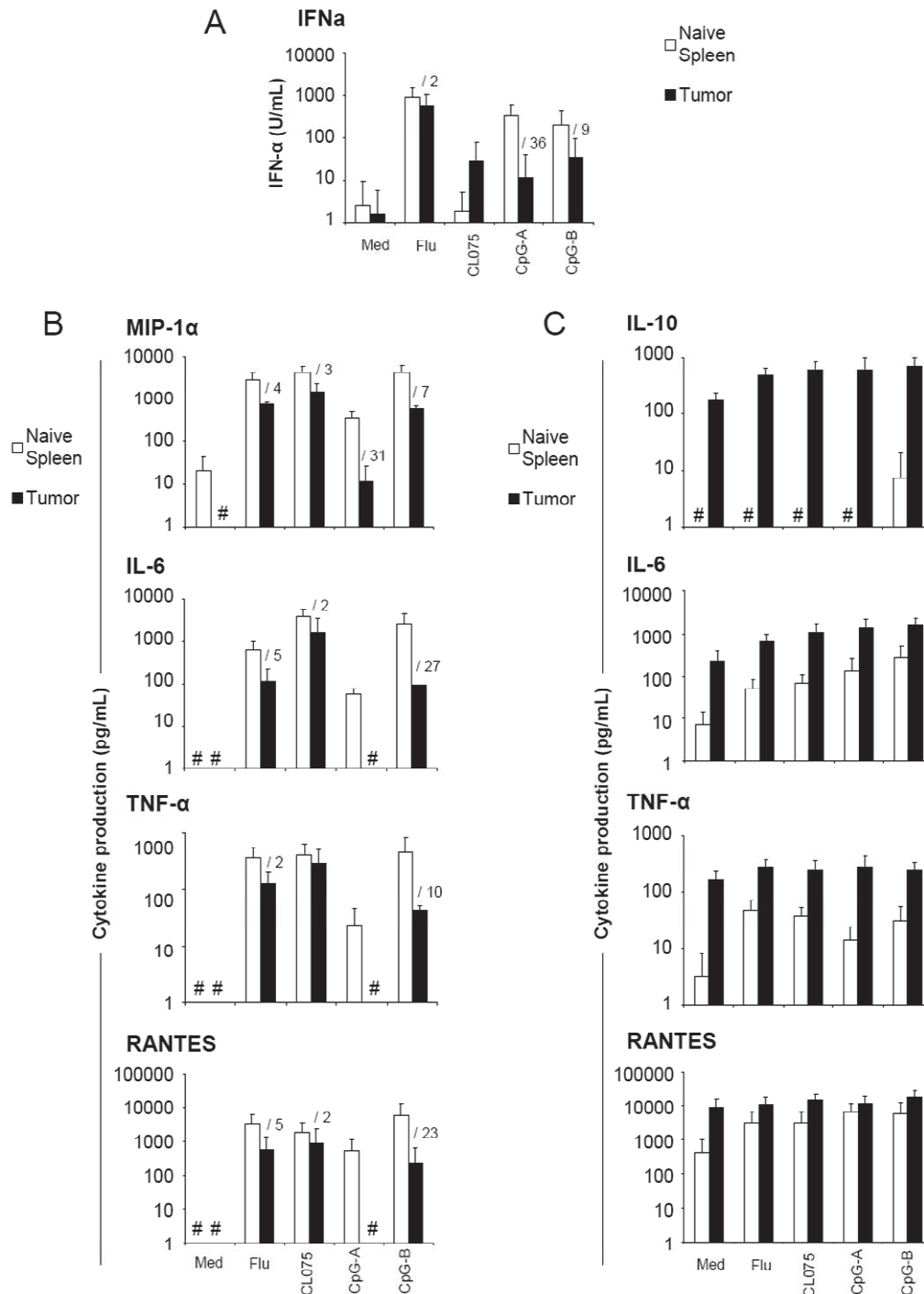


Figure 6: NEU15WT TApDC and TAmDC are differentially altered for TLR response

Highly purified NEU15WT tumor-associated (black bars) and naive WT FVB spleen (white bars) pDC (A and B) and mDC (C) were incubated with the TLR7 ligands inactivated Influenza (Flu) virus (1000 HAU/mL) and CL075 (3 μ g/mL) or the TLR9 ligands CpG-A/ODN 2336 and CpG-B/ODN 1826 (5 μ g/mL). 40 hours later, supernatant were collected and analysed for cytokine and chemokine production by ELISA (A) or LUMINEX (B and C). (A) IFN- α production by tumor-associated and naive spleen pDC. (B) MIP-1 α , IL-6, TNF- α and RANTES production by tumor-associated and naive spleen pDC. (C) IL-10, IL-6, TNF- α and RANTES production by tumor-associated and naive spleen mDC. Data represent the mean \pm SD of cumulated results from at least three independent experiments. /x, fold inhibition between naive spleen and tumor. #, <4pg/mL.

whereas responses to inactivated influenza virus and CL075 remained mostly unchanged (**Figure 6B**). In particular, after TLR9 triggering by CpG-A, we detected no IL-6, TNF α and RANTES production by TApDC whereas naive spleen pDC produced significant amounts of those cytokines and MIP-1 α production by TApDC was reduced by 31-fold. In addition, CpG-B response was reduced by 7 and 10-fold for MIP-1 α and TNF α respectively and by 23 and 27-fold for respectively RANTES and IL-6.

To determine if this selective inhibition of TLR9 ligands was due to TLR9 downregulation, TLR9 and TLR7 mRNA expression were quantified in sorted tumor and naive spleen pDC. Results showed that both TLR were slightly reduced in TApDC compared to naive spleen pDC (**Supplementary Figure 2**). This result thereby ruled out a role of receptor downregulation in the differential alteration of IFN α production upon TLR9 or TLR7 triggering.

In contrast to TApDC, cytokine production by TAmDC was constitutive and occurred independently of TLR stimulation as optimal production was found in medium alone (**Figure 6C**). TAmDC spontaneously secreted large amounts of inflammatory cytokines such as TNF α , IL-6, RANTES but also of anti-inflammatory cytokine IL-10 (**Figure 6C**). Upon TLR activation, naive spleen mDC also produced TNF α , IL-6 and RANTES but they never produced IL-10. However, consistent with results reported by others, we never detected IL-12 production by TAmDC.

This constitutive production of cytokines by TAmDC could be related to their spontaneous maturation. Indeed, both TAmDC and naive spleen mDC upregulated the surface expression of CD80 and CD86 after overnight culture. However, CD80/CD86 expression reached its maximum without TLR stimulation in TAmDC whereas TLR ligands further increased their expression in naive spleen mDC (**Supplementary Figure 3**).

Taken together, these results indicated that TApDC and TAmDC were differentially altered as TApDC were specifically suppressed for response to TLR9 while keeping their ability to respond to TLR7 ligands. In contrast, TAmDC underwent spontaneous maturation accompanied by constitutive cytokine production including high amounts of immunosuppressive IL-10 but no secretion of IL-12.

Both TApDC and TAmDC have lost their capacity to activate naive CD4 T cells

Then, we investigated the ability of TApDC and TAmDC to activate CD4⁺ T cells. Highly purified DC subsets were isolated from tumors and spleens from naïve mice as described

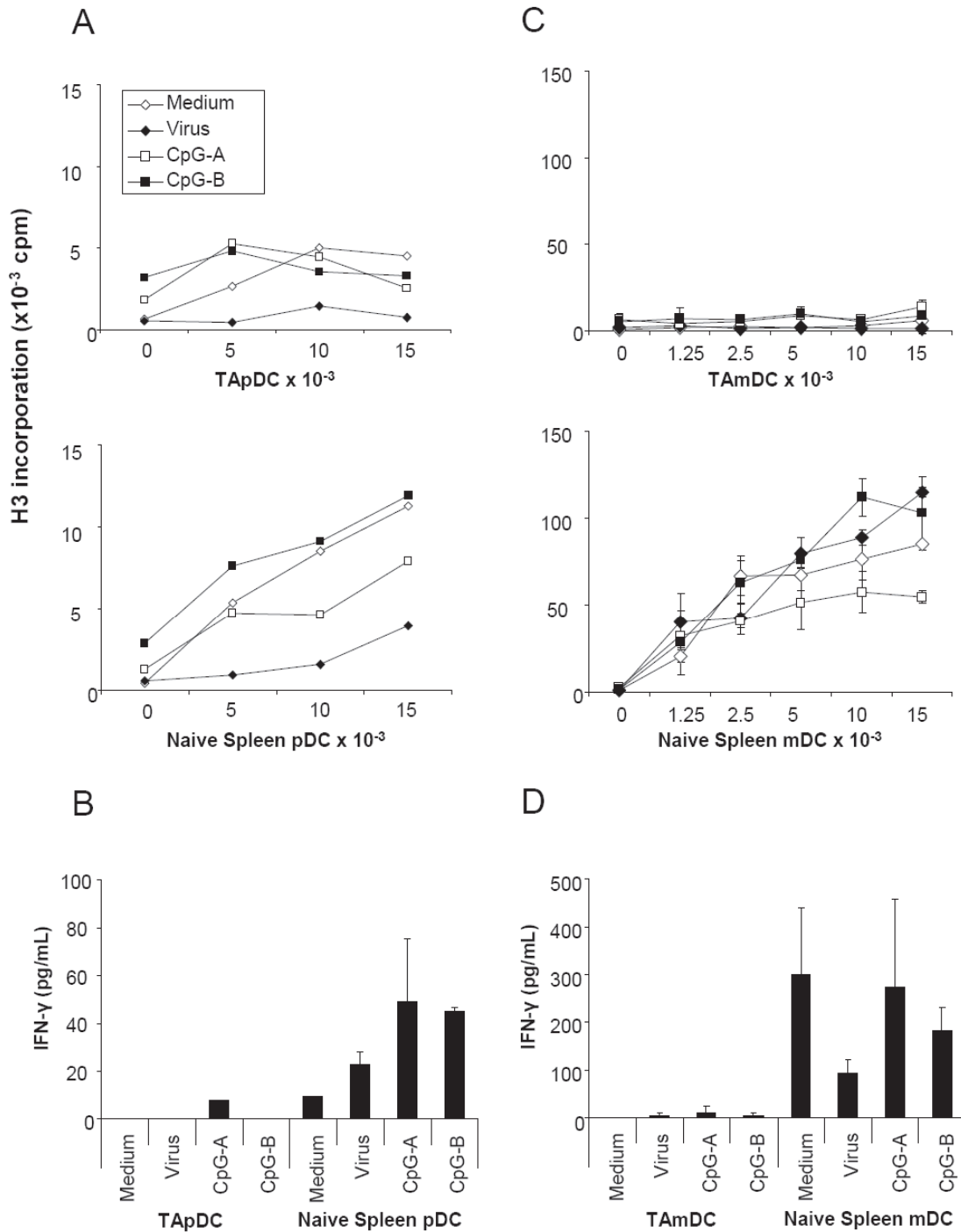


Figure 7: NEU15WT TApDC and TAmDC are blocked for T cell activation

Highly purified NEU15WT tumor-associated (higher panel) and naive WT FVB spleen (lower panel) pDC (A and B) and mDC (C and D) were incubated at graded doses with allogeneic CD4⁺ T cells for 4 days with Flu virus (black diamonds, 1000 HAU/ml), CpG-A (white squares), CpG-B (black squares) (5 μ g/ml) or medium alone (white diamonds). At day 4, half of the medium was collected for IFN- γ detection by ELISA (B and D) and replaced by fresh medium. T cell proliferation was determined by ³H thymidine incorporation between day 4 and day 5 (A and C). Data are expressed as mean \pm SD and are representative of at least three independent experiments.

above and cultured with allogeneic CD4⁺ T cells in the presence or not of TLR7 or TLR9 ligands. In contrast to naive spleen pDC, TApDC lacked the ability to induce CD4⁺ T cell activation. Even at the highest ratio, TApDC indeed failed to induce CD4⁺ T cell proliferation and IFN γ production (**Figures 7A and B**). This failure could not be overcome by TLR triggering.

In addition, TAmDC also failed to induce allogeneic CD4⁺ T cells proliferation and IFN γ production (**Figures 7C and D**).

DISCUSSION

The negative prognostic value of pDC infiltration in human breast tumors prompted us to evaluate TApDC functionality in preclinical models of mammary tumors. Herein we document for the first time that TApDC have lost their responsiveness to TLR9 ligands, while preserving innate immune responses to TLR7 ligands.

First, we focused our analysis on a spontaneous model of mammary tumors arising as a consequence of the overexpression of the rat HER2/neu oncogene in the mammary gland. This model was selected as it shares many features with human HER2-positive breast cancer immunopathology especially regarding immune infiltration. Spontaneous mammary tumors are indeed infiltrated by both plasmacytoid and myeloid DC subsets. Given long latency of spontaneous tumor appearance, we developed a complementary model that was easier to manipulate. We derived several cell lines from spontaneously arising tumors and characterized the resulting tumors transplanted in two different hosts. Most cell lines developed in HER2/neu transgenic hosts reflecting their immunotolerance to the transgene, as confirmed by the absence of anti-HER2/neu antibody production in the serum of tumor-bearing host. In contrast, implantation in wild-type hosts demonstrates an active immunosurveillance, as evidenced by a humoral response against HER2/Neu resulting in tumor rejection in some, but not all, tumor lines. As previously described in this model, several HER2/Neu expressing cell lines undergo an immunoediting on this tumor associated Ag, leading to loss of HER2/neu expression, as a consequence of the strong antibody response when transplanted into wild-type host (42, unpublished data). We also obtained cell lines such as NEU15 which developed in WT hosts through escape from immunosurveillance without immunoediting (thus preserving Neu expression), and thereby provided a relevant preclinical model of immunosubversion.

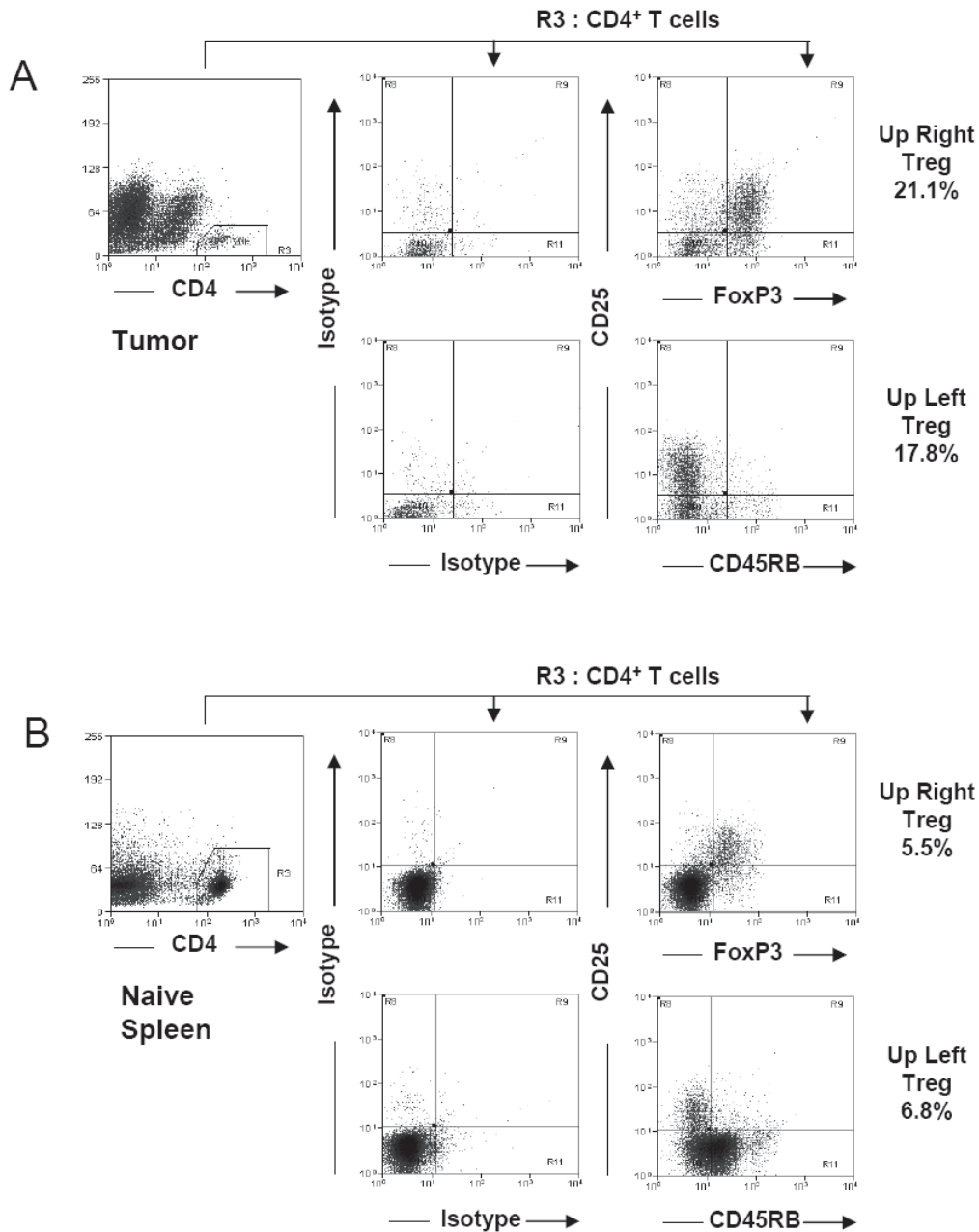


Figure S1: FoxP3 expression among CD4⁺ CD25⁺ T cells correlate with CD45RB negativity

Single cell suspensions from NEU15WT tumors (A) and naive WT FVB spleen (B) were stained with APC conjugated anti-CD4 and PE conjugated anti-CD25 with or without FITC conjugated anti-CD45RB or isotype-matched control monoclonal antibodies. Cells were washed, fixed and permeabilised with FoxP3 Fix/Perm buffer set according to the manufacturer's instructions (BioLegend, San Diego, CA). Intracellular staining was performed in Perm buffer using Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse/rat/human FoxP3 antibody, isotype-matched control monoclonal antibody (BioLegend) or without antibody (cells stained for CD45RB) for 30 min at 4°C. After final washing steps, cells were analyzed by flow cytometry. More than 80% of CD4⁺/CD25⁺/CD45RB⁻ T cells in tumor and spleen are FoxP3⁺.

In this model, we showed that NEU15 WT tumors were more infiltrated by pDC and Treg than tumors grown in immunotolerant transgenic hosts. Thus, the recruitment of pDC and Treg within the tumor might favor tumor escape from immunosurveillance. This hypothesis is consistent with our previous reports on pDC and Treg infiltrations in human breast cancer, both associated with a worse outcome (6,24)

Recently, accumulating evidences have shown a specialized role of pDC in the induction of peripheral tolerance and Treg differentiation (16-22). This occurs through the ability of either mature or immature pDC to induce the deletion of Ag-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells (19), the differentiation of IL-10-producing CD4⁺ or CD8⁺ suppressive T cells (18,22,45-49) or conventional Treg (21,50). In addition, pDC are also known to promote the expansion or activation of mature pre-existing Treg (51-53).

As NEU15WT tumors represent a preclinical model of immunosubversion, infiltrated by both pDC and Treg, we focused our following analyses on this model.

Several aspects of DC functionality were assessed for both pDC and mDC infiltrating NEU15WT tumors. We demonstrated that TApDC and TAmDC are differentially altered within the tumor microenvironment. First, both TADC subsets are immature *in situ* and conserve their ability to internalize particles, which is a feature of immature DC. However, both TADC subsets lack the ability to activate allogeneic CD4⁺ T cells.

TAmDC undergo spontaneous maturation in culture upon tumor isolation and acquire level of costimulatory molecules comparable to activated spleen mDC, suggesting that the lack of costimulation does not explain the absence of T cell stimulation. Moreover, TAmDC secrete constitutively high amounts of cytokines including anti-inflammatory IL-10 but no IL-12. This high level of IL-10 might contribute to the inhibition of CD4⁺ T cell proliferation. In accordance with this hypothesis we have previously described that IL-10 signalling contributes to TADC functional inhibition (54).

In contrast with TAmDC, TApDC were specifically altered in their response to TLR9 ligands while response to TLR7 ligands was preserved. This striking dichotomy between TLR7 and TLR9 responses is consistent with our finding that the human breast tumor environment selectively alters the responsiveness of pDC to TLR9 without affecting response to synthetic TLR7 ligands (Sisirak et al, submitted for publication).

A specific alteration of TLR9 response has also been reported in other systems. Human papilloma virus (HPV)-16 envelope proteins E6 and E7 downregulate TLR9 expression and response in normal keratinocytes and cervical tumor cells without affecting TLR3, 5, 8 functions (55). In head and neck squamous cell carcinoma, TLR9 expression and response by

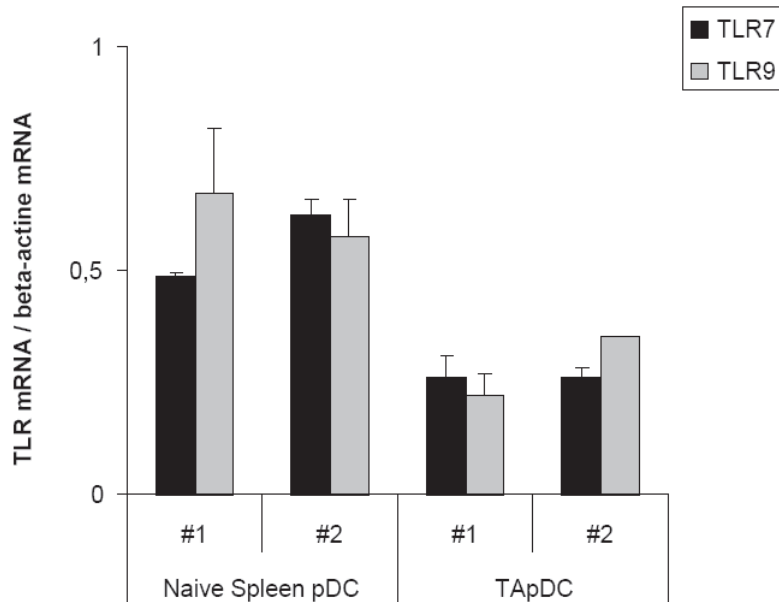


Figure S2: NEU15WT TApDC display unaltered TLR7 and TLR9 expression

Total RNA from highly purified NEU15WT tumor-associated and naive WT FVB spleen pDC was isolated using RNeasy Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). cDNA was synthesized with the SuperScript III (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) reverse transcriptase synthesis kit. Quantitative real time PCR was performed on a Thermocycler (Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System) using the Mesagreen qPCR Master Mix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec, Angers, France). The amplification specificity was assessed for each sample by melting curve analysis. Relative quantification was performed using standard curve analysis. All gene expression data were normalized with b-actin expression data. Data are shown for 2 independent experiment as the mean of relative expression \pm SD from duplicate values. The following primers were used: Actin (forward) 5'-TTGAACATGGCATTGTTACCAA-3', (reverse) 5'-TGGCATAGAGGTCTTTACGGA-3', TLR7 (forward) 5'-CCACAGGCTCACCCATACTTC-3', (reverse) 5'-GGGATGTCCTAGGTGGTGACA-3' and TLR9 (forward) 5'-TGGGCCCATTTGTGATGAAC-3', (reverse) 5'-TTGGTCTGCACCTCCAACAGT-3'.

pDC are down regulated by tumor-derived supernatant. TLR7 expression is also reduced but to a lesser extent, and no functional study has been performed (31). This is in contradiction with our finding that the breast tumor environment does not affect TLR7 and TLR9 expressions in both murine mammary tumors and in human pDC (Sisirak et al, submitted for publication). It is therefore more likely that pDC inhibition is due to a specific interference of the microenvironment with TLR9-induced signalling pathways. In accordance, Hepatitis C Virus (HCV) as well as Human Immunodeficiency Virus (HIV) glycoprotein (gp)-120 have been shown to inhibit TLR9 but not TLR7 response in pDC without affecting their expression (56,57).

For viruses, this represents an acquired mechanism to escape TLR recognition by direct inhibition of receptor expression (HPV16) or indirect evasion (HIV, HCV). Tumor-induced TLR9 loss of function might also represent an immunosubversion mechanism, which raises the question of the existence of endogenous ligands for TLR9 but not for TLR7 within the tumor microenvironment. Indeed, self DNA released by apoptotic and/or necrotic cells can trigger pDC activation and IFN α production through TLR9 recognition, as described in psoriasis and systemic lupus erythematosus (58-62)

Tumor environment-derived factors might lead to TLR9 dysfunction. In particular, we have observed that human breast tumor supernatants contain bioactive TGF β and TNF α which act synergistically to inhibit IFN α production by healthy pDC upon TLR9 engagement (Sisirak et al, submitted for publication). In addition, the tumor microenvironment is rich in nucleotides such as ATP, and PGE2 both known to induce through their respective G protein-coupled receptors inhibition of IFN α production by pDC in response to influenza virus and CpG-A but not to CpG-B nor to the synthetic TLR7 ligand R848 (61,63-65).

CpG ODN are potent vaccine adjuvants that promote the development of a Th1 response and Ag-specific CTL, both of which are critical for an efficient anti-tumor response (66). Indeed intratumoral injection of CpG oligonucleotides has been shown to exert antitumor effects in various experimental tumor models (67-72). This therapeutic effect involves CD8⁺ T cells and NK cells and the recruitment of pDC, mDC and macrophages within the tumor or in the draining lymph nodes. Furthermore, in another model, IFN α has been shown to be responsible for the CpG-induced inhibition of metastasis, probably through the activation of innate and adaptive effector cells (73).

Based on these promising results, ongoing phase I/II clinical trials are currently evaluating the therapeutic potential of TLR9 agonists used as monotherapy, in combined therapy or in

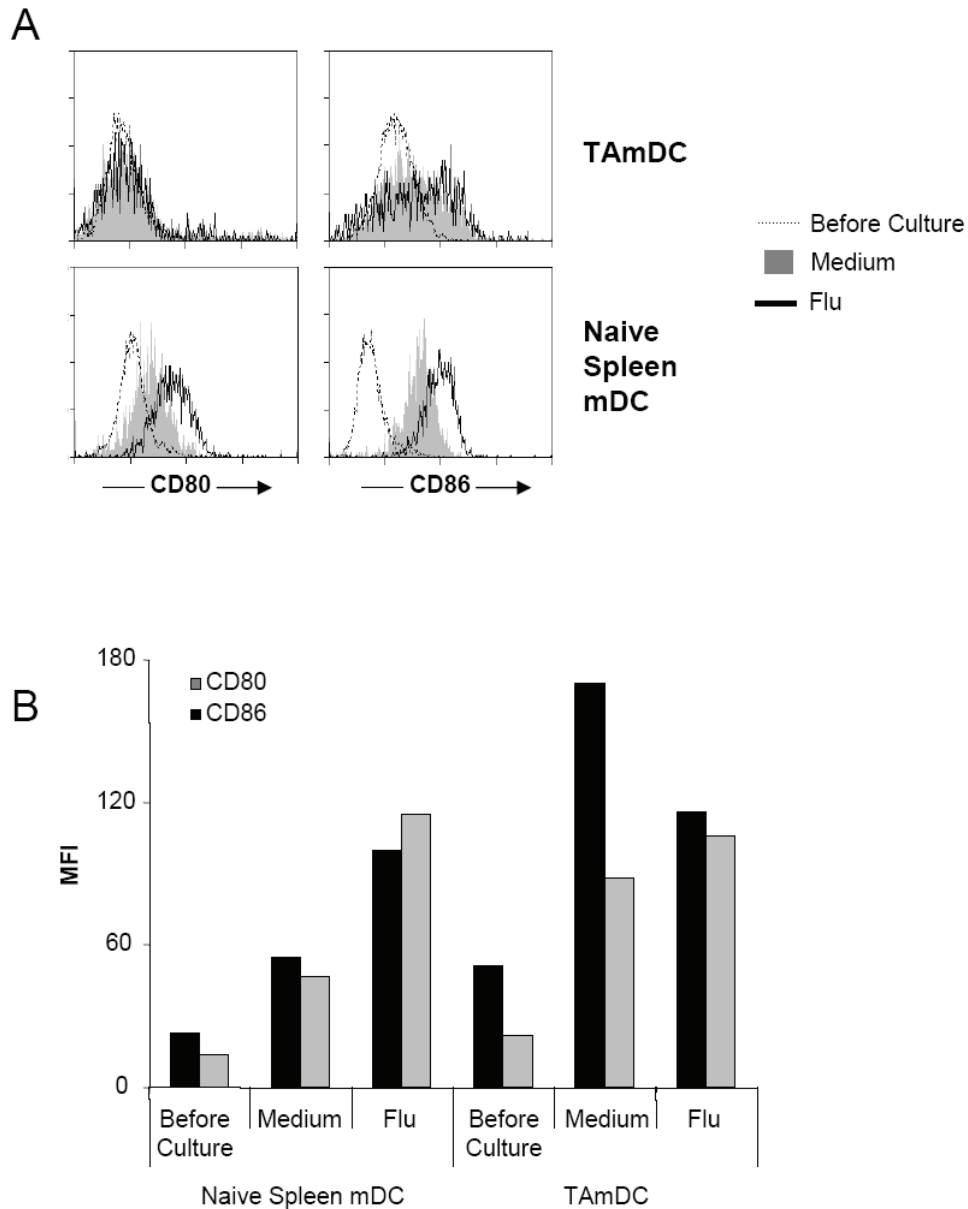


Figure S3: NEU15 WT TAmDC underwent spontaneous maturation

(A) Highly purified NEU15WT tumor-associated and naive WT FVB spleen mDC were assessed for CD80 and CD86 costimulatory molecule expression either immediately after isolation (dotted histograms) or after culture in complete medium with (black lines) or without (gray histograms) influenza virus (Flu) (1000 HAU/ml). (B) MFI values.

vaccine adjuvants for the treatment of cancer (74). However, the true efficiency of TLR9 agonists for treating human cancer remains to be determined. Indeed, mice and humans have different TLR9 expression patterns. In mice both mDC and pDC express TLR9, whereas in humans only B cells and pDC have been identified as being capable of sensing CpG motifs through TLR9 (75-77). Our observation that TApDC are unresponsive to CpG challenges the therapeutic potential of TLR9 agonists in human breast tumors where pDC constitute the only TLR9-expressing DC population.

Appropriate activation of pDC will be critical for effective antitumor immunotherapy. In this context, the use of TLR7 ligands might represent a promising alternative since TLR7 agonists have shown potent therapeutic activity in squamous cell carcinoma and melanoma (26,34,35). Alternatively, the identification of the mechanisms leading to the TLR9 unresponsiveness might allow restoring TApDC function.

Acknowledgments

We thank Sophie Goddard-Léon for technical support and Dominique Reynaud for critical reading of the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Wild-type FVB/N (WT FVB) and C57Bl/6 female mice were obtained at 6-8 weeks of age from Charles River Laboratory (L'Arbresle, France).

The transgenic mice FVB/N-MMTVneu-202Mul (MMTVneu) (37) harbor unactivated rat neu transgene under the regulation of the MMTV promoter. MMTVneu were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). MMTVneu F1 heterozygous females resulted from the breeding of MMTVneu homozygous males with WT FVB females were used at 6-8 weeks of age for tumor transplantation experiments. All animals were handled in the animal housing facility of the Centre Léon Bérard and experimental animal procedures were submitted of an institutional animal care committee: the Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale.

Tumor Cell line

The NEU15 cell line was established from a spontaneous tumor harvested from a MMTVneu transgenic female mouse. The tumor was disrupted by enzymatic digestion using type IA collagenase and DNase, followed by partial trypsinization to remove loosely adherent fibroblasts during the first passages in culture. NEU15 cells were grown *in vitro* at 37°C with 5% CO₂ in DMEM (Gibco, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% heat inactivated foetal calf serum (Lonza, Belgium), 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

Murine tumor models

WT FVB or MMTVneu F1 mice were injected with 5×10^6 NEU15 cells into the fourth mammary fat pad. Animals were inspected twice a week for tumor growth. The two largest perpendicular tumor diameters a and b ($a > b$) were measured using a Vernier calipers. Tumor volume was calculated using the formula for an ellipsoid volume: $V = \pi/6 \times ab^2$. Tumor growth is presented as the mean volume \pm SD. Tumor-bearing mice were euthanized before the largest tumor diameter reached 17 mm.

Immunohistochemistry analysis

Tumor tissue was processed following standard methods and either stained with hematoxylin and eosin or subjected to immunohistochemistry with antibodies to human HER2/neu which cross-react with rat Neu and not with mouse Neu (rabbit polyclonal anti-cErbB2: ref. A0485 from Dako, Trappes, France). Briefly, tissue was fixed in 10% neutral buffered formalin for a minimum of 24H, embedded in paraffin and sectioned at $4\mu\text{m}$ thickness. Following deparaffinization, rehydration and antigenic retrieval at pH6 in an autostainer (Envision Flex Target Retrieval solution low pH in automate PT link from DAKO), HER2/neu staining was performed using the rabbit polyclonal anti-cErbB2 antibody (diluted at 1/700) and biotinylated secondary antibody bound to streptavidine peroxidase conjugate (Kit from Dako ref. K8002) and revealed with 3,3'-diaminobenzidine as substrate and counterstained with hematoxyline.

Enzymatic digestion of tumor tissue

Resected tumors were cut into small pieces and incubated with type IA collagenase (1mg/mL) and DNase (0.1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) for 45 min at 37°C under constant stirring. After enzymatic digestion, the suspension was passed through a $70\mu\text{m}$ nylon cell stainer (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) in order to remove cell clumps. Erythrocytes were lysed with Pharmlyse Buffer (BD Biosciences) 5 min at room temperature and the cell suspension was washed in PBS and filtered again before staining.

Antibodies and Flow cytometry analysis

To characterize immune cells infiltrating the tumors, the following combinations of fluorochrome-conjugated antibodies (Ab) were used: CD45-APC/CD3-PE/CD4-PerCpCy5.5/CD8 α -FITC (T cells subsets), CD4-PE-Cy5/CD25-PE/CD45RB-FITC or CD4-PE-Cy5/CD25-PE, FoxP3-FITC (Treg), CD45-APC/CD19-PE/DX5-FITC (B cells and NK cells), CD11c-APC/CD11b-PE/GR1-FITC (myeloid cells) and CD11c-APC/B220-PerCpCy5.5/CD11b-FITC and either PE-conjugated CD4, CD8 α , CD80, CD86, CD40, MHC II, GR1, BST2 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) or DEC205 (Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canada) (DC subsets). All Ab were purchased from BD Biosciences unless otherwise specified. Briefly, cells were incubated for 15 min at 4°C with anti-CD16/CD32 (Fc Block), then appropriate dilutions of Ab or matched isotype controls were added for 20 additional min before washing. DAPI ($2\mu\text{g/mL}$) was added extemporaneously and 4 to 5 color fluorescence data were acquired with a CyAn ADP Flow cytometer and the Summit software (DAKO, Trappes, France). All analyses were done by gating first on viable DAPI-negative cells, then doublets were excluded by Forward scatter height and Forward scatter area gating (FSC-H/FSC-A).

Detection of anti-neu Ig in serum of tumor-bearing mice

Sera from MMTVneu mice bearing spontaneous mammary tumors or from WT FVB mice and MMTVneu F1 mice bearing NEU15 tumors implanted 30 days before in the mammary fat pad, were collected to determine Neu-specific Ig titers by standard indirect

immunofluorescence. NEU15 cells were stained by serial dilutions of serum for 30 min at 4°C. Cells were washed and stained by 30 min incubation at 4°C with goat anti-mouse Ig-PE (DAKO) used at 1:100 dilution to detect bound Ig. Cells were washed and mean PE fluorescence intensity (MFI) was measured using a FACScan flow cytometer and CellQuest Pro software (BD Biosciences). The concentration of Neu-specific Ig in sera was calculated using a standard curve generated with Ab-4 anti-Neu monoclonal antibody (Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

***In vivo* endocytosis assay**

2×10^8 fluorescein-loaded polystyrene microbeads 1 μ m in diameter (Polysciences Inc, Warrington, PA) were injected by i.t. or i.v. route in NEU15 tumor-bearing or naive WT FVB mice respectively. After 24 hours, tumors or spleens were removed and digested in CollagenaseI/DNase as described above. TADCs or spleen DCs were enriched by magnetic sorting using anti-CD11c-coated microbeads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Enriched DCs were then stained with APC-conjugated anti-CD11c, PerCpC5.5-conjugated anti-CD11b and PE-conjugated anti-BST2 as described above. All staining procedures were done in 2mM EDTA in order to avoid aspecific bead binding. pDC (CD11c⁺/BST2⁺/CD11b⁻) and mDC (CD11c⁺/BST2⁻/CD11b⁺) from tumor and spleen were assessed for yellow-green fluorescence by flow cytometry on a CyAn ADP cytometer. Non-phagocytized beads were excluded from the analysis by FSC-H gating.

Purification of DC subsets

WT FVB mice were injected with 5×10^6 NEU15 cells in the fourth mammary fat pad. When tumors diameter reached 15mm, the mice were euthanized and the tumors were removed, pooled and digested as described above. TADC were enriched by magnetic activated cell sorting (MACS) using anti-CD11c microbeads according to manufactory's instructions (Miltenyi Biotec). Enriched TADC were then stained with anti-CD11c PE-Cy5 (e-Bioscience, San Diego, USA), anti-CD45R/B220 PE and anti-CD11b FITC. pDC and mDC respectively identified as CD11c⁺/B220⁺/CD11b⁻ and CD11c⁺/B220⁻/CD11b⁺ were sorted among viable cells (DAPI-negative populations) on a FACSVantage sorter (BD Biosciences). Splenic pDC and mDC were purified from naive mice using the same procedure as applied for TADC. Purity was routinely above 98%.

For all following experiments, sorted pDC and mDC were cultured in round-bottom 96-well plates in complete RPMI medium (cRPMI) consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin/streptomycin, L-glutamine, non essential amino-acids and 20ng/mL of human recombinant Flt3-ligand to improve viability (PeproTech, Rocky Hill, USA).

Cytokine secretion assays

FACS-sorted splenic or TApDC and TAmDC were cultured at 0.25×10^6 cells/mL and 0.5×10^6 cells/mL, respectively, with various TLR7 and TLR9 ligands. TLR7 ligands were formaldehyde-inactivated influenza virus (A/Wisconsin/67/05) (gift from Sanofi Pasteur) (1000 HAU/mL) and CL075 (3M002) (3 μ g/mL, Cayla - InvivoGen Europe, Toulouse, France). TLR9 ligands were CpG-A/ODN-2336 and CpG-B/ODN-1826 (5 μ g/mL, Coley Pharmaceuticals GmbH, Düsseldorf, Germany). Supernatants were collected after 40h and assessed for cytokines productions. RANTES was measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D systems Inc, Minneapolis, USA). IFN α was measured by a home-made ELISA consisting of rat monoclonal anti-mIFN α capture Ab (RMMA-1), rabbit polyclonal anti-mIFN α detection Ab (both from PBL interferonsource, Piscataway, USA), peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit-IgG (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd,

Newmarket, England) and TMB substrate (Interchim, Montluçon, France). IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40, TNF- α and MIP-1 α were measured by Luminex multiplex bead cytokine assay (MILLIPLEX Mouse Cytokine / Chemokine kit, Millipore) and data were collected and analyzed using a Bio Plex 100 system and Bio-Plex Manager software (Biorad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France).

Mixed lymphocyte reaction

CD4⁺ T lymphocytes were first enriched from the spleen of C57Bl/6 mice by magnetic beads-negative depletion of GR1 (RB6.8e5), MHC II (M5114), CD11b (M170) and CD8 (2.43) expressing cells using hybridoma supernatants (kindly provided by Dr J. Marvel) and Biomag goat anti-rat IgG beads (Qiagen, Courtaboeuf, France). CD4⁺ T cells were further purified by MACS using anti-CD4 coated microbeads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Purity was routinely above 97%. CD4⁺ T cells (5×10^4 per well) were cultured in triplicate for 5 days with graded doses of FACS-sorted splenic or TApDC and TAmDC using the indicated TLR ligands. At day 4, half of the medium was delicately collected for IFN- γ determination and replaced by fresh cRPMI.

Proliferation of T cells during the following 18 hours was assessed by [3H]-thymidine addition (GE healthcare, Piscataway USA, 0.5 μ Ci per well) before harvesting in a Mach III automatic cell harvester (TomTec, Hamden, CT, USA). [3H] thymidine incorporation was measured as counts per minute (cpm) by liquid scintillation counting (Wallac MicroBeta TriLux 1450; PerkinElmer, Wellesley, USA).

IFN- γ secretion in the primary culture supernatant was assessed by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D systems).

Statistical analysis

Differences between groups were analyzed using the non parametric Wilcoxon test on R software. P values less than 0.05 were considered significant (* p<0.05, ** p<0.01).

REFERENCES

1. Disis, M. L., E. Calenoff, G. McLaughlin, A. E. Murphy, W. Chen, B. Groner, M. Jeschke, N. Lydon, E. McGlynn, R. B. Livingston, and . 1994. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* 54:16-20.
2. Goodell, V., J. Waisman, L. G. Salazar, R. C. de la, J. Link, A. L. Coveler, J. S. Childs, P. A. Fintak, D. M. Higgins, and M. L. Disis. 2008. Level of HER-2/neu protein expression in breast cancer may affect the development of endogenous HER-2/neu-specific immunity. *Mol.Cancer Ther.* 7:449-454.
3. de Visser, K. E., A. Eichten, and L. M. Coussens. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat.Rev.Cancer* 6:24-37.
4. Fricke, I. and D. I. Gabrilovich. 2006. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. *Immunol.Invest* 35:459-483.
5. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat.Rev.Immunol.* 6:715-727.
6. Gobert, M., I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A. C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A.

- Puisieux, C. Caux, J. Y. Blay, and C. Menetrier-Caux. 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.* 69:2000-2009.
7. Bell, D., P. Chomarat, D. Broyles, G. Netto, G. M. Harb, S. Lebecque, J. Valladeau, J. Davoust, K. A. Palucka, and J. Banchereau. 1999. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J.Exp.Med.* 190:1417-1426.
8. Menetrier-Caux, C., C. Bain, M. C. Favrot, A. Duc, and J. Y. Blay. 1999. Renal cell carcinoma induces interleukin 10 and prostaglandin E2 production by monocytes. *Br.J.Cancer* 79:119-130.
9. Thomachot, M. C., N. Bendriss-Vermare, C. Massacrier, C. Biota, I. Treilleux, S. Goddard, C. Caux, T. Bachelot, J. Y. Blay, and C. Menetrier-Caux. 2004. Breast carcinoma cells promote the differentiation of CD34+ progenitors towards 2 different subpopulations of dendritic cells with CD1a(high)CD86(-)Langerin- and CD1a(+)-CD86(+)-Langerin+ phenotypes. *Int.J.Cancer* 110:710-720.
10. Gabrilovich, D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat.Rev.Immunol.* 4:941-952.
11. Kadowaki, N., S. Antonenko, J. Y. Lau, and Y. J. Liu. 2000. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J.Exp.Med.* 192:219-226.
12. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y. J. Liu. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat.Immunol.* 5:1219-1226.
13. Gilliet, M., W. Cao, and Y. J. Liu. 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat.Rev.Immunol.* 8:594-606.
14. Kawai, T., S. Sato, K. J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira. 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat.Immunol.* 5:1061-1068.
15. Fonteneau, J. F., M. Gilliet, M. Larsson, I. Dasilva, C. Munz, Y. J. Liu, and N. Bhardwaj. 2003. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 101:3520-3526.
16. Smit, J. J., B. D. Rudd, and N. W. Lukacs. 2006. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J.Exp.Med.* 203:1153-1159.
17. Wang, H., N. Peters, V. Laza-Stanca, N. Nawroly, S. L. Johnston, and J. Schwarze. 2006. Local CD11c+ MHC class II- precursors generate lung dendritic cells during respiratory viral infection, but are depleted in the process. *J.Immunol.* 177:2536-2542.

18. de Heer, H. J., H. Hammad, T. Soullie, D. Hijdra, N. Vos, M. A. Willart, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J.Exp.Med.* 200:89-98.
19. Goubier, A., B. Dubois, H. Gheit, G. Joubert, F. Villard-Truc, C. Asselin-Paturel, G. Trinchieri, and D. Kaiserlian. 2008. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity.* 29:464-475.
20. Fugier-Vivier, I. J., F. Rezzoug, Y. Huang, A. J. Graul-Layman, C. L. Schanie, H. Xu, P. M. Chilton, and S. T. Ildstad. 2005. Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment. *J.Exp.Med.* 201:373-383.
21. Ochando, J. C., C. Homma, Y. Yang, A. Hidalgo, A. Garin, F. Tacke, V. Angeli, Y. Li, P. Boros, Y. Ding, R. Jessberger, G. Trinchieri, S. A. Lira, G. J. Randolph, and J. S. Bromberg. 2006. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat.Immunol.* 7:652-662.
22. Wei, S., I. Kryczek, L. Zou, B. Daniel, P. Cheng, P. Mottram, T. Curiel, A. Lange, and W. Zou. 2005. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 65:5020-5026.
23. Blanco, P., A. K. Palucka, M. Gill, V. Pascual, and J. Banchereau. 2001. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294:1540-1543.
24. Treilleux, I., J. Y. Blay, N. Bendriss-Vermare, I. Ray-Coquard, T. Bachelot, J. P. Guastalla, A. Bremond, S. Goddard, J. J. Pin, C. Barthelemy-Dubois, and S. Lebecque. 2004. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 10:7466-7474.
25. Munn, D. H., M. D. Sharma, D. Hou, B. Baban, J. R. Lee, S. J. Antonia, J. L. Messina, P. Chandler, P. A. Koni, and A. L. Mellor. 2004. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J.Clin.Invest* 114:280-290.
26. Palamara, F., S. Meindl, M. Holcman, P. Luhrs, G. Stingl, and M. Sibilica. 2004. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J.Immunol.* 173:3051-3061.
27. Salio, M., M. Cella, W. Vermi, F. Facchetti, M. J. Palmowski, C. L. Smith, D. Shepherd, M. Colonna, and V. Cerundolo. 2003. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN- γ -secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur.J.Immunol.* 33:1052-1062.
28. Vermi, W., R. Bonecchi, F. Facchetti, D. Bianchi, S. Sozzani, S. Festa, A. Berenzi, M. Cella, and M. Colonna. 2003. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J.Pathol.* 200:255-268.

29. Bontkes, H. J., J. J. Ruizendaal, D. Kramer, C. J. Meijer, and E. Hooijberg. 2005. Plasmacytoid dendritic cells are present in cervical carcinoma and become activated by human papillomavirus type 16 virus-like particles. *Gynecol.Oncol.* 96:897-901.
30. Perrot, I., D. Blanchard, N. Freymond, S. Isaac, B. Guibert, Y. Pacheco, and S. Lebecque. 2007. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J.Immunol.* 178:2763-2769.
31. Hartmann, E., B. Wollenberg, S. Rothenfusser, M. Wagner, D. Wellisch, B. Mack, T. Giese, O. Gires, S. Endres, and G. Hartmann. 2003. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 63:6478-6487.
32. Zou, W., V. Machelon, A. Coulomb-L'Hermin, J. Borvak, F. Nome, T. Isaeva, S. Wei, R. Krzysiek, I. Durand-Gasselien, A. Gordon, T. Pustilnik, D. T. Curiel, P. Galanaud, F. Capron, D. Emilie, and T. J. Curiel. 2001. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat.Med.* 7:1339-1346.
33. Curiel, T. J., P. Cheng, P. Mottram, X. Alvarez, L. Moons, M. Evdemon-Hogan, S. Wei, L. Zou, I. Kryczek, G. Hoyle, A. Lackner, P. Carmeliet, and W. Zou. 2004. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 64:5535-5538.
34. Sary, G., C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp, and G. Stingl. 2007. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J.Exp.Med.* 204:1441-1451.
35. Urosevic, M., R. Dummer, C. Conrad, M. Beyeler, E. Laine, G. Burg, and M. Gilliet. 2005. Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid predendritic cells following imiquimod treatment. *J.Natl.Cancer Inst.* 97:1143-1153.
36. Matsui, T., J. E. Connolly, M. Michnevitz, D. Chaussabel, C. I. Yu, C. Glaser, S. Tindle, M. Pypaert, H. Freitas, B. Piqueras, J. Banchereau, and A. K. Palucka. 2009. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J.Immunol.* 182:6815-6823.
37. Guy, C. T., M. A. Webster, M. Schaller, T. J. Parsons, R. D. Cardiff, and W. J. Muller. 1992. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:10578-10582.
38. O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, I. Caminschi, J. L. Miller, E. M. Anders, L. Wu, M. H. Lahoud, S. Henri, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch, and K. Shortman. 2002. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J.Exp.Med.* 196:1307-1319.
39. Anjuere, F., P. Martin, I. Ferrero, M. L. Fraga, G. M. Del Hoyo, N. Wright, and C. Ardavin. 1999. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93:590-598.

40. Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, and K. Shortman. 2000. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J.Immunol.* 164:2978-2986.
41. Reilly, R. T., M. B. Gottlieb, A. M. Ercolini, J. P. Machiels, C. E. Kane, F. I. Okoye, W. J. Muller, K. H. Dixon, and E. M. Jaffee. 2000. HER-2/neu is a tumor rejection target in tolerized HER-2/neu transgenic mice. *Cancer Res.* 60:3569-3576.
42. Knutson, K. L., H. Lu, B. Stone, J. M. Reiman, M. D. Behrens, C. M. Prosperi, E. A. Gad, A. Smorlesi, and M. L. Disis. 2006. Immunoediting of cancers may lead to epithelial to mesenchymal transition. *J.Immunol.* 177:1526-1533.
43. Manjili, M. H., H. Arnouk, K. L. Knutson, M. Kmiecik, M. L. Disis, J. R. Subjeck, and A. L. Kazim. 2006. Emergence of immune escape variant of mammary tumors that has distinct proteomic profile and a reduced ability to induce "danger signals". *Breast Cancer Res.Treat.* 96:233-241.
44. Liu, Y. J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu.Rev.Immunol.* 23:275-306.
45. Kuwana, M. 2002. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum.Immunol.* 63:1156-1163.
46. Martin, E., B. O'Sullivan, P. Low, and R. Thomas. 2003. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity.* 18:155-167.
47. Bilsborough, J., T. C. George, A. Norment, and J. L. Viney. 2003. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108:481-492.
48. Ito, T., M. Yang, Y. H. Wang, R. Lande, J. Gregorio, O. A. Perng, X. F. Qin, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J.Exp.Med.* 204:105-115.
49. Gilliet, M. and Y. J. Liu. 2002. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum.Immunol.* 63:1149-1155.
50. Moseman, E. A., X. Liang, A. J. Dawson, A. Panoskaltis-Mortari, A. M. Krieg, Y. J. Liu, B. R. Blazar, and W. Chen. 2004. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.* 173:4433-4442.
51. Kang, H. K., M. Liu, and S. K. Datta. 2007. Low-dose peptide tolerance therapy of lupus generates plasmacytoid dendritic cells that cause expansion of autoantigen-specific regulatory T cells and contraction of inflammatory Th17 cells. *J.Immunol.* 178:7849-7858.
52. Ouabed, A., F. X. Hubert, D. Chabannes, L. Gautreau, M. Heslan, and R. Josien. 2008. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J.Immunol.* 180:5862-5870.

53. Sharma, M. D., B. Baban, P. Chandler, D. Y. Hou, N. Singh, H. Yagita, M. Azuma, B. R. Blazar, A. L. Mellor, and D. H. Munn. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J.Clin.Invest* 117:2570-2582.
54. Vicari, A. P., C. Chiodoni, C. Vaure, S. Ait-Yahia, C. Dercamp, F. Matsos, O. Reynard, C. Taverne, P. Merle, M. P. Colombo, A. O'Garra, G. Trinchieri, and C. Caux. 2002. Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J.Exp.Med.* 196:541-549.
55. Hasan, U. A., E. Bates, F. Takeshita, A. Biliato, R. Accardi, V. Bouvard, M. Mansour, I. Vincent, L. Gissmann, T. Iftner, M. Sideri, F. Stubenrauch, and M. Tommasino. 2007. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J.Immunol.* 178:3186-3197.
56. Gondois-Rey, F., C. Dental, P. Halfon, T. F. Baumert, D. Olive, and I. Hirsch. 2009. Hepatitis C virus is a weak inducer of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells in comparison with influenza and human herpesvirus type-1. *PLoS.One.* 4:e4319.
57. Martinelli, E., C. Cicala, D. Van Ryk, D. J. Goode, K. Macleod, J. Arthos, and A. S. Fauci. 2007. HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104:3396-3401.
58. Barrat, F. J., T. Meeker, J. Gregorio, J. H. Chan, S. Uematsu, S. Akira, B. Chang, O. Duramad, and R. L. Coffman. 2005. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J.Exp.Med.* 202:1131-1139.
59. Lande, R., J. Gregorio, V. Facchinetti, B. Chatterjee, Y. H. Wang, B. Homey, W. Cao, Y. H. Wang, B. Su, F. O. Nestle, T. Zal, I. Mellman, J. M. Schroder, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449:564-569.
60. Vollmer, J., S. Tluk, C. Schmitz, S. Hamm, M. Jurk, A. Forsbach, S. Akira, K. M. Kelly, W. H. Reeves, S. Bauer, and A. M. Krieg. 2005. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J.Exp.Med.* 202:1575-1585.
61. Shin, A., T. Toy, S. Rothenfusser, N. Robson, J. Vorac, M. Dauer, M. Stuplich, S. Endres, J. Cebon, E. Maraskovsky, and M. Schnurr. 2008. P2Y receptor signaling regulates phenotype and IFN- α secretion of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 111:3062-3069.
62. Ganguly, D., G. Chamilos, R. Lande, J. Gregorio, S. Meller, V. Facchinetti, B. Homey, F. J. Barrat, T. Zal, and M. Gilliet. 2009. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J.Exp.Med.* 206:1983-1994.
63. Schnurr, M., T. Toy, A. Shin, G. Hartmann, S. Rothenfusser, J. Soellner, I. D. Davis, J. Cebon, and E. Maraskovsky. 2004. Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 103:1391-1397.

64. Contractor, N., J. Louten, L. Kim, C. A. Biron, and B. L. Kelsall. 2007. Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J.Immunol.* 179:2690-2694.
65. Son, Y., T. Ito, Y. Ozaki, T. Tanijiri, T. Yokoi, K. Nakamura, M. Takebayashi, R. Amakawa, and S. Fukuhara. 2006. Prostaglandin E is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells. *Immunology.*
66. Weeratna, R. D., M. J. McCluskie, Y. Xu, and H. L. Davis. 2000. CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* 18:1755-1762.
67. Bertin, S., F. Anjuere, A. Gavelli, P. Baque, B. K. Soilihi, N. Brossette, A. Loubat, and V. Pierrefite-Carle. 2008. Plasmidic CpG sequences induce tumor microenvironment modifications in a rat liver metastasis model. *Int.J.Mol.Med.* 21:309-315.
68. Carpentier, A. F., L. Chen, F. Maltonti, and J. Y. Delattre. 1999. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res.* 59:5429-5432.
69. Carpentier, A. F., J. Xie, K. Mokhtari, and J. Y. Delattre. 2000. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin.Cancer Res.* 6:2469-2473.
70. Heckelsmiller, K., K. Rall, S. Beck, A. Schlamp, J. Seiderer, B. Jahrsdorfer, A. Krug, S. Rothenfusser, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J.Immunol.* 169:3892-3899.
71. Kawarada, Y., R. Ganss, N. Garbi, T. Sacher, B. Arnold, and G. J. Hammerling. 2001. NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J.Immunol.* 167:5247-5253.
72. Sfondrini, L., D. Besusso, C. Rumio, M. Rodolfo, S. Menard, and A. Balsari. 2002. Prevention of spontaneous mammary adenocarcinoma in HER-2/neu transgenic mice by foreign DNA. *FASEB J.* 16:1749-1754.
73. Hafner, M., R. Zawatzky, C. Hirtreiter, W. A. Buurman, B. Echtenacher, T. Hehlhans, and D. N. Mannel. 2001. Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type I IFN. *Cancer Res* 61:5523-5528.
74. Krieg, A. M. 2008. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene* 27:161-167.
75. Bauer, M., V. Redecke, J. W. Ellwart, B. Scherer, J. P. Kremer, H. Wagner, and G. B. Lipford. 2001. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J.Immunol.* 166:5000-5007.

76. Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J.Immunol.* 168:4531-4537.
77. Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J.Exp.Med.* 194:863-869.

Résultats complémentaires

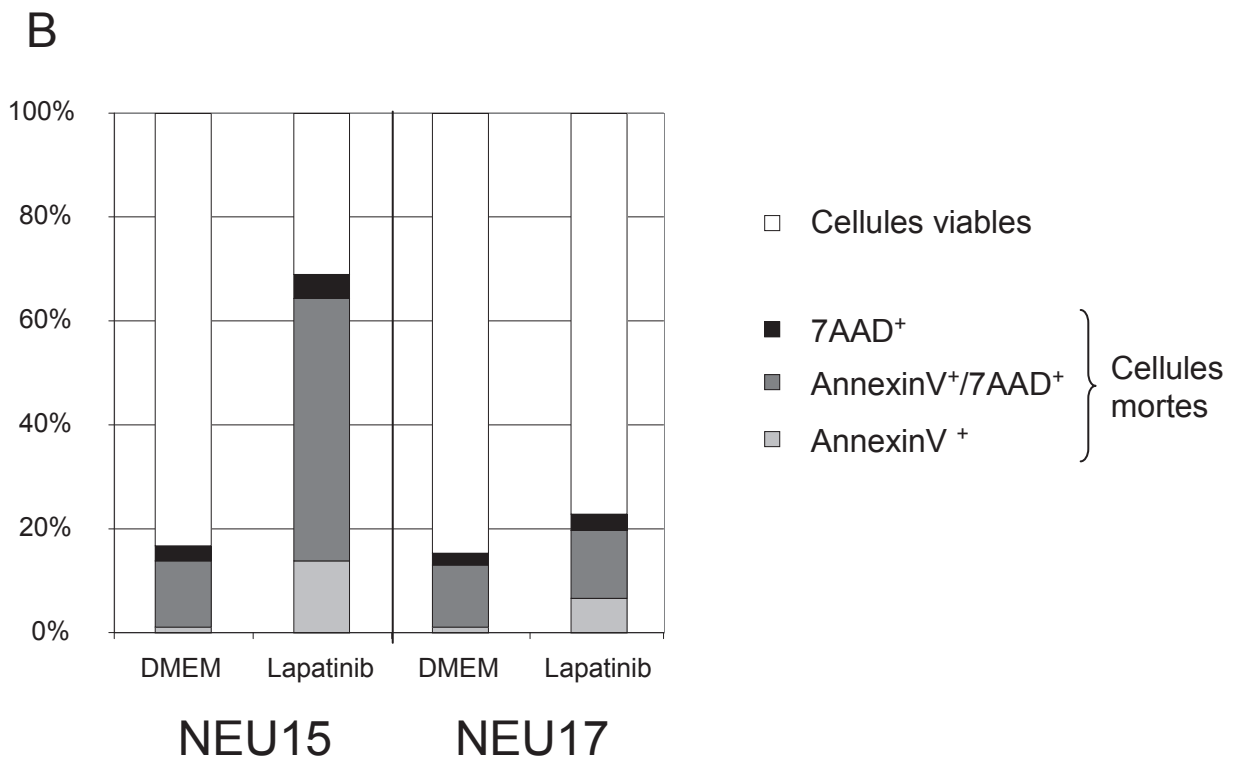
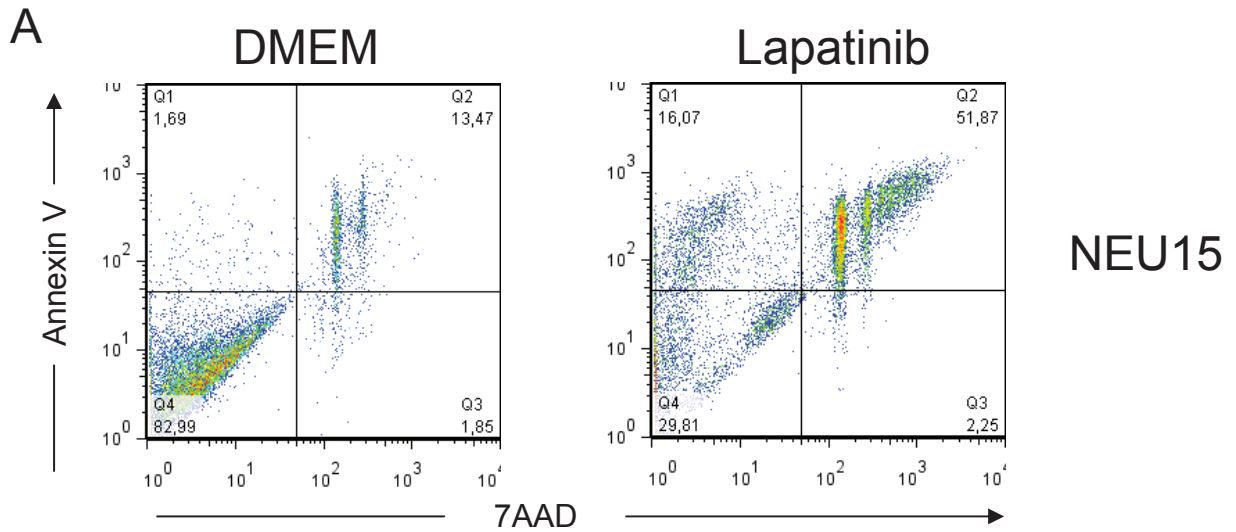


Figure R3 : Apoptose de la lignée NEU15 induite par le Lapatinib

Les cellules NEU15 (A et B) et NEU17 (B) sont cultivées en DMEM 1% SVF en présence ou non de Lapatinib (1 μ M). L'apoptose des cellules est évaluée après 48 heures par cytométrie en flux.

Etude de l'impact de l'infection virale des cellules tumorales sur la capacité des pDC à induire une réponse anti-tumorale et initiation de stratégies thérapeutiques dans un modèle pré-clinique

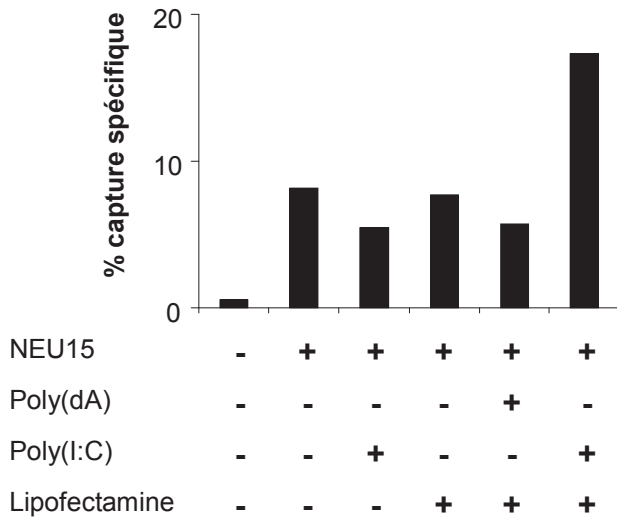
PROBLEMATIQUE

Les pDC sont les principales cellules productrices d'IFN de type I en réponse à un stimulus viral, ce qui leur confère un rôle effecteur clé au sein de l'immunité anti-virale. Bien que la production d'IFN de type I par les pDC augmente la présentation croisée médiée par les cDC, le rôle des pDC dans présentation des antigènes était largement méconnu au début de ma thèse. Notamment, leur capacité à internaliser des antigènes cellulaires et à réaliser la présentation croisée n'avait jamais été démontrée. Contrairement aux DC CD8 α^+ , les pDC ne semblent pas capturer de corps apoptotiques de façon constitutive. De plus, comme pour les DC CD8 α^- , la machinerie de présentation croisée des pDC semble sous le contrôle de l'activation. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'infection virale des cellules tumorales pourrait provoquer d'une part leur reconnaissance et leur capture par les pDC et résulter d'autre part en l'activation de leur capacité à présenter les antigènes tumoraux aux LT CD8 $^+$ spécifiques.

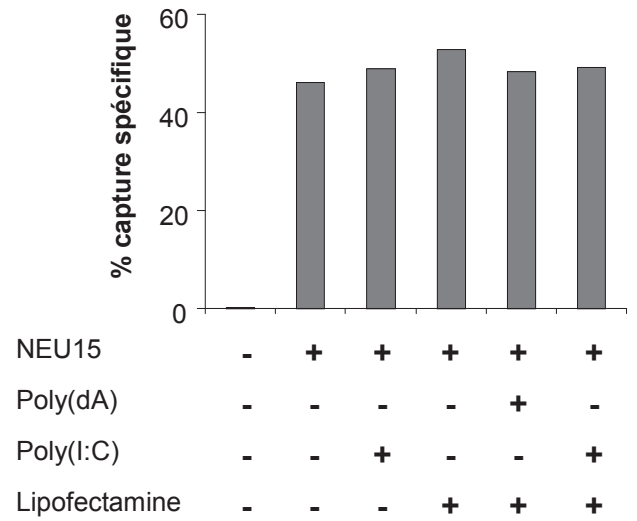
RESULTATS

Jusqu'à récemment, les pDC n'avaient jamais été démontrées capables d'internaliser des antigènes cellulaires. Nous avons émis l'hypothèse que l'infection virale des cellules tumorales pourrait entraîner des modifications cellulaires permettant la reconnaissance et la capture des cellules infectées par les pDC. Avec l'objectif final de vérifier l'efficacité thérapeutique d'une telle stratégie *in vivo*, nous avons utilisé le même modèle tumoral que précédemment (Lignée NEU15). Afin de vérifier notre hypothèse *in vitro*, nous avons choisi de modéliser l'infection virale des cellules tumorales NEU15 par transfection de Poly(I:C), un ARN double brin synthétique ligand du TLR3 et des RLR cytoplasmiques MDA5 et RIG-I. L'utilisation de Lipofectamine permet de délivrer le Poly(I:C) dans le cytoplasme des cellules tumorales et de cibler plus particulièrement les RLR. Le choix de ce modèle est basé sur le

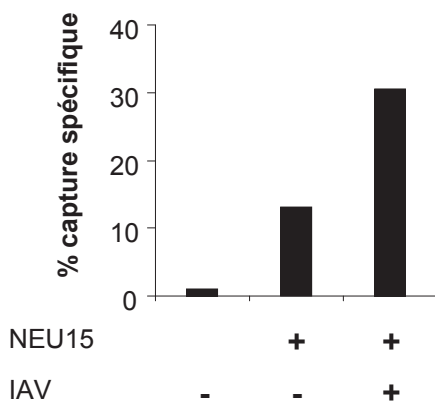
A Effet du signal Poly(I:C) sur la capture par les pDC



B Effet du signal Poly(I:C) sur la capture par les cDC



C Effet du signal viral sur la capture par les pDC



D Effet du signal viral sur la capture par les cDC

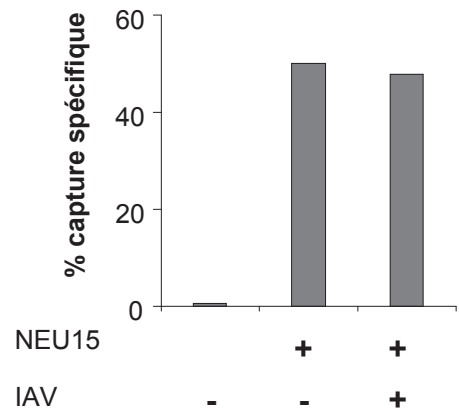


Figure R4 : Capture de matériel tumoral apoptotique par les pDC et les mDC

Les DC CD11c⁺ sont enrichies à partir de rate de souris 129Sv par sélection positive et cultivées à 37°C ou 4°C seules ou avec des cellules NEU15 marquées au CFSE et induites en apoptose par le Lapatinib. L'effet d'un signal viral sur la capacité de capture des pDC et des mDC est étudiée dans deux modèles 1) (A et B) Les cellules NEU15 sont préalablement transfectée par poly(I:C) ou Poly(dA) (contrôle négatif) en présence de Lipofectamine ou incubées en présence de Poly(I:C) seul ou de Lipofectamine seule (contrôles négatifs) et 2) (C et D) Les cellules tumorales sont préalablement infectée ou non par une souche virulente du virus Influenza. Les cellules sont récoltées après une nuit, marquées puis analysées pour l'acquisition de fluorescence verte (CFSE) par les pDC (CD11c⁺ CD11b⁻ B220⁺) (A et C) et les mDC (CD11c⁺ CD11b⁺ B220⁻) (B et D) par cytométrie en flux. La capture spécifique pour chaque population est évaluée par soustraction du pourcentage de cellules CFSE⁺ à 4°C de celui obtenu à 37°C. Une expérience représentative de 4 (pour le modèle 1) est représentée. Le modèle 2 n'a été réalisé qu'une seule fois

fait que les pDC n'expriment pas le TLR3 dissociant ainsi le signal viral donné à la cellule tumorale de l'activation des pDC.

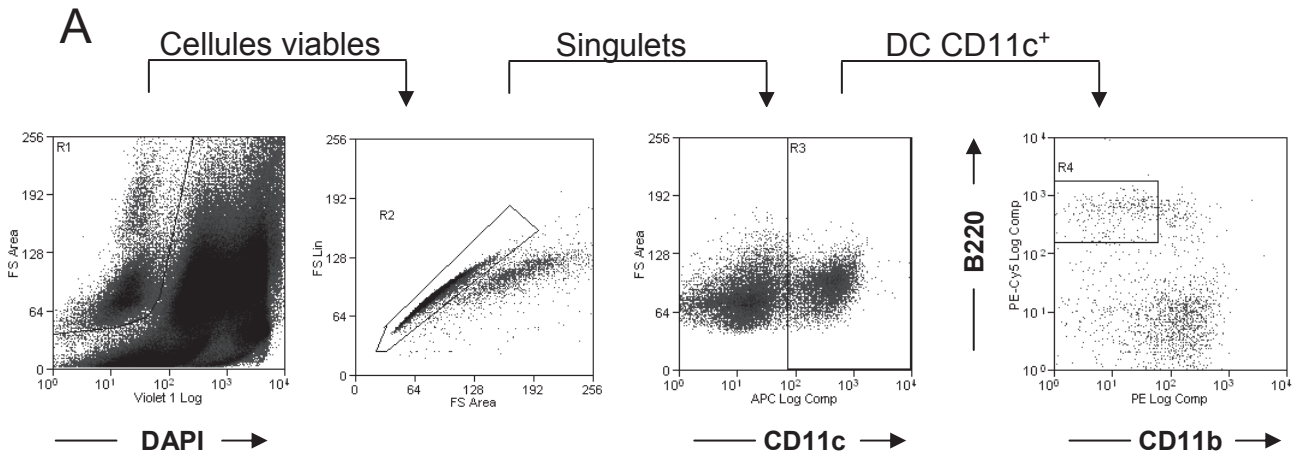
1- Réponse des cellules tumorales au Lapatinib in vitro

La transfection de Poly(I :C) n'ayant pas d'impact sur la viabilité des cellules, elle peut être utilisée en combinaison avec un traitement induisant l'apoptose spécifique des cellules NEU15 tel que le Lapatinib (Tyverb®). Cette molécule cible le domaine tyrosine kinase de l'EGFR et de HER2 et inhibe la transduction du signal conduisant à une diminution de la prolifération cellulaire et à une induction d'apoptose. Le Lapatinib en combinaison avec la capecitabine est actuellement indiqué en deuxième ligne de traitement des cancers du sein avancés ou métastatiques HER2/Neu positifs qui ont progressé sous un traitement standard. De façon intéressante, cette molécule inhibe également la signalisation du récepteur HER2/Neu de rat et résulte en une induction d'apoptose massive des cellules tumorales NEU15 (**Figure R3**). En revanche, d'autres lignées HER2/Neu positives telles que la lignée NEU17 ne sont pas sensibles au Lapatinib en terme de mort cellulaire bien que la prolifération soit ralentie.

2- Capture de corps apoptotiques issus de cellules tumorales infectées par les pDC

Afin de suivre la capture de matériel tumoral par les DC isolées de rate de souris naïves, nous avons marqué les cellules NEU15 au CFSE avant la transfection et l'induction d'apoptose. Nous avons ainsi montré par cytométrie en flux que les pDC normales repérées par leur phénotype CD11c⁺ B220⁺ CD11b⁻ sont capables de capturer du matériel tumoral apoptotique bien que moins efficacement que les mDC CD11c⁺ B220⁻ CD11b⁺ (**Figure R4**). De plus, la présence d'un signal viral donné aux cellules tumorales par transfection de Poly(I :C) augmente considérablement leur reconnaissance et leur capture par les pDC (**Figure R4 A et R5**). Ce signal n'est en revanche pas nécessaire à la reconnaissance et à la capture des corps apoptotiques par les mDC (**Figure R4 B**). Un résultat similaire est obtenu après infection des cellules NEU15 par une souche virulente du virus Influenza (**Figure R4 C et D**).

Cependant, ce résultat n'a pu être reproduit clairement que dans 4 expériences sur 9 expériences indépendantes. Ainsi, l'impact de la transfection des cellules NEU15 par le Poly(I :C) sur la capacité de capture de matériel tumoral apoptotique par les pDC n'apparaît pas significatif (p= 0.13, p=0.17, p=0.07 par rapport au DMEM seul, à la Lipofectamine seule et au Poly(I :C) seul respectivement) (**Figure R6**). La grande variabilité des résultats pourrait provenir de la variabilité des lots de Poly(I :C) ou de l'instabilité du Poly(I :C). De



B + NEU15 apoptotiques + NEU15 apoptotiques
« infectées »

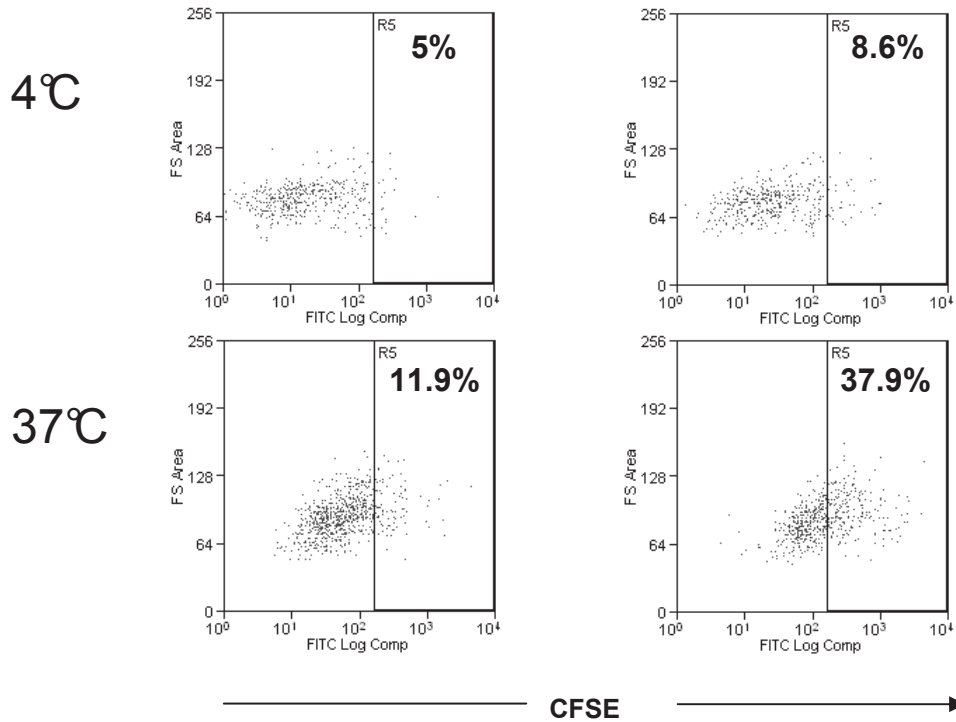


Figure R5 : Capture de matériel tumoral apoptotique par les pDC

Les DC CD11c⁺ enrichies sont cultivées à 37°C ou 4°C avec des cellules NEU15 marquées au CFSE transfectées ou non par Poly(I:C) et induites en apoptose par le Lapatinib. Les cellules sont récoltées après une nuit, marquées puis analysées par cytométrie en flux. **(A)** Procédure d'analyse éliminant les cellules mortes et les doublets et sélection des pDC (CD11c⁺ CD11b⁻ B220⁺) **(B)** acquisition de CFSE par les pDC cultivées à 4°C (panneau supérieur) et 37°C (panneau inférieur) avec des cellules NEU15 apoptotiques transfectées par Poly(I:C) (« infectées », panneau de droite) ou non (panneau de gauche).

plus, aucun contrôle d'efficacité de transfection n'a pu être réalisé car il n'existe pas de Poly(I:C) ou de molécules analogues couplés à un fluorochrome. Des anticorps spécifiques des ARN doubles brins sont cependant commercialisés mais nous n'avons pas réussi à obtenir de marquage convainquant sur les cellules NEU15 transfectées.

La capture de matériel tumoral transfecté par Poly(I:C) par les pDC a cependant été confirmée dans deux expériences indépendantes en microscopie confocale. Des inclusions cytoplasmiques fluorescentes vertes provenant de la fragmentation des cellules tumorales apoptotiques sont retrouvées dans le cytoplasme des pDC repérées par la co-expression des marqueurs CD11c et B220 ou par l'expression de BST2 (**Figure R7**). Le marquage intracellulaire observé pour BST2 résulte probablement de l'internalisation des anticorps spécifiques par les pDC durant la période d'adhérence réalisée à 37°C. En effet, la faible adhérence des DC spléniques nous a amené à marquer et laver les cellules avant de les déposer sur les lamelles recouvertes de polylysine.

3- Mise en place d'outils pour suivre la présentation croisée des antigènes tumoraux par les pDC

Afin de suivre la présentation croisée des antigènes tumoraux par les pDC suite à la capture de matériel tumoral apoptotique préalablement infecté, nous avons introduit dans la lignée NEU15 l'épitope classe I modèle NP₃₆₆₋₃₇₄ fusionné à la GFP par infection lentivirale. Cet épitope présenté de façon H-2D^b restreinte est reconnu spécifiquement par les cellules T CD8⁺ issus des souris transgéniques Rag^{-/-} F5 (H-2^b). La construction du vecteur lentiviral et l'infection de la lignée NEU15 ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration par l'équipe du Dr Jacqueline Marvel (INSERM U503). La présentation directe de l'épitope par les DC dérivées de cultures de moelle osseuse (BM-DC) infectées a été validée par cette équipe. Après infection, les cellules NEU15 ont été purifiées selon l'expression de la GFP directement corrélée à celle de l'épitope (lignée NEU15-NP/GFP). De façon importante, les cellules NEU15-NP/GFP issues de souris de souche FVB/N (H-2^q) ne peuvent pas présenter cet épitope de façon directe.

Il est important de souligner à ce stade que la construction de cette lignée a demandé beaucoup de temps et d'énergie de la part de nos deux équipes. Un premier vecteur permettant l'expression de l'épitope NP₃₆₆₋₃₇₄ fusionné à la protéine ovalbumine entière sous dépendance du promoteur CAG ainsi que celle de la GFP sous la dépendance du promoteur SFFV a en effet été produit et testé par l'équipe du Dr Jacqueline Marvel puis abandonné à cause d'une expression insuffisante de l'ovalbumine non corrélée à l'expression de la GFP. De plus, la

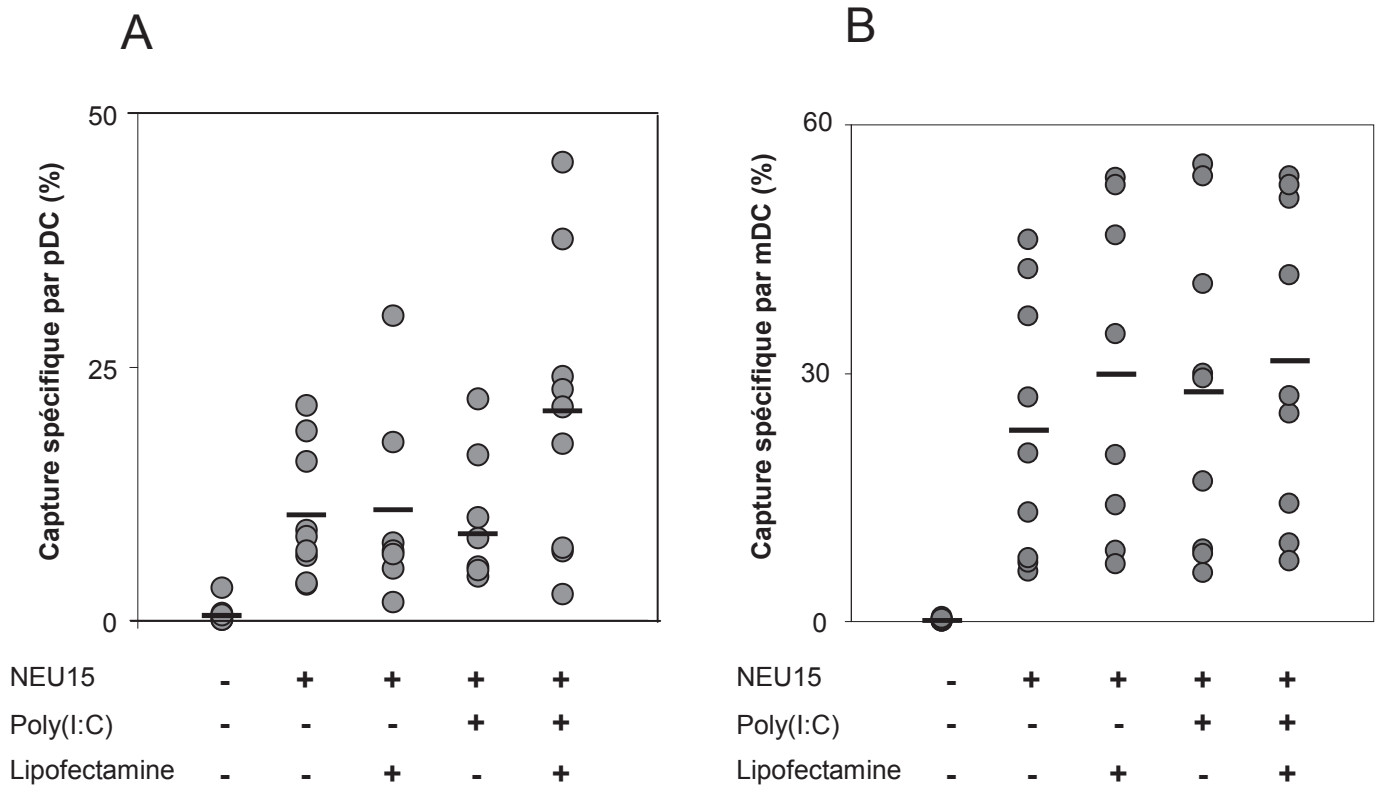


Figure R6 : Capture de matériel tumoral apoptotique par les pDC et mDC

Données cumulées de 9 expériences indépendantes sur la capture de matériel tumoral apoptotique NEU15 préalablement transfecté par Poly(I:C) ou non par les pDC (**A**) et les mDC (**B**). Chaque symbole représente une expérience, les moyennes sont représentées par les barres horizontales.

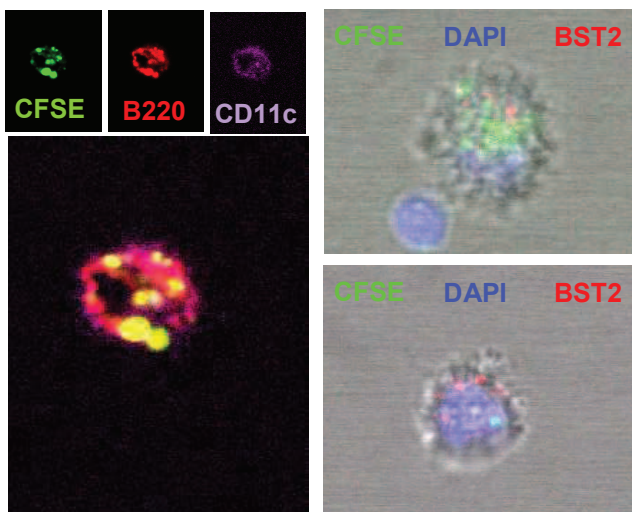


Figure R7 : Capture de matériel tumoral apoptotique par les pDC

Les DC cultivées en présence de cellules NEU15 apoptotiques préalablement transfectées par Poly(I:C) sont marquées par des anticorps spécifiques de CD11c, B220 (panneau de gauche - 1 expérience) ou BST2 (panneau de droite - 1 seconde expérience indépendante) puis lavées. Les cellules sont déposées sur lamelles recouvertes de polylysine et laissées adhérer pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées et montées et les lames sont analysées par microscopie confocale (Leica Objectif x63).

lignée NEU15-NP/GFP obtenue après infection par le second vecteur présente une expression d'HER2/Neu très instable nécessitant des purifications répétitives. Enfin, des problèmes de contaminations répétées par MHV à l'animalerie du PBES où sont hébergées les souris transgéniques Rag^{-/-} F5 ainsi qu'à notre animalerie, ont limité de façon importante le nombre d'animaux disponibles.

Ces nombreuses difficultés nous ont ainsi empêché de réaliser de façon optimale les expériences de présentation croisée. De plus, les résultats préliminaires suggèrent que l'épitope NP₃₆₆₋₃₇₄ obtenu par capture des cellules NEU15-NP/GFP n'est pas présenté aux lymphocytes T CD8⁺ spécifiques même par les cDC totales (CD11c⁺ BST2⁻) issues de souris C57Bl/6 (H-2^b) activées ou non par CpG. En revanche, celles-ci présentent efficacement le peptide NP₃₆₆₋₃₇₄ lorsque celui-ci est chargé de façon exogène (non illustré). Les données obtenues dans l'équipe du Dr Jacqueline Marvel suggèrent de plus que la présentation croisée par les BM-DC de l'épitope apporté par cette construction semble restreinte à une lignée cellulaire (EL-4, mais pas Baf3 ni NEU15).

CONCLUSION

Les données actuelles ne nous permettent pas de conclure de façon certaine sur la capacité des pDC à capturer plus efficacement et à présenter les antigènes issus de cellules tumorales infectées. Les expériences de présentation croisée devront ainsi être poursuivies lorsque le modèle (cette construction antigénique ou une autre) aura été validé avec des DC totales de rate.

Outre une question d'importance sur la physiologie des pDC, ces travaux pourraient valider l'utilisation de vecteurs viraux thérapeutiques ciblant les cellules tumorales pour activer la présentation croisée par les TApDC.

De façon importante, le modèle tumoral que nous avons développé permettra également d'évaluer *in vivo* l'efficacité de signaux ciblant le TLR7 ou le TLR9 en combinaison avec un traitement suboptimal par le Lapatinib (validé, non illustré).

METHODES

Lignées tumorales

Les lignées NEU15 et NEU17 ont été générées au laboratoire à partir de tumeurs spontanées développées par des souris transgéniques FVB/N-MMTVneu-202Mul (MMTVneu) (H-2^d) surexprimant le proto-oncogène de rat HER2/Neu sous la dépendance du promoteur MMTV spécifique de la glande mammaire. ANV17 est un variant de la lignée NEU ayant perdu l'expression de HER2/Neu suite à une réimplantation chez une souris FVB WT. La lignée NEU15-NP/GFP exprimant l'épitope classe I NP₃₆₆₋₃₇₄ fusionné à la GFP sous la dépendance du promoteur SFFV a été obtenue par infection lentivirale de la lignée NEU15 en collaboration avec l'équipe du Dr Jacqueline Marvel. Ces lignées sont cultivées en DMEM complété par 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 1% de L-glutamine (DMEMc). La lignée NEU15-NP/GFP est purifiée sur la base de l'expression de HER2/Neu avant chaque utilisation par marquage avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre HER2/Neu de rat (Ab-4) puis sélection positive par MACS avec des billes couplées à un anti-mIgG2_{a+b}. La totalité des cellules HER2/Neu⁺ exprime également la GFP.

Modélisation de l'infection virale

La lignée NEU15 adhérente est préalablement marquée au CFSE (10µg/mL) pendant 15 min. Les cellules sont lavées, incubées en DMEMc pendant 30 min puis lavées à nouveau. Les cellules marquées sont ensuite transfectées par Poly(I:C) par incubation en DMEMc pendant 4 heures en présence de Poly(I:C) (2µg/mL) préalablement complexé à la Lipofectamine 2000 dans un milieu adéquat (OPTI-MEM). Des contrôles négatifs sont réalisés en présence de DMEM seul, de Poly(I:C) seul, de Lipofectamine seule ou par transfection de Poly(dA). De façon alternative, les cellules tumorales ont été infectées par une souche virulente du virus Influenza (PR8, MOI 1) en DMEM 2% SVF pendant 6 heures.

Les cellules NEU15 infectées ou non sont ensuite incubées en DMEM 2% SVF en présence de Lapatinib (Tyverb® GaxoSmithKline, 1µM) pendant 24 heures. Les cellules apoptotiques non adhérentes sont ensuite utilisées en co-culture avec les DC.

Capture de matériel tumoral

Les DC totales sont enrichies à partir de rates de souris femelles 129Sv naïves par sélection positive des cellules CD11c⁺ par MACS. Les DC enrichies sont cultivées en présence des cellules NEU15 apoptotiques préalablement marquées au CFSE et « infectées » ou non à un ratio 1:1 en RPMI complet en présence de 20ng/ml de Flt3L (RPMIc-Flt3L) pendant 16 heures. Les cellules sont ensuite marquées et la capture de matériel tumoral fluorescent par les pDC (CD11c⁺ B220⁺ CD11b⁻) et les mDC (CD11c⁺ B220⁻ CD11b⁺) est évaluée par cytométrie en flux. En parallèle, les cellules préalablement marquées sont déposées sur une lamelle recouverte de polylysine et laissées adhérer pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées et montées et les lames sont analysées par microscopie confocale (Leica Objectif x63)

Test de présentation croisée

Plusieurs essais ont été réalisés. Dans l'un d'eux, les cDC totales (CD11c⁺ BST2⁻) et les pDC (CD11c⁺ BST2⁺) ont été purifiées par cytométrie en flux à partir de rates de souris C57Bl/6 (H-2^b) enrichies sur la base de l'expression du CD11c. Les cDC et les pDC ont ensuite été cultivées en plaque 96 puits à fonds ronds à différentes concentrations (0, 6000, 20.000 et 60.000 cellules par puits pour les cDC, 40.000 cellules par puits pour les pDC sous 150µL

final) en présence ou non de 200.000 cellules NEU15-NP/GFP (H-2^q) apoptotiques préalablement transfectées par Poly(I :C) ou non en DMEMc-Flt3L. Après 16 heures, 20.000 cellules (>95% LT CD8⁺) obtenues à partir des ganglions de souris Rag^{-/-} F5 (H-2^b) sont ajoutées sous 50µL de DMEMc-Flt3L complémenté à 40% par un surnageant d'hybridome produisant de l'IL-2 (10% final) et ou non par 20µg/mL de CpG-B/ODN1826 (5µg/mL final). En contrôle positif, le peptide NP₃₆₆₋₃₇₄ est ajouté sur les cDC seules à 10nM final 2 heures avant l'ajout des LT CD8⁺ puis les cellules sont lavées avant l'ajout des LT CD8⁺. La prolifération est évaluée à 4-5 jours par mesure de l'incorporation de Thymidine tritiée (0.5µCi/puit) pendant les 18 dernières heures de culture. Les souris Rag^{-/-} F5, l'hybridome IL-2 et le peptide NP₃₆₆₋₃₇₄ nous ont été gracieusement fournis par l'équipe du Dr Jacqueline Marvel. Le protocole a été adapté à partir d'un protocole couramment utilisé dans cette équipe pour suivre la présentation croisée par les DC issues de cultures de moelle osseuse.

DISCUSSION

Les DC en tant que cellules présentatrices d'antigènes « professionnelles » jouent un rôle central dans l'induction des réponses adaptatives. Cependant, comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, les DC constituent une population hétérogène tant sur le plan phénotypique que fonctionnel. De plus, ces cellules présentent une grande flexibilité dans leur capacité à induire l'immunité ou la tolérance selon les conditions environnementales. En effet, le système immunitaire possède des mécanismes intrinsèques de régulation négative des réponses immunes permettant d'éviter le développement de pathologies auto-immunes, d'allergies aux antigènes de l'environnement ou d'immuno-pathologies résultant d'une inflammation excessive lors d'infections. Parmi ces mécanismes figurent la différenciation thymique de Treg naturels mais également la capacité des cDC à induire une tolérance, notamment en l'absence de signaux de danger, par délétion clonale des LT, inhibition de leur prolifération ou promotion de leur différenciation *de novo* en LT suppresseurs (Tr1 ou Treg induits). Les pDC conservent de plus la capacité d'induire des réponses suppressives même lorsqu'elles sont activées. Ces cellules semblent donc jouer un rôle crucial dans la régulation positive ou négative des réponses immunes.

Le cancer est associé à un grand nombre d'altérations des cellules immunitaires conduisant à l'échappement des tumeurs à l'immuno-surveillance. Les tumeurs semblent d'une part inhiber l'induction des réponses effectrices mais également détourner à leur avantage les mécanismes de régulation négative du système immunitaire. Les nombreuses altérations visant les cDC en terme d'inhibition de leur différenciation, de leur capacité à induire des réponses T effectrices spécifiques d'antigènes tumoraux et de promotion de leur induction de réponses tolérogènes et/ou suppressives ont été détaillées dans l'introduction. Nos résultats concernant l'altération des DC myéloïdes infiltrant les tumeurs mammaires murines sont par ailleurs en accord avec les données de la littérature et ne seront pas spécifiquement discutés ici.

Ainsi, l'ensemble de la discussion sera centré sur les résultats présentés précédemment concernant les pDC. Nous mettrons nos résultats en parallèle avec les données obtenues chez l'homme par notre équipe (Sisirak V. et al, manuscrit soumis, en Annexe) et les données de la littérature actuelle sur la régulation et/ou la dérégulation des fonctions des pDC. Enfin, nous aborderons les perspectives amenées par ces travaux en terme de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les pDC dans le cancer du sein.

1- Les TApDC sont fonctionnellement altérées dans les tumeurs

Peu de données existent à ce jour sur le rôle et la fonctionnalité des pDC associées au cancer. Certaines études suggèrent pourtant qu'elles sont également altérées et/ou impliquées dans la dérégulation du système immunitaire chez les patients atteints de cancer ou les animaux porteurs de tumeurs. Pour ces raisons, et suite à l'observation clinique initiale de leur impact négatif sur le pronostic des patientes atteintes de cancer du sein, nous nous sommes attachés à caractériser la fonctionnalité des pDC intra-tumorales (TApDC) dans un modèle murin de tumeur mammaire. Notre étude, associée à une seconde étude réalisée chez l'homme par notre équipe (Annexe) constituent les premières descriptions de la fonctionnalité des TApDC purifiées à partir des tumeurs solides.

a) Altération sélective de la réponse des TApDC aux ligands du TLR9 et conservation de la réponse aux ligands du TLR7

Nos résultats montrent que la production d'IFN- α par les TApDC isolées de tumeurs mammaires murines est très fortement altérée en réponse au CpG-A, ligand du TLR9. Ils sont par ailleurs en accord avec les données obtenues chez l'homme par notre équipe sur les TApDC isolées de tumeurs mammaires humaines et les pDC isolées d'amygdales et cultivées en présence de surnageants tumoraux mammaires. Les données publiées dans le cancer de la tête et du cou (Hartmann et al., 2003) montrent également que les surnageants de tumeurs inhibent la production d'IFN- α par les pDC humaines normales en réponse au CpG-A. En revanche, nos résultats diffèrent de ceux obtenus par le groupe de T. Curiel sur les pDC isolées d'ascites ovariennes (Zou et al., 2001). Cependant, des données de notre équipe montrent que les pDC isolées d'ascites ovariennes sont effectivement peu altérées alors que les TApDC isolées à partir des tumeurs sont fortement inhibées comme dans le sein (Labidi I. et al, manuscrit en préparation). Nous avons de plus montré que la production des cytokines inflammatoires IL-6 et TNF- α et des chimiokines MIP-1 α et RANTES était également altérée en réponse au CpG-A. Chez l'homme en revanche, la production de chimiokines par les pDC ne semble pas altérée par l'environnement tumoral. Il est dans l'état actuel des connaissances difficile d'expliquer ces différences mais il reste possible que d'autres mécanismes d'inhibition existent dans les tumeurs mammaires murines qui ne sont pas observés chez les patientes. Nous avons par ailleurs confirmé l'altération fonctionnelle des TApDC en réponse au CpG-B.

En contraste avec la réponse aux ligands du TLR9, nous montrons pour la première fois que la réponse des TApDC à deux ligands du TLR7 (Virus Influenza et CL075) en terme de production d'IFN- α et des autres cytokines/chimiokines n'est pas ou très peu altérée par l'environnement tumoral. Les résultats obtenus chez l'homme par notre équipe vont par ailleurs dans le même sens bien que certaines différences subsistent entre les deux modèles. Les surnageants tumoraux mammaires inhibent ainsi spécifiquement la production d'IFN- α et de TNF- α par les pDC en réponse au CpG-A mais pas au R-848. Cependant, contrairement avec nos résultats, les TApDC humaines ne semblent pas produire d'IFN- α en réponse au virus Influenza et la réponse des pDC humaines isolées d'amygdales au virus Influenza est également partiellement altérée par les surnageants tumoraux. La réponse des TApDC humaines n'a cependant pas été étudiée avec d'autres ligands du TLR7. De plus, aucune donnée n'existe dans d'autres modèles tumoraux sur la fonctionnalité des TApDC vis-à-vis des ligands du TLR7.

Ainsi, chez l'homme comme chez la souris, la réponse aux ligands du TLR9 des TApDC semble préférentiellement altérée.

b) L'altération de la réponse aux ligands du TLR9 pourrait représenter un avantage sélectif pour les tumeurs

Des altérations spécifiques de la réponse TLR9 vis-à-vis de la réponse TLR7 dans les pDC ont également été décrites dans d'autres systèmes et constitueraient des mécanismes d'échappement vis-à-vis du système immunitaire. Notamment les virus de l'hépatite C (HCV) (Gondois-Rey et al., 2009; Shiina and Rehermann, 2008) et la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Martinelli et al., 2007) inhibent la production d'IFN- α et de TNF- α par les pDC humaines en réponse aux ligands du TLR9 (CpG, HSV) mais pas aux ligands du TLR7 (virus Influenza, R-848 et imiquimod). Dans le cas d'HIV, les lectines DCIR et BDCA-2 sont toutes deux impliquées dans la reconnaissance et l'endocytose du virus (Lambert et al., 2008; Martinelli et al., 2007). L'internalisation de particules virales par ces récepteurs pourrait ainsi inhiber la production d'IFN- α comme montré dans l'introduction via leur ciblage par des anticorps (Cao et al., 2007; Dzionek et al., 2001; Meyer-Wentrup et al., 2008). Cependant, l'engagement de BDCA-2, via un signal par le motif ITAM de la chaîne γ du récepteur Fc ϵ R1, inhibe la réponse aux ligands du TLR9 (CpG-A, CpG-C et complexes immuns contenant de l'ADN) mais également aux ligands du TLR7 (virus Influenza et R-848) (Cao et al., 2007; Dzionek et al., 2001). En revanche, l'engagement de DCIR qui signale par un motif ITIM semble inhiber spécifiquement la

réponse au CpG-C mais pas au R-848 (Meyer-Wentrup et al., 2008). Pour HCV, l'inhibition de la voie du TLR9 semble être une conséquence indirecte d'un mécanisme d'échappement vis-à-vis des compartiments de signalisation par TLR7. En effet, ce virus, ligand du TLR7, n'induit qu'une faible production d'IFN de type I par les pDC. Il pourrait ainsi dérouter les endosomes qui le contiennent avec le TLR9 vers des compartiments qui ne permettent pas la signalisation par IRF-7 (Gondois-Rey et al., 2009).

L'inhibition de la réponse aux ligands du TLR9 des TApDC pourrait ainsi également représenter un avantage sélectif pour les tumeurs. Ceci suggère l'existence de ligands endogènes (non microbiens) du TLR9 mais pas du TLR7 dans l'environnement tumoral. La libération de ces ligands, pourrait ainsi, si la réponse TLR9 n'était pas altérée, induire la production d'IFN de type I par les TApDC *in situ* qui pourrait contrer la progression tumorale d'une part en activant les réponses immunes et d'autre part en inhibant l'angiogénèse, la prolifération des cellules tumorales et en induisant leur apoptose (Thyrell et al., 2002). Dans ce sens, la libération de ligands endogènes du TLR9 est bien documentée dans le cadre des maladies auto-immunes. Ainsi, le relargage de molécules d'ADN lors de la mort cellulaire peut, via leur association avec des auto-anticorps et/ou le peptide anti-microbien LL37, faciliter leur internalisation par les pDC, leur reconnaissance par le TLR9 et la sécrétion massive d'IFN de type I conduisant au développement de lupus (Barrat et al., 2005; Gilliet et al., 2008; Means et al., 2005) ou de psoriasis (Lande et al., 2007). Le TLR9 n'est donc pas spécialisé dans la reconnaissance des nucléotides microbiens mais peut également être activé et induire la production d'IFN de type I suite à la reconnaissance d'ADN du soi, la seule condition étant l'accessibilité de ces molécules aux endosomes. Dans les tumeurs, il existe un certain niveau d'apoptose et de nécrose qui pourrait permettre la libération de tels ligands endogènes. Dans ce sens, de l'ADN circulant provenant des cellules tumorales est fréquemment retrouvé dans le sang des patients atteints de cancer (Jahr et al., 2001). Le peptide LL37 pourrait également être présent dans l'environnement tumoral sécrété par les neutrophiles (Zasloff, 2002) ou par les cellules tumorales mammaires elles-mêmes (Stroinigg and Srivastava, 2005). Cependant, dans les pathologies auto-immunes, les cellules mortes relarguent également des molécules d'ARN qui activent, par des mécanismes similaires, la production d'IFN de type I par les pDC via le TLR7 (Barrat et al., 2005; Ganguly et al., 2009; Vollmer et al., 2005). Il semble ainsi peu probable que les mêmes ligands endogènes soient impliqués dans les tumeurs à moins que les molécules d'ARN libérées dans l'environnement tumoral soient plus efficacement dégradées que les molécules d'ADN.

c) Mécanismes impliqués dans l'altération fonctionnelle des TApDC

Dans le cas des cancers de la tête et du cou, les surnageants tumoraux induisent une diminution de l'expression du TLR9 par les pDC par un mécanisme non identifié (Hartmann et al., 2003). Cependant, nous n'avons pas observé de diminution de l'expression du TLR9 par les TApDC murines. Les données obtenues chez l'homme sur l'absence de modulation de l'expression du TLR9 par les surnageants tumoraux mammaires et la production de chimiokines en réponse au CpG par les TApDC humaines et les pDC normales exposées aux surnageants tumoraux semblent également exclure cette possibilité.

De nombreux facteurs solubles potentiellement présents dans l'environnement tumoral mammaire tels que l'IL-10, la PGE2, le TGF- β (Contractor et al., 2007; Son et al., 2006) et les nucléotides (UDP, UTP, ATP) (Shin et al., 2008) ont été décrits comme inhibiteurs de la production d'IFN- α par les pDC murines ou humaines en réponse aux CpG. Cependant, l'IL-10 apportée de façon exogène inhibe également la production de chimiokines par les pDC humaines contrairement aux surnageants tumoraux mammaires. De plus la neutralisation de l'IL-10 ne restaure pas la production d'IFN- α par les pDC humaines exposées aux surnageants tumoraux mammaires. Dans le même sens, les pDC isolées d'ascites ovariennes, riches en IL-10, produisent de l'IFN- α en réponse à une stimulation du TLR9 (Zou et al., 2001). La PGE2 inhibe également la production d'IFN- α par les pDC humaines exposées au SV, ligand du TLR7 (Son et al., 2006). Les nucléotides ligands des récepteurs P2Y inhibent quant à eux la réponse des pDC humaines à certains ligands des TLR7 et -9 mais pas à tous (Shin et al., 2008). En revanche, dans les expériences de l'équipe le TGF- β semble majoritairement impliqué dans l'altération spécifique de la production d'IFN- α et de TNF- α mais n'affecte pas la production de chimiokines en réponse aux ligands du TLR9 mais pas du TLR7 par les pDC humaines exposées aux surnageants tumoraux mammaires. Cependant, dans une étude réalisée chez la souris, le TGF- β produit par les cellules stromales spléniques inhibe également la réponse des pDC murines au VSV, ligand du TLR7 (Li et al., 2008).

Il semble ainsi difficile d'identifier les facteurs intervenant dans l'environnement tumoral mammaire. En effet, nombre de molécules inhibent la production d'IFN- α par les pDC lorsqu'elles sont apportées de façon exogène mais pourraient, telle l'IL-10, ne pas être impliquées dans l'inhibition exercée par les surnageants tumoraux mammaires bien qu'ils en contiennent. Il est également possible que plusieurs facteurs agissent en synergie, tels le TGF- β et le TNF- α , et que cette action conjointe diffère de l'action individuelle de chaque facteur. Enfin, des différences entre les pDC humaines et murines pourraient également exister quant à la sensibilité vis-à-vis de ces facteurs tels que le TGF- β .

Les différences observées entre l'altération des pDC par les surnageants tumoraux et les TApDC isolées des tumeurs humaines concernant la réponse au virus Influenza pourraient s'expliquer par l'addition d'autres mécanismes d'inhibition au sein des tumeurs passant par des contacts membranaires. De plus, les récepteurs membranaires étant distincts entre les pDC murines et humaines ces interactions pourraient également expliquer les différences observées entre les résultats obtenus chez l'homme et la souris concernant la réponse des TApDC au virus Influenza. Notamment, BST2, ligand d'ILT7, est exprimé par de nombreuses lignées tumorales humaines de différentes origines et les cellules de tumeurs primaires du sein (collaboration N. Bendriss-Vermare /Y.J. Liu) et est impliqué dans l'inhibition de la production d'IFN- α par les pDC en réponse au CpG mais également au virus Influenza (Cao et al., 2006; Cao et al., 2009; Tsukamoto et al., 2009). L'engagement de BDCA-2 dans les tumeurs humaines pourrait également altérer la réponse des TApDC aux TLR-L bien que le ligand naturel de cette lectine ne soit pas connu. Dans ce sens, son ciblage sur les pDC humaines inhibe la production d'IFN- α , de TNF- α et d'IL-6 mais pas la production des chimiokines (Cao et al., 2007). Ces deux récepteurs ne sont pas exprimés par les pDC murines. L'engagement de DCIR sur les TApDC murines pourrait en revanche expliquer l'inhibition sélective de la réponse TLR9 (Meyer-Wentrup et al., 2008). Bien que l'inhibition spécifique de la réponse au CpG mais pas au R-848 suite au ciblage de cette lectine ait été décrite chez l'homme, toutes les cellules spléniques murines à l'exception des LT expriment l'équivalent murin (Kanazawa et al., 2002).

Il semble donc probable que plusieurs facteurs solubles et/ou membranaires interviennent dans l'environnement tumoral et puissent différer entre les tumeurs mammaires humaines et murines. Cependant, l'ensemble des données humaines et murines suggère fortement que l'altération de la réponse des TApDC n'est pas complète. Leur réponse aux ligands fortement inducteurs d'IFN- α semble notamment plus affectée que leur réponse aux ligands faiblement inducteurs. Notamment, pour toutes les cytokines/chimiokines étudiées, la réponse des TApDC murines au CpG-A semble altérée de façon plus importante encore que la réponse au CpG-B. En rapport avec cette observation, ces deux molécules sont connues pour activer des voies de signalisation distinctes à cause de leur trafic intracellulaire différent dans les pDC et de la régulation spatio-temporelle de la signalisation par IRF-7 restreinte aux endosomes précoces (Honda et al., 2005; Kerkmann et al., 2005). Les nucléotides (UDP, UTP, ATP) semblent également agir dans ce sens puisqu'ils inhibent la production d'IFN- α par les pDC humaines en réponse au CpG-A et au virus Influenza mais pas au CpG-B ni au R-848 qui sont de plus faibles inducteurs d'IFN- α (Shin et al., 2008). Il semble donc possible que les tumeurs

altèrent plus fortement la signalisation médiée au niveau des endosomes précoces ou modifient la cinétique de maturation des endosomes dans les pDC.

2- Rôle des TApDC dans l'induction de tolérance

L'impact négatif des pDC sur la survie des patientes atteintes de cancer du sein suggère que les pDC ne sont pas seulement altérées pour leur capacité à sécréter des cytokines mais pourraient également être impliquées dans la promotion directe de la croissance tumorale ou dans l'induction de réponses suppressives. La contribution possible des pDC à la néoangiogenèse tumorale (Curiel et al., 2004) et à l'induction de LT CD8⁺ suppresseurs (Wei et al., 2005) a ainsi été montrée dans les tumeurs métastatiques ovariennes. De plus, comme illustré dans l'introduction, les pDC sont également impliquées dans différents modèles dans l'induction de tolérance immune par différenciation de Tr1 (Ito et al., 2007), de Treg (Moseman et al., 2004; Ochando et al., 2006), par délétion des LT CD8⁺ spécifiques (Goubier et al., 2008) et par suppression des réponses induites par les cDC (de Heer et al., 2004; Kool et al., 2009).

Nos résultats montrent par ailleurs que les TApDC murines ne sont pas allo-stimulatrices. Ceci semble en contradiction avec les données obtenues chez l'homme où seules les fonctions innées des TApDC sont altérées. Cependant, chez l'homme, les LT utilisés dans la réaction allogéniques ne contenaient que la population naïve alors que nous avons utilisé les LT CD4⁺ spléniques totaux contenant les Treg pré-existants. Ainsi, l'absence d'allo-stimulation des TApDC murines pourrait résulter de l'activation des fonctions suppressives des Treg. Cependant, nous n'avons pas réalisé de réactions allogéniques en déplaçant les Treg et cette hypothèse reste à valider. Des données récentes, obtenues au laboratoire et par d'autres, suggèrent cependant l'implication des TApDC dans l'activation des Treg dans les tumeurs mammaires humaines confortant notre hypothèse. En effet, les Treg sont activés et prolifèrent dans les tumeurs mammaires humaines et expriment sélectivement ICOS (Gobert et al., 2009). L'expression d'ICOS-L par les pDC est par ailleurs associée à leur capacité à induire la différenciation de LT CD4⁺ suppresseurs producteurs d'IL-10 (Colvin et al., 2009; Ito et al., 2007) et la survie et la prolifération des Treg naturels ICOS⁺ ainsi que leur production d'IL-10 (Ito et al., 2008). Des données du laboratoire montrent que les Treg ICOS⁺ sont en contact étroit avec les pDC dans les tumeurs mammaires humaines et que les TApDC ont perdu l'expression de surface d'ICOS-L probablement suite à son engagement par ICOS comme cela a été décrit chez la souris (Watanabe et al., 2008) et dans notre laboratoire (Faget

J. et al, manuscrit en préparation). La stimulation des Treg via ICOS par les TApDC, pourrait ainsi être un élément essentiel permettant leur prolifération dans les tumeurs et le développement de leurs fonctions suppressives.

3- Activation de la présentation des antigènes par les pDC

Par leur position centrale dans l'immunité anti-virale, les pDC et notamment les TApDC apparaissent comme des cibles intéressantes pour des approches d'immunothérapie anti-tumorale. De telles approches, utilisant l'imiquimod dans les cancers basocellulaires, les lymphomes T cutanés et les mélanomes ont par ailleurs confirmé le rationnel de cibler les TApDC (Palamara et al., 2004; Sary et al., 2007; Urosevic et al., 2005). Dans ces conditions, l'efficacité thérapeutique de l'imiquimod est associée au recrutement intra-tumoral de pDC (Palamara et al., 2004), à l'activation de leur sécrétion d'IFN- α (Sary et al., 2007; Urosevic et al., 2005) et à l'induction d'une activité cytotoxique par les cDC dépendante de la production de perforine et de granzyme B et par les pDC dépendante de l'expression de TRAIL (Sary et al., 2007). Il semble cependant peu probable que les pDC et les cDC suffisent en tant que cellules effectrices à expliquer l'efficacité du traitement par l'imiquimod. Plus probablement, la cytotoxicité médiée par les DC serait un moyen d'acquérir des antigènes (Bonmort et al., 2008). Dans ces conditions, la production d'IFN- α par les pDC pourrait intervenir de façon critique dans l'induction d'une réponse effectrice par les cDC. La cytotoxicité des pDC pourrait également être un moyen pour ces cellules d'acquérir des antigènes et d'agir en tant qu'APC par elles mêmes.

Au début de mon projet, le rôle des pDC en tant qu'APC était largement méconnu. Etant donné leur rôle clé dans l'immunité anti-virale, nous nous sommes attachés à déterminer leur capacité à induire une réponse anti-tumorale en condition d'infection virale des cellules tumorales. Nous avons choisi de dissocier le signal viral donné à la cellule tumorale par transfection de Poly(I:C) de l'activation des pDC ceci afin d'identifier plus précisément quels signaux étaient nécessaires pour activer 1) la capture de matériel tumoral apoptotique, 2) la présentation croisée des antigènes et 3) l'induction d'une réponse effectrice par les pDC.

En effet, contrairement aux cDC humaines et aux cDC CD8 α^+ murines, les pDC ne capturent pas de matériel cellulaire apoptotique de façon constitutive (Dalgaard et al., 2005; Iyoda et al., 2002). Il était donc important de déterminer si l'infection virale des cellules tumorales pouvait entraîner des modifications cellulaires permettant leur reconnaissance et leur internalisation par les pDC de façon indépendante de leur maturation phénotypique. Si nos résultats ne nous

permettent pas de conclure de façon certaine, ils suggèrent cependant que l'infection virale favorise la capture de matériel tumoral apoptotique par les pDC. Par ailleurs, les données récentes de la littérature confirment notre hypothèse. Les pDC humaines semblent en effet capables de capturer des fragments issus de cellules infectées par HIV (Hoeffel et al., 2007) ou par le virus Influenza (Lui et al., 2009). De façon importante dans cette dernière étude, l'infection virale des cellules est nécessaire à leur internalisation par les pDC.

Indépendamment de l'inductibilité de la capture de matériel cellulaire dépendante d'une infection virale, les pDC murines et humaines sont aujourd'hui reconnues comme capables d'internaliser des antigènes solubles ou particuliers (de Heer et al., 2004; Mouries et al., 2008; Ochando et al., 2006). Cependant, cette internalisation ne résulte pas constitutivement à la présentation croisée des antigènes. Les pDC murines ayant capturé des antigènes ne sont ainsi capables de réaliser la présentation croisée qu'à condition d'être activées par des ligands du TLR7 et dans une moindre mesure du TLR9 (Mouries et al., 2008). Dans ce sens, les pDC sont similaires aux cDC CD8 α ⁻ murines par l'inductibilité de l'activation de leur machinerie de présentation croisée (den Haan and Bevan, 2002; Moron et al., 2002; Pooley et al., 2001; Schulz and Reis e Sousa, 2002). En revanche, la capture de corps apoptotiques infectés par le virus Influenza par les pDC suffit par elle-même probablement également via leur activation par le TLR7 à induire leur maturation, leur production d'IFN- α et à activer leur machinerie de présentation croisée des antigènes (Lui et al., 2009). Dans tous les cas l'activation par les TLR-L de la présentation croisée par les pDC conduit à l'induction d'une réponse effectrice (Di Pucchio et al., 2008; Hoeffel et al., 2007; Lui et al., 2009; Mouries et al., 2008).

Ainsi, l'infection virale des cellules permettrait d'induire à la fois l'internalisation des corps apoptotiques mais également d'activer via la reconnaissance de TLR-L, la machinerie de présentation croisée des pDC, leur maturation phénotypique, leur sécrétion de cytokines et leur induction de réponses effectrices.

De façon intéressante, la capture de corps apoptotiques transfectés par Poly(I :C) ou infectés par le virus Influenza par les cDC humaines dérivées de monocytes résulte en une inhibition sélective de la présentation croisée des antigènes issus de ces corps apoptotiques bien que la présentation classique aux LT CD4⁺ et la présentation croisée d'autres antigènes exogènes ne semble pas altérée (Frleta et al., 2009). Ceci suggère que dans ces cellules, la présence d'un TLR-L viral dans l'endosome dirige sélectivement celui-ci vers les compartiments de chargement de molécules du CMH-II comme proposé par le groupe de R. Medzhitov (Blander and Medzhitov, 2006). Cependant, la transfection des cellules par Poly(I :C) a préalablement été montrée pour activer la capacité des cDC CD8 α ⁺ murines à induire une réponse T CD8⁺

effectrice. Ces DC réalisant la présentation croisée des antigènes de façon constitutive, cet effet semble passer par l'activation via le TLR3 des cDC CD8 α ⁺ résultant en leur induction d'immunité plutôt que de tolérance (Schulz et al., 2005). Il semble ainsi que la régulation de la présentation croisée des antigènes soit dépendante du type cellulaire ce qui pourrait permettre un meilleur contrôle de l'induction des réponses effectrices lors d'une infection. Les sous population de DC seraient ainsi spécialisées dans la présentation croisée des antigènes dans certaines situations. Les pDC pourraient ainsi être spécialisée dans la présentation croisée des antigènes issus des cellules infectées.

L'hypothèse d'un rôle des TApDC dans l'induction de tolérance vis-à-vis de la tumeur suggère cependant qu'elles agissent déjà en tant qu'APC dans les tumeurs. Si l'activation des Treg suggère une présentation des antigènes en association avec les molécules du CMH-II, l'induction de LT CD8⁺ suppresseurs décrite dans les tumeurs métastatiques ovariennes suggère qu'elles réalisent également la présentation croisée des antigènes (Wei et al., 2005). Dans un autre contexte, les pDC induisent la délétion des LT CD8⁺ spécifiques des antigènes apportés par voie orale suggérant également qu'elles présentent ces antigènes (Goubier et al., 2008). Si, comme le suggèrent fortement les données de la littérature, la présentation croisée par les pDC est dépendante de l'activation par les TLR-L, ceci conforte l'hypothèse de la présence de ligands endogènes des TLR dans les tumeurs (et l'intestin). Un environnement immuno-suppresseur tel que celui retrouvé dans les tumeurs et dans l'intestin (Contractor et al., 2007) inhiberait ainsi spécifiquement la production d'IFN- α en réponse à ces ligands mais pas leur effet sur l'activation de la présentation croisée des antigènes par les pDC. Une telle présentation en l'absence de production d'IFN- α pourrait alors favoriser l'induction de tolérance par les pDC vis-à-vis des antigènes tumoraux comme des antigènes ingérés.

Perspectives et conclusion

Un certain nombre d'hypothèses soulevées dans la discussion pourront ainsi être étudiée dans le modèle que nous avons mis en place et dans un autre modèle en cours de caractérisation au laboratoire.

1- Les TApDC induisent-elles une tolérance en tant qu'APC dans les tumeurs ?

Pour répondre à cette question, le modèle cellulaire de présentation croisée de l'épitope NP aux LT CD8⁺ F5 nécessite encore d'être validé *in vitro*. De façon alternative, nous avons importé au laboratoire un autre modèle cellulaire dérivé de tumeurs mammaires spontanées

MMTV/Neu-OT-I/OT-II WAP/DNp53(R172H). Ces souris transgéniques expriment l'oncogène HER2/Neu activé fusionné aux épitopes classe I et classe II de l'ovalbumine reconnus par les LT OT-I et OT-II sous la dépendance du promoteur MMTV ainsi qu'un dominant négatif de p53 sous la dépendance du promoteur WAP (whey acid protein) (Wall et al., 2007). Nous avons obtenu de Brad Nelson, 4 lignées dont l'une (NOP17) est également sensible à l'apoptose induite par le Lapatinib de façon semblable à la lignée NEU15. Nous pourrions d'une part, une fois ces deux modèles validés *in vitro* en présentation croisée avec des cDC, valider ou non le rôle de l'infection virale des cellules tumorales sur la présentation croisée des antigènes tumoraux modèles (NP ou OVA) par les pDC après capture de matériel tumoral *in vitro*. La présence d'un épitope classe II de l'ovalbumine dans le second modèle cellulaire nous permettra également d'étudier le profil de la réponse T CD4⁺ induite par les pDC.

Enfin, après réimplantation de ces lignées *in vivo*, nous pourrions alors déterminer si les TApDC isolées des tumeurs présentent *ex vivo* ces antigènes aux LT CD8⁺ et/ou CD4⁺ spécifiques sans traitement préalable.

De façon importante, le modèle NOP17, parce qu'il est en fond génétique C57Bl/6, nous permettra de plus d'utiliser les souris déficientes pour les différents TLR afin de confirmer ou non l'importance de la reconnaissance d'un ligand TLR endogène sur la présentation croisée des antigènes tumoraux par les TApDC. Si ce rôle est confirmé, l'impact de cette présentation par les TApDC sur l'induction de tolérance vis-à-vis de la tumeur pourra également être évalué. En effet, si une telle présentation est nécessaire à l'induction de tolérance, les souris déficientes pour le TLR impliqué devraient alors rejeter les tumeurs. Le rôle des TApDC dans l'induction de tolérance pourra également être évalué par déplétion des pDC durant la croissance tumorale. Cependant, des résultats préliminaires suggèrent que les TApDC ne sont pas éliminées par ce traitement. De façon alternative, l'utilisation de souris déficientes en pDC telles que les souris Ikaros^{L/L} (Allman et al., 2006) sera également possible dans le cas du modèle NOP17.

2- Les TApDC ont-elles un rôle dans l'activation des Treg ?

Si nous nous sommes focalisés sur les TApDC dans notre modèle tumoral, celui-ci est également infiltré par des Treg. Notamment ceux-ci expriment fortement ICOS comme dans les tumeurs mammaires humaines (données de M. Gobert, non publiées). Dans le futur, ce modèle se prêtera ainsi à de plus amples études *in vivo* sur l'importance de l'interaction entre les TApDC et les Treg par des approches de neutralisation de l'interaction ICOS-L/ICOS.

L'impact de ce traitement pourra alors être évalué sur la prolifération des Treg *in situ*. Ces données compléteront par une approche *in vivo*, un projet développé chez l'homme dans notre équipe (Faget J, manuscrit en préparation).

3- Les TApDC induisent-elles une tolérance par absence de production d'IFN- α ?

Dans notre modèle initial également, l'impact d'un traitement suboptimal *in vivo* par le Lapatinib (déjà validé) en combinaison ou non avec un signal d'activation exogène des TApDC par des ligands des TLR restaurant la production d'IFN- α pourra également être étudié vis-à-vis de l'activation de la capacité des TApDC à induire une réponse effectrice *in vitro* ou *in vivo* (effet thérapeutique).

De plus, le modèle NOP17 nous permettra également d'utiliser les souris déficientes pour le récepteur IFNAR afin d'évaluer l'importance de la restauration de la production d'IFN- α sur l'induction d'immunité.

En conclusion, l'ensemble de ces données suggère que bien que les TApDC soient fonctionnellement altérées par l'environnement tumoral et puissent participer à l'induction d'une tolérance immune vis-à-vis de la tumeur, leur réactivation *in situ* pourrait conduire à l'induction d'une réponse anti-tumorale effectrice. Les ligands du TLR7 seraient ainsi à privilégier par rapport aux ligands du TLR9 pour médier cette réactivation. Le ciblage des cellules tumorales par des vecteurs viraux pourrait également induire leur reconnaissance par les TApDC et induire leur activation. La nécessité de combiner ces signaux avec une thérapie ciblée telle que le traitement par le Lapatinib, avec un traitement éliminant les Treg (anti-CD25) ou inhibant leur interaction avec les TApDC (anti-ICOS) ou avec des molécules inhibant l'effet négatif de l'environnement tumoral sur les TApDC (anti-IL-10, anti-TGF- β) pourra de plus être évaluée dans notre modèle tumoral.

ANNEXE

Breast carcinoma environment, through TGF- β selectively impairs innate immune response of human plasmacytoid dendritic cells

Vanja Sisirak^{1,2,3,4}, Michael Gobert^{1,2,3,4}, Isabelle Treilleux⁵, Sarah Renaudineau^{1,2,3,4}, Gaelle Poyet^{1,2,3,4}, Sana Intidhar Labidi-Galy^{1,2,3,4,6}, Sophie Goddard-Leon⁵, Isabelle Durand^{1,2,3,4}, Nadège Goutagny^{1,2,3,4}, Isabelle Le Mercier^{1,2,3,4}, Thomas Bachelot^{1,6}, Isabelle Ray-Coquard⁶, Alain Puisieux^{1,2,3,4}, Christine Ménétrier-Caux^{1,2,3,4}, Jean-Yves Blay^{1,2,3,4}, Christophe Caux^{1,2,3,4}, and Nathalie Bendriss-Vermare^{1,2,3,4}.

¹ Inserm, U590, Lyon, F-69008, France; ² Centre Léon Bérard, « Equipe Cytokines et Cancers », Lyon, F-69008, France; ³ Université Lyon 1, ISPB, Lyon, F-69003, France ; ⁴ IFR62, Lyon, F-69008, France ; ⁵ Centre Léon Bérard, « Département d'anatomie et cytologie pathologiques », Lyon, F-69008, France; ⁶ Centre Léon Bérard, « Département d'Oncologie Médicale », Lyon, F-69008, France

Running title : pDC alteration in human breast cancer

Key-words : plasmacytoid dendritic cells, breast cancer, immunosuppression

Address correspondence to :

Dr Nathalie BENDRISS-VERMARE, INSERM U590, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon cedex 08, France; Tel : (33) 4 78 78 27 50; Fax : (33) 4 78 78 27 20; e-mail : bendris@lyon.fnclcc.fr or Dr Christophe CAUX, INSERM U590, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon cedex 08, France; Tel : (33) 4 78 78 51 39; Fax : (33) 4 78 78 27 20; e-mail : cauxc@lyon.fnclcc.fr

Abbreviations : BDCA, Blood Dendritic Cell Antigen; ODN, oligodeoxynucleotide; pDC, plasmacytoid dendritic cells; TApDC, Tumor-associated plasmacytoid dendritic cells; TLR, Toll-like receptor.

Breast carcinoma environment, through TGF- β selectively impairs innate immune response of human plasmacytoid dendritic cells

Vanja Sisirak^{1,2,3,4}, Michael Gobert^{1,2,3,4}, Isabelle Treilleux⁵, Sarah Renaudineau^{1,2,3,4}, Gaelle Poyet^{1,2,3,4}, Sana Intidhar Labidi-Galy^{1,2,3,4,6}, Sophie Goddard-Leon⁵, Isabelle Durand^{1,2,3,4}, Nadège Goutagny^{1,2,3,4}, Isabelle Le Mercier^{1,2,3,4}, Thomas Bachelot^{1,6}, Isabelle Ray-Coquard⁶, Alain Puisieux^{1,2,3,4}, Christine Ménétrier-Caux^{1,2,3,4}, Jean-Yves Blay^{1,2,3,4}, Christophe Caux^{1,2,3,4}, and Nathalie Bendriss-Vermare^{1,2,3,4}.

ABSTRACT

We previously reported that infiltration of primary breast tumors with plasmacytoid dendritic cells (pDC) correlates with patients' poor prognosis. Here we elucidate mechanisms beyond this clinical observation. We first document a preferential pDC recruitment within breast tumors as illustrated by i) a high frequency of pDC infiltrating breast tumors, ii) a deficiency of circulating pDC in patients and iii) a unique homing receptor pattern. Compared to patients' blood and healthy pDC, Tumor-Associated pDC (TApDC) exhibit a partially activated phenotype reflecting local *in situ* activation and have similar capacity to undergo maturation and to activate T cells. But of most importance, TApDC produce decreased amounts of IFN- α following activation. This alteration is specific to the tumor microenvironment as patients' blood pDC secrete normal IFN- α levels. Furthermore, breast tumor environment specifically inhibits IFN- α , IFN- β , and TNF- α but not IP-10/CXCL10 nor MIP1- α /CCL3 production by activated healthy pDC. This inhibition is preferentially observed in response to TLR9 activation while response to synthetic TLR7 ligands are not impaired. We finally demonstrate that tumor-derived TGF- β s and TNF- α are critical mediators contributing to functional alteration of pDC and detect Smad phosphorylation in TApDC *in situ* further confirming TGF- β signaling involvement in pDC dysfunction.

INTRODUCTION

Cancer immunosubversion is a process whereby, tumor cells evade the immune system through a variety of escape mechanisms. Among them the functional alteration of tumor-infiltrating dendritic cells (DC), that play a critical role in anti-tumor immunity, has been suggested to preferentially induce tumor tolerance (Zitvogel et al., 2006).

Several studies have shown that the immune system is functional against breast tumors and may promote both humoral and cellular responses (Bell et al., 1999; Ben Hur et al., 2002; Disis and Cheever, 1997; Lenner et al., 1999; Sapino et al., 2001). In addition, different DC subpopulations infiltrate breast tumors, such as immature and mature myeloid DC (mDC), the

latter being confined to the periphery of the tumor (Bell et al., 1999; Thomachot et al., 2004; Treilleux et al., 2004). We recently demonstrated that human plasmacytoid DC (pDC) also infiltrate primary breast carcinomas and that their presence correlates with an adverse clinical outcome (Treilleux et al., 2004). These results show that the presence of immune actors including DC in breast tumors is unable to counteract tumor growth and may even contribute to its progression.

pDC represent key effector cells at the interface of innate and adaptive immunity by their ability to produce high levels of type I Interferons (IFN- $\alpha/\beta/\omega$) after exposure to various DNA or RNA viruses, recognized by Toll Like Receptors (TLR) 9 and TLR7 respectively (Liu, 2005). Beside their antiviral properties, type I IFNs produced by pDC can activate a variety of immune cells such as B cells, Natural Killer (NK) cells, and macrophages (Liu, 2005). In addition to their secretion of type I IFNs, virus-activated pDC differentiate into mature pDC capable of efficient antigen (Ag) presentation (Villadangos and Young, 2008) and cross-presentation (Hoeffel et al., 2007) directing T cell responses with considerable flexibility (Liu, 2005). Consistent with their Ag presentation capacity, pDC were recently shown to mediate tolerance to alloAg in cardiac allograft (Ochando et al., 2006), oral Ag (Goubier et al., 2008), and airway allergens (de Heer et al., 2004). Several lines of evidences suggest that pDC are also involved in tumor immunity, as underlined by their identification in several human and murine cancers, including melanoma (Munn et al., 2004; Vermi et al., 2003) as well as cervical (Bontkes et al., 2005), head and neck (Hartmann et al., 2003), lung (Perrot et al., 2007), ovarian (Zou et al., 2001), breast (Treilleux et al., 2004), and thyroid (Tsuge et al., 2005) cancers . Although present in various tumor types, the function of tumor-associated pDC (TApDC) has rarely been studied and little is known about their role in tumor immunity (Kim et al., 2007). In metastatic ovarian cancer, pDC from ascitis were described to favor tumor progression either directly (Curiel et al., 2004) or indirectly through the induction of suppressive T cells (Wei et al., 2005). Moreover, in lung and head and neck cancers, TApDC were reported to be impaired in their type I IFNs production and blocked in an immature state (Hartmann et al., 2003; Perrot et al., 2007). However, recent reports showed that TApDC can also be used as potential therapeutic target. Indeed, a treatment of basal cell carcinoma, T cell lymphoma, and melanoma patients with topical Imiquimod, a synthetic TLR7 ligand, results in pDC recruitment, type I IFNs production, and activation within tumors that correlates to local immune reaction and destruction of tumor lesions (Palamara et al., 2004; Stary et al., 2007; Urosevic et al., 2005).

The effect of the tumor microenvironment on tumor-infiltrating Ag presenting cells has been studied mainly on mDC. It appears that several tumor-derived factors such as Interleukin (IL)-10, IL-6, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Transforming Growth Factor (TGF)- β , and Prostaglandin E (PGE)-2 (Gabrilovich, 2004) are able to impair DC differentiation, maturation, and functions. In this context we previously described the alteration of DC differentiation and functions by cytokines produced by renal (Menetrier-Caux et al., 1998) and breast carcinomas (Thomachot et al., 2004). We showed as well that mice TADC were refractory to maturation signals even after isolation from the tumor microenvironment (Vicari et al., 2002). However scarce information is available regarding mechanisms potentially leading to pDC alteration in the tumor environment.

In an effort to understand the negative impact of TApDC on breast tumor patient prognosis, we investigated herein, their frequency, functional status, and interaction with breast tumor environment. We observed that i) pDC highly infiltrate breast tumors, ii) TApDC exhibit a slightly activated phenotype, and iii) are strongly inhibited for their production of IFN- α in response to TLR ligands *in vitro* while their capacity to activate CD4⁺ T cell is unaffected. To get further insights into mechanisms involved in pDC alteration by breast tumors, healthy blood or tonsil pDC were cultured in presence of primary breast tumor-derived conditioned media. Tumor-instructed pDC were shown to retain their ability to prime naive CD4⁺ T cells secreting high levels of IL-10, but were strongly inhibited in their ability to produce type I IFNs preferentially after TLR9 stimulation, while responses to synthetic TLR7 ligands were unaffected by the breast tumor environment. Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and active TGF- β s present in the breast tumor environment were the two major factors responsible of this pDC functional alteration. Finally, TGF- β from the tumor environment resulted in Smad phosphorylation in TApDC further confirming the involvement of the TGF- β signaling pathway in the inhibition of type I IFNs production by pDC. All together, our results demonstrate that the breast tumor microenvironment subverts innate functions of pDC that may thus contribute to tumor tolerance.

RESULTS

pDC highly infiltrate human primary breast tumors

Similarly to tonsil and blood, flow cytometry analyses of primary and metastatic breast tumors specimens and of peripheral blood from breast cancer patients, revealed two distinct populations with the typical characteristics of pDC (lineage⁻, CD4⁺, CD11c⁻) and mDC (lineage⁻, CD4⁺, CD11c⁻) (**Fig. S1 A**). The identity of pDC and mDC was further confirmed by analyzing BDCA2 and BDCA1 expression on Lin⁻ CD4⁺ CD11c⁻ and CD11c⁺ cells respectively (**Fig. S1 A**). On the basis of these results performed for three distinct donors, all the subsequent analyses of pDC and mDC percentages in biological samples were performed with three-color stainings using lineage, CD4, and CD11c. Flow cytometry analysis revealed the presence of both pDC and mDC in peripheral blood and in tumors from patients with breast cancer. The analysis of the DC subpopulations frequency in primary tumors (pDC: mean: 0.14%, \pm 0.19%, mDC: mean: 0.06%, \pm 0.09%, $p < 10^{-4}$; n=55), as well as in metastatic fluids (pDC: mean: 0.59%, \pm 0.68 mDC: mean: 0.16%, \pm 0.30, $p < 10^{-4}$; n=47), revealed that pDC were predominant compared to mDC (**Fig. 1 A**). Furthermore, in breast cancer patient-associated blood, pDC were detected at lower level than in control healthy subjects (patients' blood mean: 0.26%, \pm 0.22, n=50, healthy donor blood mean: 0.37 \pm 0.18, n=48 $p=0.006$), whereas the frequency of mDC was not significantly different (**Fig. 1 B**), suggesting a preferential pDC recruitment, within the tumor mass.

TApDC are endowed with a specific homing receptor pattern allowing their recruitment within lymphoid aggregates in breast tumor tissue

To understand this preferential pDC recruitment, we next analyzed the expression of homing receptors on TApDC, matched peripheral blood pDC, and tonsil pDC, by flow cytometry performed on total cells after gating on CD4⁺ CD123⁺ cells. The identity of pDC was confirmed by analyzing BDCA2 and BDCA4 expression on CD4⁺ CD123⁺ cells (**Fig. S1 B**). Interestingly, expression of chemokine receptor CXCR3 remains stable among pDC of different origins, while the expression of CXCR4, the latter being proposed to mediate pDC recruitment in ovarian cancer (Zou et al., 2001) was found even at higher intensity on TApDC compared to paired patients' blood pDC ($p=0.0015$) (**Fig. 2, A and B**). In contrast, CD62L and CCR7, previously proposed to mediate pDC homing into lymphoid organs (Cella et al., 1999), were strongly reduced on both TApDC and tonsil pDC, compared to patient blood pDC ($p=0.014$ for CCR7 and $p=0.002$ for CD62L) (**Fig. 2, A and B**). This CCR7 and CD62L

downregulation suggests the involvement of those receptors in pDC recruitment from patients' blood into breast tumors as it is observed in lymphoid organs. Since CCR7 was also shown to mediate pDC trafficking into T cell areas of lymphoid organs expressing high levels of its ligands (Luther et al., 2000), we next analyzed TApDC localization in breast tumors. Immunohistochemical staining showed that BDCA2⁺ pDC are mostly found within lymphoid aggregates (42% of tumors analyzed, n=20) in close contact with CD3⁺ T cells (**Fig. 2 C-a**) but few of them are also intimately contacting epithelial cytokeratin⁺ cells (14% of tumors analyzed, n=20) (**Fig. 2 C-b**). Altogether these observations suggest that both TApDC and tonsil pDC express a specific homing receptor pattern consistent with their preferential localization within T cell areas in both tumor and lymphoid organs.

TApDC display a partially activated phenotype and, in response to TLR ligands, differentiate into mature pDC endowed with T cell stimulatory capacity

We then compared the phenotype of TApDC to that of matched peripheral blood pDC after gating on CD4⁺ CD123⁺ cells. TApDC expressed modestly but significantly higher levels of activation markers (**Fig. 3, A and B**) such as CD40, CD83, CD86, and HLA-DR (p=0.0009, p=0.027, p=0.034, and p=0.0046, respectively). This correlates with a reduced expression of BDCA2 (p=0.0022) characteristic marker of resting pDC (Dzionek et al., 2000). TApDC appeared to exhibit a partially activated phenotype, specific to the tumor environment as it was not observed for pDC present in inflamed tonsils (**Fig. 3 A**).

Highly purified pDC (>98%) isolated by cell sorting from primary tumors, were further analyzed for their ability to respond to various TLR ligands in vitro. After 48 h activation with IL-3 and TLR7 (inactivated influenza (flu) virus and R848) or TLR9 ligands (CpG-A/ODN2336 and CpG-B/ODN10104), pDC isolated from primary tumors acquired a fully mature phenotype expressing higher levels of CD86, CD40, CD80, and CD83 than pDC isolated from tonsils (**Fig. 4 A** and data not shown). Consistent with their acquisition of a fully mature phenotype, TLR7- or 9-stimulated TApDC were able to induce higher naive CD4⁺ T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction than activated tonsil-isolated pDC (**Fig. 4 B**), suggesting that TApDC were not blocked in an immature state and retain their ability to activate T cell responses. Moreover, their colocalization with CD3⁺ T cells in lymphoid aggregates of breast tumors (**Fig. 2 C**) suggests that contrary to head and neck (Hartmann et al., 2003) and lung cancers (Perrot et al., 2007), breast TApDC retain their ability to activate T cell responses within the tumor bed.

Breast TApDC produce limited amounts of IFN- α in response to TLR ligands

pDC are known to be the most potent type I IFNs producing cells in response to TLR7 or 9 ligands (Liu, 2005). IFN- α production by highly purified TApDC (> 98%) was strongly reduced in response to inactivated flu virus and CpG-A compared to healthy tonsil pDC ($p=0.0009$ and $p=0.0005$ respectively) (**Fig. 5 A**). Of note IL-3, CpG-B or R848 triggered hardly any IFN- α production by any pDC populations (**Fig. 5 A** and data not shown). Interestingly, patient blood pDC produced similar levels of IFN- α than pDC from healthy blood donors in response to TLR activation (**Fig. 5 B**). These results indicate that the capacity of pDC to produce IFN- α is specifically altered at the tumor site. Moreover, this inhibition is specific for IFN- α as the production of the inflammatory chemokine IFN inducible Protein (IP)-10/CXCL10 remained unaffected after TApDC activation (**Fig. 5 A**).

Breast tumor-derived supernatants suppress innate immune functions of pDC without altering their T cell activation capacity

The weak IFN- α response of TApDC suggested that breast tumor environment actively suppress the ability of pDC to produce IFN- α . To get further insights into the mechanisms involved in this inhibition, supernatants were derived from cell cultures of single-cell suspensions of primary breast tumors and different breast cancer cell lines. pDCs isolated from peripheral blood and tonsil of healthy donors were first primed during 16 h in presence of IL-3 and these tumor-derived supernatants and then stimulated during 24 h with inactivated flu virus or CpG-A. Most of supernatants derived from primary breast tumors ($n = 25$ out of 33) (**Fig. 6**), significantly inhibited pDC IFN- α production in response to flu virus (mean % of inhibition: 60.6%, $\pm 14\%$, $p<0.05$) and CpG-A (mean % of inhibition: 75% $\pm 18.6\%$, $p<0.05$), in a dose-dependent manner (**Fig. S2 A**). In contrast supernatants derived from breast tumor cell lines did not significantly affect IFN- α production by healthy activated pDC (**Fig. S2 B**). Importantly, breast tumor-derived supernatants did not affect pDC viability demonstrating that the negative effect of tumor-derived supernatant on IFN- α production by pDC is not mediated through the induction of cell death. Moreover, while IFN- β and TNF- α production by healthy pDC were also significantly inhibited by breast tumor-derived supernatants (mean % of inhibition: 57.2%, $\pm 23.6\%$, $p<0.05$ and 67.4%, $\pm 16.5\%$, $p<0.05$, respectively), IP-10/CXCL10 and Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α /CCL3 production levels remained unaffected (**Fig. 6**). Altogether these results suggest that soluble factors present within the tumor environment contributed to the functional inhibition of TLR-

activated pDC through specific interference with signaling pathways leading to type I IFNs and TNF- α production.

We next analyzed whether tumor supernatants compromised pDC ability to stimulate CD4⁺ T cell responses. Tonsil and blood purified pDC (>98%) primed in breast tumor-derived supernatants (IL-3: **Fig. S3** or flu virus: not shown) maintained a strong capacity to induce allogeneic naive CD4⁺ T cell proliferation and most importantly direct those T cells to produce high amounts of IFN- γ (mean concentration: 13.6 ng/ml \pm 3.8 ng/ml) and immunosuppressive IL-10 (mean concentration: 5.3 ng/ml \pm 1.9 ng/ml) (**Fig. S3 B**). Conversely, very low amounts of IL-4 (mean concentration: 13.3 pg/ml \pm 4 pg/ml) and IL-13 (mean concentration: 104 pg/ml \pm 40 pg/ml) were found (**Fig. S3 B**). The induction of high level of IL-10 was confirmed using ex vivo purified TApDC (not shown). We did not observe any effect of breast tumor-derived supernatants on the capacity of pDC (IL-3 or flu virus) to induce naive CD4⁺ T cell differentiation into FoxP3⁺ regulatory T cells (Treg) (data not shown). Thus, breast cancer-instructed pDC retain their ability to prime naive CD4⁺ T cells producing high levels of IFN- γ and IL-10.

TGF- β and TNF- α are involved in the inhibition of pDC innate immune functions by the breast tumor environment

We observed that breast tumor-derived supernatants contained several well-known negative regulators of immune responses, including active TGF- β 1 (range 28.01-235 pg/ml, mean: 70.60 pg/ml), active TGF- β 2 (range 22.2-124 pg/ml, mean: 47 pg/ml), TNF- α (range 0-2,276 pg/ml, mean: 369.1 pg/ml), and IL-10 (range 0-1,000 pg/ml, mean: 267.2 pg/ml) (**Fig. S4**).

We further investigated the effect of these immunoregulatory factors on healthy pDC innate functions. We observed that 16 h priming of healthy donor pDC with recombinant TGF- β 1, TNF- α , and IL-10 could inhibit the secretion of IFN- α (mean % of inhibition: 84.3% \pm 3.8%, $p < 0.05$, 33.7% \pm 6.9%, $p < 0.05$ and 72.4% \pm 3.8%, $p < 0.05$ respectively), IFN- β (mean % of inhibition: 52.9% \pm 5.8%, $p < 0.05$, 36.2% \pm 8.6%, $p < 0.05$ and 70.1% \pm 5.1%, $p < 0.05$ respectively), and TNF- α (mean % of inhibition: 83.7% \pm 7.7%, $p < 0.05$ and 94.6% \pm 1.5%, $p < 0.05$ respectively) in response to flu virus-activated pDC (**Fig. 7 A**), and in a dose-dependent manner (**Fig. S5**). In contrast, other factors known to affect mDC development and function such as Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), M-CSF, IL-6, and VEGF did not affect IFN- α production by activated healthy pDC (data not shown). In addition, IL-10 but not TGF- β nor TNF- α strongly inhibited the production of IP-10/CXCL10

(mean % of inhibition: $47.4\% \pm 2.4\%$, $p < 0.05$) and MIP-1 α /CCL3 (mean % of inhibition: $69.5\% \pm 12.9\%$, $p < 0.05$) (**Fig. 7 A** and **Fig. S5 A**). Since we previously showed that breast tumor-derived supernatants did not impair IP-10/CXCL10 and MIP-1 α /CCL3 production by activated pDC, this result indicated that IL-10 might not be involved in the functional alteration of pDC by the breast tumor-derived supernatants.

In order to assess the role of TNF- α , TGF- β s, and IL-10 in pDC alteration by the tumor environment, we blocked these molecules in breast tumor-derived supernatants using blocking antibodies (Ab) and specific inhibitors of the TGF- β signaling. The functionality of blocking Ab and TGF- β antagonists was first validated by reversing the inhibitory effect of exogenous TNF- α , TGF- β s, and IL-10, on IFN- α production by activated pDC (**Fig. S6 A**) and next assessed on breast tumor-derived supernatants. While no significant effect of blocking IL-10 was observed, blocking TNF- α or TGF- β s independently induced a partial reversion of breast tumor-derived supernatants inhibitory effect on IFN- α production ($p = 0.028$ and $p = 0.028$ respectively, $n = 15$ breast tumor-derived supernatants) (**Fig. 7 B**). Of most importance, breast tumor-mediated suppression of IFN- α secretion by pDC was totally reversed when TGF- β and TNF- α were simultaneously blocked by neutralizing Ab (panTGF- β and anti-TNF- α) or by combining anti-TNF- α neutralizing Ab with specific inhibitors of the TGF- β signaling pathway (T β RIKiII) ($p = 0.026$ and $n = 15$ different breast tumor derived supernatants) (**Fig. 7 B** and **Fig. S6 B**).

Altogether these observations demonstrate that the inhibitory effect of the breast tumor environment on pDC innate functions is mainly mediated through TGF- β s and TNF- α cooperation, as confirmed by the synergistic effect of recombinant TGF- β and TNF- α in inhibiting IFN- α production by activated pDC (**Fig. S7**).

Breast tumor-derived supernatants and TGF- β preferentially alters pDCs' TLR9 responsiveness

We previously demonstrated that breast tumor-derived supernatants through TGF- β and TNF- α alter pDC ability to produce type I IFNs in response to TLR activation. Interestingly we observed that this specific impairment of pDC innate functions by breast tumor-derived supernatants and TGF- β was more severe after CpG-A stimulation (mean % of inhibition: 75% for breast tumor supernatants and 78.1% for 1ng/ml of TGF- β) when compared to flu virus stimulation (mean % of inhibition: 60.6% for breast tumor supernatants and 58.8 % for

0.1 ng/ml of TGF- β) (p=0.011 and p=0.009) (**Fig. 8**). Furthermore, healthy pDC primed in breast tumor-derived supernatants or TGF- β were unaffected for their ability to produce IFN- α in response to R848, a synthetic TLR7 ligand, suggesting a preferential impairment of the TLR9, compared to TLR7 signaling, in healthy pDC by the breast tumor-derived TGF- β .

TGF- β signaling pathway is activated in breast TApDC

In order to get further insights about mechanisms involved in TGF- β -mediated pDC dysfunction we analyzed TGF- β signaling in human pDCs. TGF- β signals through its receptors T β RI and T β RII that mainly induce phosphorylation of Smad2 and Smad3 proteins leading to their association with Smad4, and translocation of the complex into the nucleus to control the expression of TGF- β -regulated genes (Li et al., 2006). This has been demonstrated in various cell types and here we observed for the first time, by western blot analysis, Smad2 phosphorylation in healthy human pDC after treatment with exogenous TGF- β *in vitro* (**Fig. 9 A**). Moreover, we were able to show *in situ* the expression of phosphorylated Smad2 in the nuclei of BDCA2⁺ pDC present within the breast tumor environment by immunofluorescence (71.4% of BDCA2⁺ cells are phosphoSmad2⁺, n=3 independent tumors) (**Fig. 9 B**). Those data demonstrate for the first time that tumor-derived TGF- β activates the Smad signaling pathway in human pDC which may contribute to the inhibition of their ability to secrete high amounts of type I IFNs in breast tumors.

DISCUSSION

The negative prognostic value of pDC infiltration in human breast tumors (Treilleux et al., 2004) prompted us to examine the role of this DC subset in breast cancer immunobiology. Our results demonstrate that breast tumor environment, through TGF- β and TNF- α , strongly alters pDC innate functions especially their ability to produce type I IFNs, preferentially in response to TLR9 ligands, and without affecting their ability to activate adaptive immunity. First, we observed that pDC infiltration of breast tumors was associated to a decreased pDC frequency in the blood from the same patient, suggesting the recruitment of these cells to the tumor site. Indeed, a reduced expression of CD62L and CCR7 on TApDC and tonsil pDC suggests a role for those molecules in pDC entry into breast tumors, as it is described for trafficking into inflamed lymph nodes (Cella et al., 1999). The presence of high levels of MIP-3 β /CCL19 in tumors (Treilleux et al., 2004), the accumulation of TApDC within

lymphoid aggregates in breast tumor tissue, together with the described CCR7 internalisation after engagement by MIP-3 β /CCL19 (Bardi et al., 2001), strongly support this hypothesis. Work from others proposes that ovarian carcinoma attracts pDC *via* the SDF-1/CXCL12 chemokine (Zou et al., 2001). However in breast tumor, this mechanism was excluded since i) SDF-1/CXCL12 induced *in vitro* CXCR4 downregulation on pDC surface (data not shown) while TApDC express high levels of CXCR4 and ii) identical SDF-1/CXCL12 levels in sera and ascitis from breast cancer patients was observed (data not shown).

The partially activated phenotype of TApDC might be due to endogenous danger signals such as self RNA or DNA and nucleotides (ATP, ADP, UDP...) (Shi et al., 2003) from dying tumor cells leading to pDC activation through either TLR7 and 9, as described in psoriasis (Lande et al., 2007), or G protein-coupled P2Y receptors (Shin et al., 2008), respectively.

TApDC were able to acquire a fully mature phenotype in response to TLR7 and 9 ligands, and induce a potent CD4⁺ T cell proliferation, demonstrating that they are not impaired in inducing adaptive immune responses. Our observations differ from lung cancer where TApDC were poorly sensitive to maturation signals and modest inducers of T cell proliferation (Perrot et al., 2007). We also found that breast tumor supernatants-instructed healthy pDC maintained their capacity to induce naive CD4⁺ T cell proliferation and their production of high amounts of IFN- γ and IL-10. These observations are consistent with work of others showing that pDC were able, through Inducible Costimulator Ligand (ICOS-L), to induce IL-10 producing suppressive T cells (Ito et al., 2007). Furthermore we previously reported that breast tumors are highly infiltrated with FoxP3⁺ Treg expressing high ICOS levels (Gobert et al., 2009), suggesting that ICOS/ICOS-L interaction may occur between Tregs and pDC in breast tumors, contributing to the local immunosuppressive network. Finally, pDC were recently shown to mediate tolerance to oral Ag by inducing CD4⁺ and CD8⁺ T cell anergy or deletion (Goubier et al., 2008). While breast TApDC maintained their capacity to prime CD4⁺ T cells, their effect on CD8⁺ T cell will need further investigation in order to assess whether they could suppress CD8⁺ T cells or induce their differentiation into suppressive IL-10 producing cells as demonstrated in ovarian cancer (Wei et al., 2005).

While their capacities to induce adaptive immune responses were unaffected, TApDC were strongly inhibited for their production of IFN- α upon TLR stimulation *in vitro*. Moreover, breast tumor-derived supernatants blocked IFN- α and IFN- β production by healthy activated pDC *in vitro*. These observations are in agreement with a previous study showing an altered type I IFNs production by TApDC in head and neck cancer (Hartmann et al., 2003) but in

disagreement with ovarian metastatic cancer where recruited pDC were functional (Zou et al., 2001). Inhibition of IFN- α production by TApDC might confer a selective advantage for breast tumors, since IFN- α has direct anti-tumor activities, inhibiting both tumor cell proliferation and neoangiogenesis (Brassard et al., 2002), but also promoting immunosurveillance through the activation of B cells, NK cells, and macrophages (Smyth, 2005). In addition, we observed that TNF- α production was also inhibited by breast tumor-derived supernatants, whereas other cytokines such as IP-10/CXCL10, IL-8/CXCL8, and MIP-1 α /CCL3 were not affected. The effect of normal breast-derived supernatants on pDC functions could not be assessed since normal breast samples are mostly composed of adipose tissue rich in immunomodulating lipids which interfere with DC functions (Son et al., 2006; Thurnher, 2007). However several breast tumor-derived supernatants (8 out of 33) were not inhibiting type I IFN production by pDC providing good internal negative controls.

Of most significance, we demonstrate for the first time, in humans, that the alteration of pDC ability to produce IFN- α was mainly mediated through tumor-derived TGF- β and TNF- α . TNF- α might be an endogenous negative regulator of type I IFN production by TApDC. Indeed consistent with previous report showing that TNF- α inhibits type I IFNs production by inducing pDC maturation (Palucka et al., 2005), we observed that breast tumor-derived supernatants enhance pDC maturation (data not shown) potentially through TNF- α thus contributing to pDC dysfunction. The inhibitory role of TGF- β is in agreement with recent reports in mice showing that payer patches and splenic stromal environment, through TGF- β , inhibited pDC capacity to produce high amounts of IFN- α in response to TLR activation (Contractor et al., 2007; Li et al., 2008). Importantly, we observed that pDC present within the breast tumor environment express an activated/phosphorylated form of the Smad2 protein in their nucleus, suggesting an activation of the Smad signaling pathway by local TGF- β , as it has been observed previously in mice splenic environment (Li et al., 2008). While TGF- β origin is unknown, we can easily speculate that the main source of TGF- β in the breast tumor environment are the immune cells (Li et al., 2006) and/or also stromal cells (fibroblast and mesenchymal stem cells) (Kang et al., 2008) since breast cancer cell lines supernatants did not block pDC functions. Other factors belonging to the TGF- β superfamily such as activins (Razanajaona et al., 2007; Robson et al., 2008) produced in the tumor environment may also affect pDC innate functions. Altogether these observations indicate that TApDC are exposed *in situ* to TGF- β family members that contribute to their impaired innate immune response.

Mechanisms explaining the selective pDC inhibition for definite cytokines in breast tumors through TGF- β in response to TLR9 but not to synthetic TLR7 ligands remain to be explored. We excluded: i) a general down-regulation of TLR7 or 9 expression by the breast tumor environment (as illustrated by the quantitative RT-PCR in Fig. S8), ii) a transcriptional repression of IFN- α and TNF- α genes by Smad proteins (as illustrated by the lack of Smad Binding Elements in IFN- α and TNF- α promoters and the preferential impairment of pDCs' TLR9 responsiveness in human and mouse models (Le Mercier et al, in preparation)), iii) an interference with IRF-7 activation through shared signaling pathway (PI(3)K/mTOR (Cao et al., 2008; Guiducci et al., 2008) and p38 MAPK (Takauji et al., 2002)) between TLR and TGF- β (underlined by a preferential impairment of pDCs' TLR9 responsiveness), and iv) NF κ B dysregulation critically involved in TNF- α secretion (because of the absence of inhibition of pDC maturation and production of other NF κ b-induced cytokines such as MIP-1 α /CCL3 and IL-8/CXCL8).

In contrast, the TLR9 specificity for type I IFNs production relies on the spatiotemporal regulation of the IRF-7 signaling (Honda et al., 2005) and TLR9 cleavage (Ewald et al., 2008). Thus, breast tumor environment through TGF- β could modulate specifically these two steps of TLR9 signaling explaining dysfunction of pDCs' TLR9 responsiveness induced by breast tumor environment. Finally, in agreement with our observation, IP-10/CXCL10 production by pDC was shown to be independent on type I IFNs but dependent on STAT-1-mediated TLR activation (Di Domizio et al., 2009). This pathway seems unaffected by the breast tumor environment as pDCs' IP-10/CXCL-10 production was not altered by breast tumor environment.

In conclusion we demonstrated an innate immune dysfunction of TApDC that might contribute to breast tumor tolerance by i) preventing type I IFNs and TNF- α direct anti-tumor effects and also anti-tumor immune responses through the activation of B cells, NK cells and macrophages and ii) taking advantage of the role of pDC in tolerance induction through IL-10 producing suppressive CD4⁺ T cells (Ito et al., 2007), Tregs (de Heer et al., 2004; Ochando et al., 2006) and CD8 anergy or deletion (Goubier et al., 2008). It was recently shown that treatment of basal cell carcinoma, T cell lymphoma, and melanoma patients with imiquimod, a TLR7 ligand, resulted in IFN- α production by TApDC that correlates to local immune reaction and destruction of tumor lesions (Palamara et al., 2004; Stary et al., 2007; Urosevic et al., 2005). Thus restoring pDC innate function with TGF- β synthetic antagonists combined to TLR7/9 activation might represent a therapeutic strategy for localized breast tumor.

PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS

Patients, human tissue samples, and blood

Fresh tumor samples from patients diagnosed with breast carcinoma were obtained from the Centre Léon Bérard tissue bank after patient informed consent and histological confirmation of diagnosis. No patient had received chemotherapy or radiation therapy before surgery. The study was approved by the local ethics committee. When possible, blood samples from breast cancer patients were collected on CTAD (Citrate, Theophylline, Adenosine, and Dipyridamole) anticoagulant and processed as described below for healthy donors. Breast cancer effusions (ascitis or pleural effusions) were obtained from patients with confirmed diagnosis of metastatic breast carcinoma. Discarded human tonsil material was obtained anonymously according to the institutional regulations in compliance with French law. Healthy human blood obtained anonymously from the “Etablissement Français du Sang” (Lyon, France) after donor informed consent was collected in sterile bags containing CTAD.

Preparation of of tumor tissue, tonsils, and blood cell suspensions

Breast tumor samples or tonsils were minced into small pieces in serum free RPMI medium and digested with collagenase Ia (1 µg/ml) and DNase I (50 KU/ml) (Sigma Aldrich) for 1 h at 37°C with gentle agitation. The resulting cell suspensions were filtered, washed, and resuspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (Lonza) and antibiotics (Complete RPMI) for further analyses. Mononuclear cells from peripheral blood, tonsils, primary tumors, and metastatic effusions cell suspensions were obtained by Pancoll density gradient centrifugation (Dominique Dutscher) for 20 min at 1800 rpm.

Preparation of breast tumor-derived supernatants

Single-cell suspensions from primary breast tumors were incubated at a final concentration of 1.5×10^6 cells/ml in complete RPMI medium in petri dishes. The breast tumor cell lines BT-20, CAMA-1, MCF-7, SAV, SKBR-3, T47D (American Type Culture Collection) were cultured in complete RPMI medium at a final concentration of 1.5×10^6 cell/ml in petri dishes. Culture supernatants were collected after 48h, filtrated on 0.22 µm, and frozen.

pDC purification from blood, tonsils, and tumor samples

Human pDC were purified from lineage-negative enriched mononuclear cells from patients' primary tumors, peripheral blood or tonsil using either the BDCA4 cell isolation kit (Miltenyi Biotec) according to the supplier's instructions or FACS[®]-sorting (FACSVantage SE[™] DiVa flow cytometer, BD Biosciences) as Lineage⁻ CD4⁺ CD11c⁻ cells using FITC anti-CD3, CD14 (Purchased from Beckman Coulter), CD16, CD20, CD56 (Purchased from BD Biosciences) and CD19 (Dako), for lineage markers, PE anti-CD11c (BD Biosciences), and PE-Cy5 anti-CD4 (Beckman Coulter) antibodies. Purity was routinely >98% (n=18 for healthy donor blood and tonsil, n=16 for tumors)

Flow cytometry analysis

Three-color staining was performed by flow cytometry on a FACScan (BD Biosciences) using isotype-matched controls or monoclonal antibodies. pDC were identified as CD4⁺ CD123⁺ cells using FITC or PE anti-CD123 (BD Biosciences) and PE-Cy5 anti-CD4 (Beckman Coulter). The phenotype of pDC was analyzed with PE-coupled monoclonal antibodies: anti-CXCR3, anti-CXCR4, anti-CD62L, anti-CD86, (purchased from BD Biosciences) anti-CCR7 (R&D Systems), anti-CD40, anti-CD83 (Beckman Coulter), anti-BDCA2 and anti-BDCA4 (Miltenyi Biotec), or FITC-coupled monoclonal antibody anti-HLA-DR (BD Biosciences). At least 200,000 gated

events/condition were analyzed using Cell Quest Pro software (BD-Biosciences) on the total cell population and 5000 gated events/condition on purified cells.

Culture of breast tumor-associated or healthy pDC

Freshly isolated TApDC were cultured at 5×10^5 cells/ml in 96-well flat-bottomed plates in complete RPMI medium for 24 h in the presence of recombinant hIL-3 (Peprotech), formaldehyde-inactivated influenza (Flu) virus (A/Wisconsin/67/05) (generous gift from Aventis Pasteur), CpG-A/ODN 2336 and CpG-B/ODN10104 (Coley Pharma), and R848 (InvivoGen) that were used at 20 ng/ml, 100 HAU/ml, 5 μ g/ml, and 1 μ g/ml respectively. Freshly isolated healthy pDC were cultured as previously mentioned in the presence of hIL-3 with or without recombinant hTGF- β 1 (R&D Systems), hTNF- α (Cetus corporation), hIL-10 (R&D Systems) at different concentrations or breast tumor supernatants supplied at 25% for 16 h before TLR activators were added for another 24 h. Cells and supernatants were harvested after 24 h and 40 h for TApDC and healthy pDC culture respectively to analyze cell surface expression of activation markers and cell viability (by Propidium Iodide exclusion) by flow cytometry and cytokine/chemokine production by ELISA. In blocking experiments, pDC were first incubated for 16 h with hIL-3, breast tumor supernatants (25%), and polyclonal rabbit anti-TGF- β s (R&D Systems), rat IgG1 anti-TNF- α (clone MP9-20A4, Serotec), and rat IgG2a anti-IL-10 (clone JES3-12G8, Serotec) antibodies or isotype controls all used at 10 μ g/ml or TGF β RI kinase inhibitor II (Calbiochem) used at 10^{-6} M before addition of TLR ligands for another 24 h culture period.

Detection of cytokines

The human enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for hIFN- α (Bender MedSystems), hIFN- β (Fujirebio), hTNF- α (Bender MedSystems), hIP-10/CXCL10 (BD Biosciences), hMIP-1 α /CCL3 (R&D Systems), hIL-10 (Bender MedSystems), hIFN- γ (Bender MedSystems), hIL-4 (Bender MedSystems), hIL-13 (Bender MedSystems), and active TGF- β 1 and TGF- β 2 (Promega) were used according to manufacturer's instructions.

DC-T cell co-cultures

Allogeneic naive CD4⁺ T cells were obtained from adult peripheral blood after magnetic depletion using anti-CD8, -CD11b -CD14, -CD19, -CD16, -CD45RO, -CD56, and -glycophorin A/CD235a antibodies followed by anti-IgG beads (Invitrogen). The purity was routinely > 95%. Highly purified TApDC that were preactivated for 24 h with IL3, CpG-B or Flu virus or highly purified healthy pDC that were preincubated for 40 h in IL-3 with or without breast tumor supernatants were added at varying T cell-to-pDC ratios and cocultured for 96 h in triplicate in 96-well round-bottomed plates. Cells were then pulsed with 0.5 μ Ci per well [³H]thymidine (Amersham Biosciences) and harvested 18 h later. The [³H]thymidine incorporation was assessed by liquid scintillation spectroscopy (Betaplate scintillation counter, Perkin Elmer). To assess cytokine secretion by ELISA, T cells were cocultured with breast cancer-instructed pDC at a ratio 1:10, harvested at day 4, washed, and restimulated at 10^5 cells/well in triplicate for 24 h with 50 ng/ml PMA and 2 μ g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich).

Tumor tissue immunohistochemistry and immunofluorescence

Frozen breast tumor sections (5 μ m) were fixed in acetone. For immunohistochemistry, sections were first incubated with mouse IgG1 anti-BDCA2 antibody (clone 104C12, Dendritics, 10 μ g/ml) or isotype control that were revealed with ImmPRESS anti-mouse Ig peroxidase kit (Abcys) according to the suppliers' instructions and DAB as substrate (Dako). The sections were then stained with either mouse IgG2a anti-CD3 (clone HIT3a, BD

Biosciences, 6.5µg/ml) or mouse IgG1 anti-cytokeratine (clone AE1/AE3, Dako, 1/50) antibodies or isotype controls that were revealed with ImmPRESS anti-mouse Ig peroxidase kit and Histogreen as substrate (Abcys).

Immunofluorescent stainings were performed using anti-BDCA2 (clone 104C12, Dendritics, 10µg/ml) and monoclonal rabbit IgG anti-phosphoSmad2 (clone 3108, Cell Signaling, 1µg/ml) antibodies or isotype controls that were respectively revealed by Alexa 488-coupled goat anti-mouse IgG1 (1/400) and Alexa 555-coupled goat anti-rabbit IgG (1/400) antibodies. Nuclei were identified with DAPI. Slides were mounted with the ProLong® gold anti-fade reagent (Invitrogen). Images were acquired using Carl Zeiss confocal system with apotome technology (Zeiss Axioplan2 LSM510 Confocal microscope) at x62 magnification by the Axiovision 4.0v4.6.1.0 program. The percentage of cells co-expressing BDCA2 and phospho-Smad2 was evaluated by calculating the “BDCA2⁺ phospho-Smad2⁺ cells to total BDCA2⁺ cells” ratio after cell counting on three different areas of the tumor sections.

Western Blot analysis

The expression of phosphoSmad2, total Smad2/3, and b-actin proteins was detected using rabbit polyclonal anti-pSmad2 (Cell Signaling Technology), rabbit monoclonal anti-Smad2 (clone 86F7, Cell Signaling Technology), and mouse monoclonal b-actin (clone AC-74, Sigma) antibodies.

Statistical analysis

Data for cytokine production and T cell proliferation are expressed as mean plus or minus SD. Statistical significance was determined by a non parametric Wilcoxon test. Comparison of means of pDC and mDC content in blood (healthy and patients), metastatic (ascitis, pleural effusion) or primary tumors was performed using a Student T test. Percentages or MFI expression of specific markers on pDC from tumor or associated blood were compared using the paired 2-tailed Student T test. Percentages of IFN- α inhibition production by pDC were compared using a non parametric Friedman test for paired samples. Differences were considered significant for P-values less than 0.05 and are indicated as * for p<0.05, ** for p<0.01 and *** for p<0.001.

Online supplemental material.

Fig. S1 depicts the identification of pDC and mDC in blood and tissues and the specificity of pDC and mDC staining in biological samples by flow cytometry. Fig. S2 shows the effect of supernatants derived from primary tumors in dose-response and from breast cancer cell lines on IFN- α production by activated pDC. Fig. S3 depicts the capacity of breast tumor instructed-pDC to prime naive CD4⁺ T cells secreting high levels of IL-10. Fig. S4 shows quantification of IL-10, TNF- α , and active TGF- β s in breast tumor supernatants. Fig. S5 shows inhibition of activated pDCs' IFN- α and TNF- α production by TNF- α , TGF- β 1, and IL-10 in a dose-dependent manner. Fig. S6 depicts the effect of blocking IL-10, TNF- α , and TGF- β s with specific antibodies and chemical inhibitors on IFN- α production by activated pDC. Fig. S7 shows synergistic effects of TNF- α and TGF- β 1 to inhibit pDC IFN- α production in response to TLR activation. Fig. S8 depicts TLR7 or 9 expression in healthy pDC cultured with breast tumor-derived supernatants.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the breast cancer patients who consented to participate in this study and to the medical staff from the CLB who provided us with breast cancer specimens. We thank doctors and colleagues from clinics and hospitals who provide us with blood and tissues

samples. We thank X.N N'Guyen and C. Rigal for early technical contribution. We are also grateful to P. Aimé who provided a great technical support in microscopy and to J Valladeau for the critical reading of the manuscript.

Grant support : This work was supported by institutional grants from Breast Cancer Research Foundation, Association pour la Recherche sur le Cancer grant 4832, Comité départemental de Saône et Loire et du Rhône de la Ligue nationale contre le cancer, and Institut National du Cancer grant INCA ACI-63-04, ACI 2007-2009, and Met-escape INCa 2007. VS is a recipient of a grant from the Région Rhône-Alpes and from Association pour la Recherche sur le Cancer.

The authors have no conflicting financial interest.

REFERENCES

Bardi,G., Lipp,M., Baggiolini,M., and Loetscher,P. (2001). The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3291-3297.

Bell,D., Chomarat,P., Broyles,D., Netto,G., Harb,G.M., Lebecque,S., Valladeau,J., Davoust,J., Palucka,K.A., and Banchereau,J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J. Exp. Med.* *190*, 1417-1426.

Ben Hur,H., Cohen,O., Schneider,D., Gurevich,P., Halperin,R., Bala,U., Mozes,M., and Zusman,I. (2002). The role of lymphocytes and macrophages in human breast tumorigenesis: an immunohistochemical and morphometric study. *Anticancer Res* *22*, 1231-1238.

Bontkes,H.J., Ruizendaal,J.J., Kramer,D., Meijer,C.J., and Hooijberg,E. (2005). Plasmacytoid dendritic cells are present in cervical carcinoma and become activated by human papillomavirus type 16 virus-like particles. *Gynecol. Oncol.* *96*, 897-901.

Brassard,D.L., Grace,M.J., and Bordens,R.W. (2002). Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *J. Leukoc. Biol.* *71*, 565-581.

Cao,W., Manicassamy,S., Tang,H., Kasturi,S.P., Pirani,A., Murthy,N., and Pulendran,B. (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*, 1157-1164.

Cella,M., Jarrossay,D., Facchetti,F., Alebardi,O., Nakajima,H., Lanzavecchia,A., and Colonna,M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* *5*, 919-923.

Contractor,N., Louten,J., Kim,L., Biron,C.A., and Kelsall,B.L. (2007). Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J. Immunol.* *179*, 2690-2694.

Curiel,T.J., Cheng,P., Mottram,P., Alvarez,X., Moons,L., Evdemon-Hogan,M., Wei,S., Zou,L., Kryczek,I., Hoyle,G., Lackner,A., Carmeliet,P., and Zou,W. (2004). Dendritic cell

subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res.* *64*, 5535-5538.

de Heer,H.J., Hammad,H., Soullie,T., Hijdra,D., Vos,N., Willart,M.A., Hoogsteden,H.C., and Lambrecht,B.N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* *200*, 89-98.

Di Domizio,J., Blum,A., Gallagher-Gambarelli,M., Molens,J.P., Chaperot,L., and Plumas,J. (2009). TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. *Blood* *114*, 1794-1802.

Disis,M.L. and Cheever,M.A. (1997). HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. *Adv. Cancer Res.* *71*, 343-371.

Dzionic,A., Fuchs,A., Schmidt,P., Cremer,S., Zysk,M., Miltenyi,S., Buck,D.W., and Schmitz,J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* *165*, 6037-6046.

Ewald,S.E., Lee,B.L., Lau,L., Wickliffe,K.E., Shi,G.P., Chapman,H.A., and Barton,G.M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* *456*, 658-662.

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

Gobert,M., Treilleux,I., Bendriss-Vermare,N., Bachelot,T., Goddard-Leon,S., Arfi,V., Biota,C., Doffin,A.C., Durand,I., Olive,D., Perez,S., Pasqual,N., Faure,C., Ray-Coquard,I., Puisieux,A., Caux,C., Blay,J.Y., and Menetrier-Caux,C. (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*, 2000-2009.

Goubier,A., Dubois,B., Gheit,H., Joubert,G., Villard-Truc,F., Asselin-Paturel,C., Trinchieri,G., and Kaiserlian,D. (2008). Plasmacytoid Dendritic Cells Mediate Oral Tolerance. *Immunity*.

Guiducci,C., Ghirelli,C., Marloie-Provost,M.A., Matray,T., Coffman,R.L., Liu,Y.J., Barrat,F.J., and Soumelis,V. (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*, 315-322.

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

Hoeffel,G., Ripoche,A.C., Matheoud,D., Nascimbeni,M., Escriou,N., Lebon,P., Heshmati,F., Guillet,J.G., Gannage,M., Caillat-Zucman,S., Casartelli,N., Schwartz,O., De la,S.H., Hanau,D., Hosmalin,A., and Maranon,C. (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. *27*, 481-492.

Honda,K., Ohba,Y., Yanai,H., Negishi,H., Mizutani,T., Takaoka,A., Taya,C., and Taniguchi,T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* *434*, 1035-1040.

- Ito,T., Yang,M., Wang,Y.H., Lande,R., Gregorio,J., Perng,O.A., Qin,X.F., Liu,Y.J., and Gilliet,M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* *204*, 105-115.
- Kang,J.W., Kang,K.S., Koo,H.C., Park,J.R., Choi,E.W., and Park,Y.H. (2008). Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* *17*, 681-693.
- Kim,R., Emi,M., Tanabe,K., and Arihiro,K. (2007). Potential functional role of plasmacytoid dendritic cells in cancer immunity. *Immunology* *121*, 149-157.
- Lande,R., Gregorio,J., Facchinetti,V., Chatterjee,B., Wang,Y.H., Homey,B., Cao,W., Wang,Y.H., Su,B., Nestle,F.O., Zal,T., Mellman,I., Schroder,J.M., Liu,Y.J., and Gilliet,M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* *449*, 564-569.
- Lenner,P., Wiklund,F., Emdin,S.O., Arnerlov,C., Eklund,C., Hallmans,G., Zentgraf,H., and Dillner,J. (1999). Serum antibodies against p53 in relation to cancer risk and prognosis in breast cancer: a population-based epidemiological study. *Br. J. Cancer* *79*, 927-932.
- Li,L., Liu,S., Zhang,T., Pan,W., Yang,X., and Cao,X. (2008). Splenic Stromal Microenvironment Negatively Regulates Virus-Activated Plasmacytoid Dendritic Cells through TGF- β . *J. Immunol.* *180*, 2951-2956.
- Li,M.O., Wan,Y.Y., Sanjabi,S., Robertson,A.K., and Flavell,R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 99-146.
- Liu,Y.J. (2005). IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275-306.
- Luther,S.A., Tang,H.L., Hyman,P.L., Farr,A.G., and Cyster,J.G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 12694-12699.
- Menetrier-Caux,C., Montmain,G., Dieu,M.C., Bain,C., Favrot,M.C., Caux,C., and Blay,J.Y. (1998). Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* *92*, 4778-4791.
- Munn,D.H., Sharma,M.D., Hou,D., Baban,B., Lee,J.R., Antonia,S.J., Messina,J.L., Chandler,P., Koni,P.A., and Mellor,A.L. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest* *114*, 280-290.
- Ochando,J.C., Homma,C., Yang,Y., Hidalgo,A., Garin,A., Tacke,F., Angeli,V., Li,Y., Boros,P., Ding,Y., Jessberger,R., Trinchieri,G., Lira,S.A., Randolph,G.J., and Bromberg,J.S. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* *7*, 652-662.
- Palamara,F., Meindl,S., Holcman,M., Luhrs,P., Stingl,G., and Sibilina,M. (2004). Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J. Immunol.* *173*, 3051-3061.

- Palucka,A.K., Blanck,J.P., Bennett,L., Pascual,V., and Banchereau,J. (2005). Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 3372-3377.
- Perrot,I., Blanchard,D., Freymond,N., Isaac,S., Guibert,B., Pacheco,Y., and Lebecque,S. (2007). Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J. Immunol.* *178*, 2763-2769.
- Razanajaona,D., Joguet,S., Ay,A.S., Treilleux,I., Goddard-Leon,S., Bartholin,L., and Rimokh,R. (2007). Silencing of FLRG, an antagonist of activin, inhibits human breast tumor cell growth. *Cancer Res.* *67*, 7223-7229.
- Robson,N.C., Phillips,D.J., McAlpine,T., Shin,A., Svobodova,S., Toy,T., Pillay,V., Kirkpatrick,N., Zanker,D., Wilson,K., Helling,I., Wei,H., Chen,W., Cebon,J., and Maraskovsky,E. (2008). Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood* *111*, 2733-2743.
- Sapino,A., Bongiovanni,M., Cassoni,P., Righi,L., Arisio,R., Deaglio,S., and Malavasi,F. (2001). Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. *J. Pathol.* *194*, 254-261.
- Shi,Y., Evans,J.E., and Rock,K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* *425*, 516-521.
- Shin,A., Toy,T., Rothenfusser,S., Robson,N., Vorac,J., Dauer,M., Stuplich,M., Endres,S., Cebon,J., Maraskovsky,E., and Schnurr,M. (2008). P2Y receptor signaling regulates phenotype and IFN-alpha secretion of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *111*, 3062-3069.
- Smyth,M.J. (2005). Type I interferon and cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* *6*, 646-648.
- Son,Y., Ito,T., Ozaki,Y., Tanijiri,T., Yokoi,T., Nakamura,K., Takebayashi,M., Amakawa,R., and Fukuhara,S. (2006). Prostaglandin E is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells. *Immunology*.
- Stary,G., Bangert,C., Tauber,M., Strohal,R., Kopp,T., and Stingl,G. (2007). Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1441-1451.
- Steel,G.G. and Peckham,M.J. (1979). Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *5*, 85-91.
- Takauji,R., Iho,S., Takatsuka,H., Yamamoto,S., Takahashi,T., Kitagawa,H., Iwasaki,H., Iida,R., Yokochi,T., and Matsuki,T. (2002). CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *J. Leukoc. Biol.* *72*, 1011-1019.
- Thomachot,M.C., Bendriss-Vermare,N., Massacrier,C., Biota,C., Treilleux,I., Goddard,S., Caux,C., Bachelot,T., Blay,J.Y., and Menetrier-Caux,C. (2004). Breast carcinoma cells promote the differentiation of CD34+ progenitors towards 2 different subpopulations of dendritic cells with CD1a(high)CD86(-)Langerin- and CD1a(+)-CD86(+)-Langerin+ phenotypes. *Int. J. Cancer* *110*, 710-720.

- Thurnher,M. (2007). Lipids in dendritic cell biology: messengers, effectors, and antigens. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 154-160.
- Treilleux,I., Blay,J.Y., Bendriss-Vermare,N., Ray-Coquard,I., Bachelot,T., Guastalla,J.P., Bremond,A., Goddard,S., Pin,J.J., Barthelemy-Dubois,C., and Lebecque,S. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *10*, 7466-7474.
- Tsuge,K., Takeda,H., Kawada,S., Maeda,K., and Yamakawa,M. (2005). Characterization of dendritic cells in differentiated thyroid cancer. *J. Pathol.* *205*, 565-576.
- Urosevic,M., Dummer,R., Conrad,C., Beyeler,M., Laine,E., Burg,G., and Gilliet,M. (2005). Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid predendritic cells following imiquimod treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* *97*, 1143-1153.
- Vermi,W., Bonecchi,R., Facchetti,F., Bianchi,D., Sozzani,S., Festa,S., Berenzi,A., Cella,M., and Colonna,M. (2003). Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J. Pathol.* *200*, 255-268.
- Vicari,A.P., Chiodoni,C., Vaure,C., Ait-Yahia,S., Dercamp,C., Matsos,F., Reynard,O., Taverne,C., Merle,P., Colombo,M.P., O'Garra,A., Trinchieri,G., and Caux,C. (2002). Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J. Exp. Med.* *196*, 541-549.
- Villadangos,J.A. and Young,L. (2008). Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* *29*, 352-361.
- Wei,S., Kryczek,I., Zou,L., Daniel,B., Cheng,P., Mottram,P., Curiel,T., Lange,A., and Zou,W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* *65*, 5020-5026.
- Zitvogel,L., Tesniere,A., and Kroemer,G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 715-727.
- Zou,W., Machelon,V., Coulomb-L'Hermin,A., Borvak,J., Nome,F., Isaeva,T., Wei,S., Krzysiek,R., Durand-Gassel,I., Gordon,A., Pustilnik,T., Curiel,D.T., Galanaud,P., Capron,F., Emilie,D., and Curiel,T.J. (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* *7*, 1339-1346.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. pDC and mDC frequency in breast tumors and patients'-associated blood. Single cell suspensions of freshly resected human primary tumors and metastatic fluids from patients with breast cancer and mononuclear cells of blood from breast cancer patients and healthy individuals were prepared. Within Lineage-negative cells, pDC were identified as CD4⁺ CD11c⁻ and mDC as CD4⁺ CD11c⁺ cells (Fig. S1 A). (A) The frequencies of pDC (○) and mDC (△) among total cells of primary tumors (*upper left panel*, n=55) and metastatic fluids (*lower left panel*, n=47) single-cell suspensions are indicated. (B) The frequencies of blood pDC (*upper right panel*) and mDC (*lower right panel*) within PBMC of breast cancer patients (●) (n=54 for pDC and n=50 for mDC) and healthy controls (▲) (n=53 for pDC and n=48 for mDC) are indicated. Each symbol represents a single sample. Mean values are represented by horizontal lines in each series. ***, P < 0.001 and **, P < 0.01; paired Student's *t*-test.

Figure 2. Chemokine receptors expression and localisation of TApDC in breast tumor tissues (A) CXCR3, CXCR4, CCR7 and CD62L expression on pDC from primary tumor and matched patient's blood and tonsil pDC was compared without purification step and was analyzed after gating on CD4⁺ CD123⁺ cells (corresponding to > 98% BDCA2⁺ pDC (Fig. S1 B)). Mouse IgG1 and IgG2a isotype controls were used as negative controls (dotted line). (B) Phenotype of pDC from primary tumor and paired blood was compared for the different patients with breast cancer (n>6 patients). Results are expressed as MFI values and mean values are represented as horizontal lines in each series. Each symbol represents a single sample. *, P < 0.05 and **, P < 0.01; non-parametric Wilcoxon test. (C) Immunohistochemical staining on frozen breast tumor sections using the pDC specific antibody BDCA2 (brown) together with anti-CD3 (green, a) or anti-cytokeratine (green, b) antibody (x10). Magnification in the insert box is x40, horizontal bar correspond to 50 μm and stainings are representative of three independent tumors.

Figure 3. TApDC isolated from human primary breast tumors display a partially activated phenotype. (A) pDC from primary tumors, patient peripheral blood, healthy blood, and tonsils were compared after gating on CD4⁺ CD123⁺ cells (corresponding to > 98% BDCA2⁺ pDCs (Fig. S1 B)) without purification step, for their expression of BDCA2, CD40, CD86 and HLA-DR. Specific isotype controls were used as negative control (dotted line). MFI values of total cells are indicated in each histograms. These results were representative of five independent experiments. (B) Phenotype of pDC from primary tumor and paired blood was compared for different breast cancer patients. Each symbol represents a single sample (n>8 patients) and mean values are represented by horizontal lines in each series. *, P < 0.05, **, P < 0.01, ***, P < 0.001; non-parametric Wilcoxon test.

Figure 4. TApDC acquire a fully mature phenotype and activate naive CD4⁺ T cells in response to TLR ligands. (A) Highly purified pDC from patients' primary breast tumors and from healthy tonsils were cultured with hIL-3 (20 ng/ml), inactivated flu (Influenza) virus (100 HAU/ml), R848 (1 μg/ml), CpG-A (5 μg/ml), or CpG-B (5 μg/ml) for 40 h. Activation of pDC was monitored by analyzing CD86 expression by flow cytometry. Data are representative of five independent experiments and MFI values of total cells are indicated in each histograms. (B) Purified tonsil and tumor-associated pDC were cultured with IL-3 (20 ng/ml), Flu virus (100 HAU/ml), or CpG-B (5 μg/ml) for 24 h and then incubated at graded doses with allogeneic naive CD4⁺ T cells for five days as specified in Material and methods. T

cell proliferation was determined by ^3H thymidine incorporation. Data are expressed as mean \pm SD and are representative of three independent experiments.

Figure 5. Specific inhibition of IFN- α production by TApDC in response to TLR activation. (A) Purified pDC from breast cancer patients' primary tumors and from healthy individuals' tonsil and (B) PBMC from primary breast cancer patients and healthy individuals were cultured with hIL-3 (20 ng/ml), inactivated flu virus (100 HAU/ml), and CpG-A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. IFN- α and IP-10/CXCL10 production was analyzed in cell culture supernatant by specific ELISA. Results were standardized by calculating the production of IFN- α and IP-10/CXCL10 (ng/ml) for 1×10^5 pDC for each sample. Each symbol represents a single sample and mean values are represented by horizontal lines. ***, $P < 0.001$; non-parametric Wilcoxon Test.

Figure 6. Breast tumor environment inhibits type I IFNs and TNF- α production by healthy pDC. (A) Supernatants of single-cell suspensions from primary tumor tissue of breast cancer patients were collected after 48 h and frozen. Purified pDC from healthy blood and tonsil (not shown) donors were cultured with 20 ng/ml hIL-3 either alone or with 25% of breast tumor supernatants derived from fourteen different patients for 16 h before inactivated flu virus (100 HAU/ml) was added for another 24 h. After 40 h, production of IFN- α , IFN- β , TNF- α , IP-10/CXCL10, and MIP-1 α /CCL3 was measured by specific ELISA. Data are expressed as mean \pm SD, by subtracting the quantity of each cytokine detected in breast tumor-derived supernatants alone in the absence of pDC to avoid the contribution of tumor supernatants. Of note only IP-10/CXCL10 and MIP-1 α /CCL3 were detected in few breast tumor-derived supernatants at levels $< 10\%$ of that produced by pDC. Data are representative of more than four independent experiments, representing more than thirty tumor-derived supernatants from individual patients. * $P < 0.05$; non-parametric Wilcoxon test.

Figure 7. Tumor-derived TNF- α and TGF- β mediate inhibition of pDC type I IFNs and TNF- α production in response to TLR activation. (A) Purified pDC from healthy tonsil and blood (not shown) were cultured with 20ng/ml hIL-3 alone or in the presence of TGF- β 1 (0.1 ng/ml), TNF- α (1 ng/ml), and IL-10 (0.5 ng/ml) for 16 h before inactivated flu virus (100 HAU/ml) was added for another 24 h. (B) Purified tonsil and blood (not shown) pDC were cultured with 20ng/ml hIL-3 either alone or with 25% of breast tumor supernatants from four individual patients (n=4 different supernatants shown out of 15 tested) in the presence or absence of isotype control antibodies or anti-IL10, anti-TNF- α , anti-TGF- β blocking antibodies (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 16 h and then stimulated with Inactivated flu virus (100 HAU/ml) for another 24 h. Production of IFN- α , IFN- β , TNF- α , IP-10/CXCL10, and MIP-1 α /CCL3 was measured by specific ELISA. Data are expressed as mean \pm SD and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$; non-parametric Wilcoxon test.

Figure 8. Breast tumor environment and TGF- β preferentially alter pDCs' TLR9 responsiveness. Purified tonsil and blood (not shown) pDC were cultured with 20ng/ml hIL-3 either alone or in combination with various concentrations of breast tumor-derived supernatants and TGF- β 1 for 16 h before inactivated flu virus (100 HAU/ml), CpG-A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and R848 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added for another 24 h. IFN- α production was measured by specific ELISA. Data are represented as percentages of IFN- α responses (100% without tumor derived-supernatants or exogenous TGF- β) and are representative of three independent experiments. *, $P < 0.05$; non parametric Friedman test for paired samples.

Figure 9. The TGF- β signaling pathway is activated in TApDC. (A) Highly purified pDC were cultured in the presence of IL-3 (20 ng/ml) with or without TGF- β (2 ng/ml) during 16 h. After pDC lysis, the expression of phospho-Smad2, total Smad 2/3, and β -actin proteins was analyzed by western-blotting using specific antibodies. Results are representative of 3 independent experiments. (B) pDC were visualized by immunofluorescence using the membrane staining of BDCA2 (Alexa Fluor 488, green). Smad2 activation was visualized with an anti-phosphoSmad 2 antibody (Alexa Fluor 555, red). Control stainings were performed using mouse IgG1 (Alexa Fluor 488, green) and rabbit IgG (Alexa Fluor 555, red) irrelevant antibodies. Nuclei were identified using DAPI (blue). Data are representative of three independent breast tumors and showed 30 BDCA2⁺/Phospho-Smad2⁺ co-expressing pDC out of 42 BDCA2⁺ pDCs (counted on three different areas of tumor sections) indicating that 71.4% of BDCA2⁺ pDC are expressing activated forms of Smad2. White horizontal bars represent 10 μ m.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1: Identification of pDC and mDC in blood, ascitis and tissues. (A) A single-cell suspension of freshly resected tumor, metastatic ascitis, and blood of patients with primary or metastatic breast cancer was prepared. pDC and mDC were identified within Lineage-negative cells as CD4⁺ CD11c⁻ and CD4⁺ CD11c⁺ cells respectively. Numbers indicate the frequency of pDC and mDC (percentage) among total cells of the tumor and ascitis single-cell suspension or PBMC. The identity of pDC and mDC was confirmed by analyzing BDCA2 and BDCA1 expression on Lin- CD4⁺ CD11c⁻ and CD11c⁺ cells respectively. These results are representative of all primary breast tumors (n=55), metastatic fluids (n=47), and blood (n=48 for control subjects and n=50 for cancer patients) tested. (B) For subsequent phenotypic analysis, pDC from patients' primary tumors and blood as well as from healthy individuals' tonsil and blood were identified within total cells as CD4⁺ and CD123⁺ cells which correspond to >98% BDCA2⁺ pDC. Datas are representative of five independent experiments.

Figure S2: Breast cancer cell lines supernatants do not inhibit pDC IFN- α production while patient's primary tumor supernatants do. Supernatants of primary breast tumors and breast cancer cell lines were collected after 48 h and frozen. Purified tonsil and blood (not shown) pDC were cultured with hIL-3 (20ng/ml) either alone or in combination with (A) various concentrations of breast tumor-derived supernatants (n = 18 different donors) or (B) 25% of supernatants derived from six breast cancer cell lines for 16 h before inactivated flu virus (100 HAU/ml) or CpG-A (5 μ g/ml) were added for another 24 h. IFN- α production was measured by specific ELISA. Datas are expressed as mean \pm SD (A) and as mean (B) and are representative of four independent experiments.

Figure S3. Breast tumor instructed-pDC retain their capacity to prime naive CD4⁺ T cells secreting high levels of IL-10. Purified tonsil and blood (not shown) pDC were cultured with hIL-3 (20 ng/ml) either alone or in combination with 25% of breast tumor supernatants for 40 h and then incubated for 5 days with allogeneic naive CD4⁺ T cells at (A) graded doses to assess T cell proliferation by ³H thymidine uptake and (B) a ratio 1:10 to assess IL-10, IL-4, IL-13 and IFN- γ secretion by ELISA after 24 h PMA (50 ng/ml) and ionomycin (2 μ g/ml) restimulation. Data are expressed as mean \pm SD and are representative of four independent experiments.

Figure S4: Breast tumor supernatants contain active TGF- β s, IL-10, and TNF- α . Active TGF- β 1 and TGF- β 2, IL-10, and TNF- α were measured in breast tumor supernatants by

ELISA. Each symbol represents the level of cytokine for a single tumor supernatant. Mean values are represented by horizontal lines in each series.

Figure S5. TGF- β , IL-10, and TNF- α inhibit pDCs' production of type I IFNs and TNF- α upon TLR activation in a dose-dependent manner. Purified tonsil and blood (not shown) pDC were cultured with hIL-3 (20 ng/ml) either alone or in the presence of various concentrations of TGF- β 1, IL-10, and TNF- α , for 16 h. Inactivated flu virus (100 HAU/ml) was then added for another 24 h. Production of IFN- α , IFN- β , TNF- α , IP-10/CXCL10, and MIP-1 α /CCL3 was measured by specific ELISA. Data are expressed as mean \pm SD and are representative of three independent experiments.

Figure S6: Validation of blocking IL-10, TNF- α , and TGF- β s with specific antibodies and chemical inhibitors on IFN- α production by activated pDC. Purified tonsil and blood (not shown) pDC were incubated with hIL-3 (20 ng/ml) either alone or in combination (A) with IL-10 (1 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), and TGF- β 1 (0.1 ng/ml) and in the presence or absence of specific control isotype antibodies or anti-IL-10, anti-TNF- α , anti-TGF- β blocking antibodies (10 μ g/ml) or (B) with 25% of breast tumor supernatant (one shown out of 10 different tested) in the presence or absence of specific control isotype antibodies, anti-TNF- α , and anti-TGF- β (10 μ g/ml) blocking antibodies, or T β RI kinase inhibitor II (10^{-6} M) for 16 h. Flu virus (100 HAU/ml) was then added for another 24 h. IFN- α was measured in the cell supernatant by specific ELISA. Data are expressed as mean \pm SD and are representative of three independent experiments. $P < 0.05$; non-parametric Wilcoxon test.

Figure S7: TNF- α and TGF- β synergistically mediate inhibition of pDC IFN- α production in response to TLR activation. (A) Purified tonsil and blood (not shown) pDC were cultured with hIL-3 (20 ng/ml) either alone or in combination with various concentrations of TGF- β 1 together with or without various concentrations of TNF- α for 16 h before flu virus (100 HAU/ml) was added for another 24 h. IFN- α was measured in the cell supernatant by specific ELISA. Data are expressed as mean \pm SD and are representative of three independent experiments. (B) For isobolograms (Steel and Peckham, 1979) data were graphed by plotting the IC_{50} of TGF- β on the x axis, IC_{50} of TNF- α on the y axis and connecting the paired points with the diagonal dotted line (additivity). Synergism is encountered if the experimental points ($IC_{50TGF-\beta/TNF-\alpha}$ and $IC_{50TNF-\alpha/TGF-\beta}$, corresponding to the IC_{50} of TGF- β and TNF- α used in combination) fall below that line, whereas antagonism occurs if the points lie above it.

Figure S8: Breast tumor-derived supernatants do not impair TLR7 or 9 expression in healthy pDC. Total RNA isolated from highly purified tonsil fresh pDC, pDC cultured in hIL-3 (20 ng/ml) either alone or in the presence of 25% of breast tumor-derived supernatants during 16 h was isolated using RNeasy Kit (Qiagen). cDNA was synthesized with the SuperScript III (Invitrogen) reverse transcriptase synthesis kit. Quantitative real time PCR was performed on a Thermocycler (Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System) using the Mesagreen qPCR Master Mix Plus for SYBR[®] Assay (Eurogentec). The amplification specificity was assessed for each sample by melting curve analysis and the size of the amplicon was checked by electrophoresis. Relative quantification was performed using standard curve analysis. All gene expression data were normalized with β 2-microglobulin/cyclophilin B geometric mean. Data are shown as a mean of relative expression \pm SD from duplicate values of three independent donors. The following primers were used: β 2-microglobulin (forward) 5'- TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3', (reverse) 5'-

TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT -3', Cyclophilin B (forward) 5'-
GAAAGAGCATCTACGGTGAGC-3' (reverse) 5'-GTC TTGACTGTCGTGATGAAGAA-
3', TLR7 (forward) 5'-TCTACCTGGGCCAAAAGTGT -3', (reverse) 5'-
GGCACATGCTGAAGAGAGTTA-3' and TLR9 (forward) 5'-
CGTCTTGAAGGCCTGGTGTGA-3', (reverse) 5'-CTGGAAGGCCTTGGTTTTAGTGA-
3'.

Figure 1

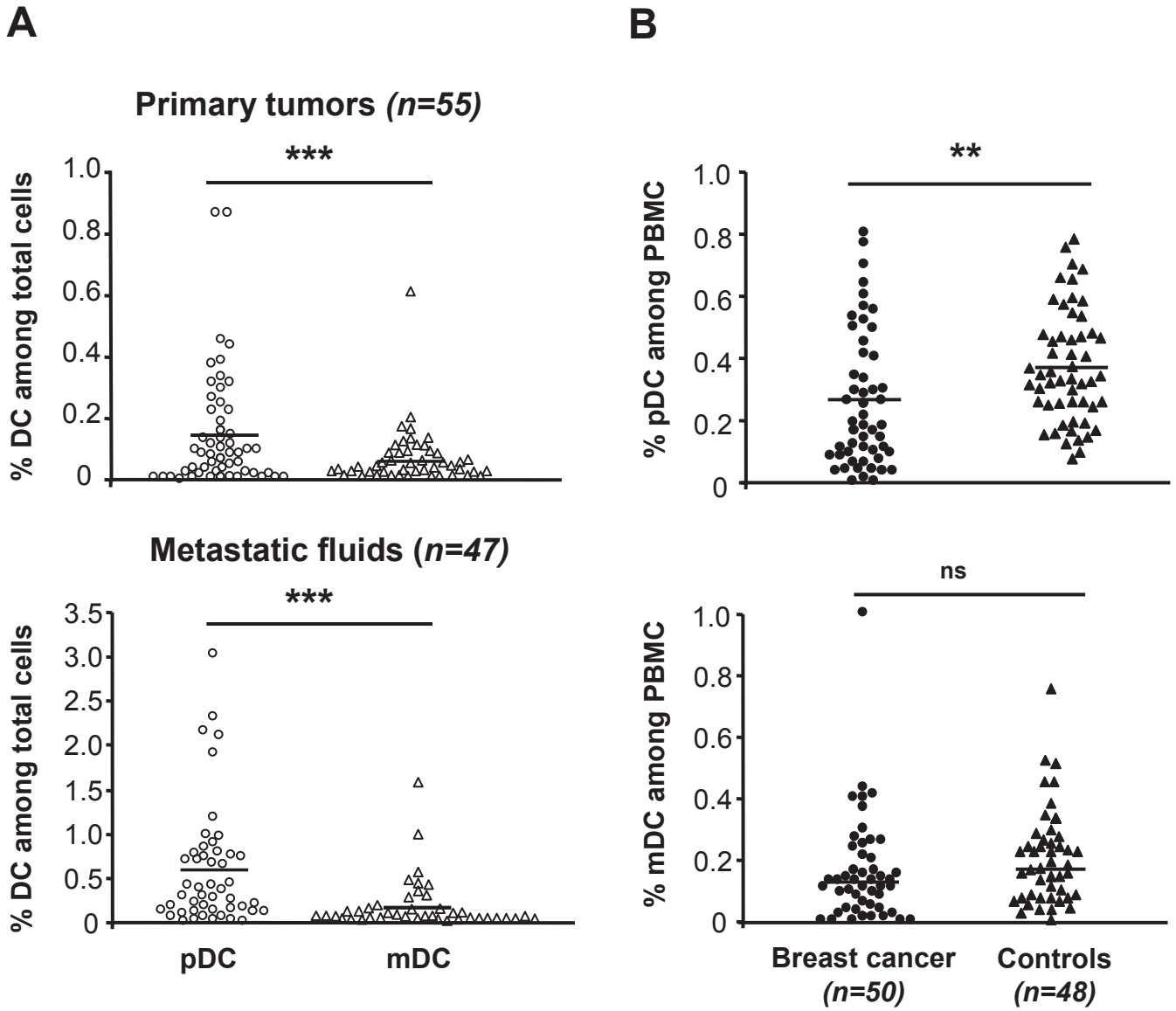


Figure 2

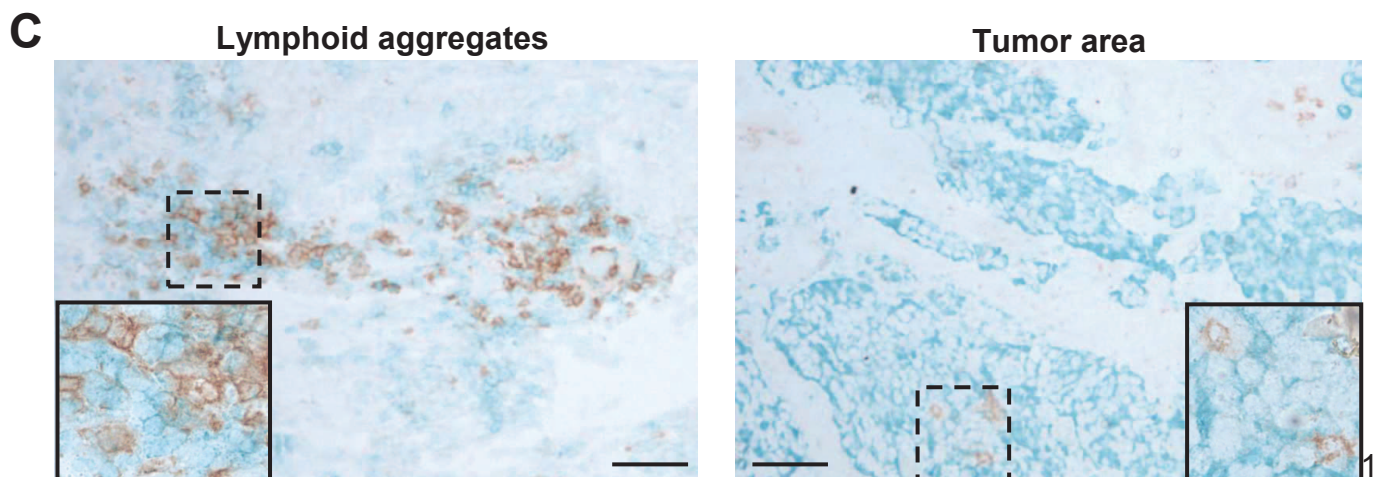
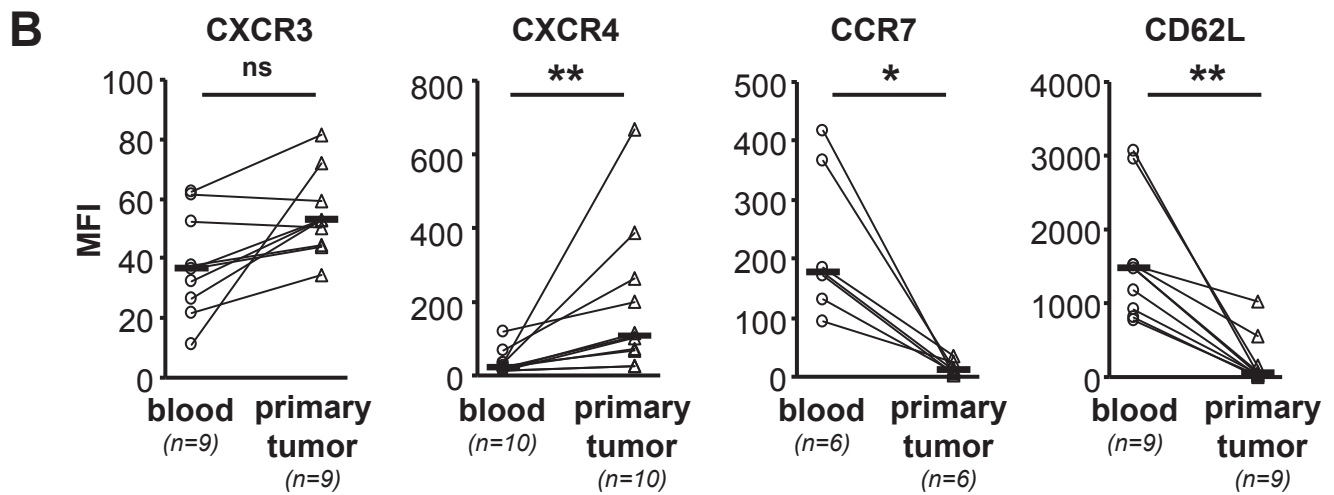
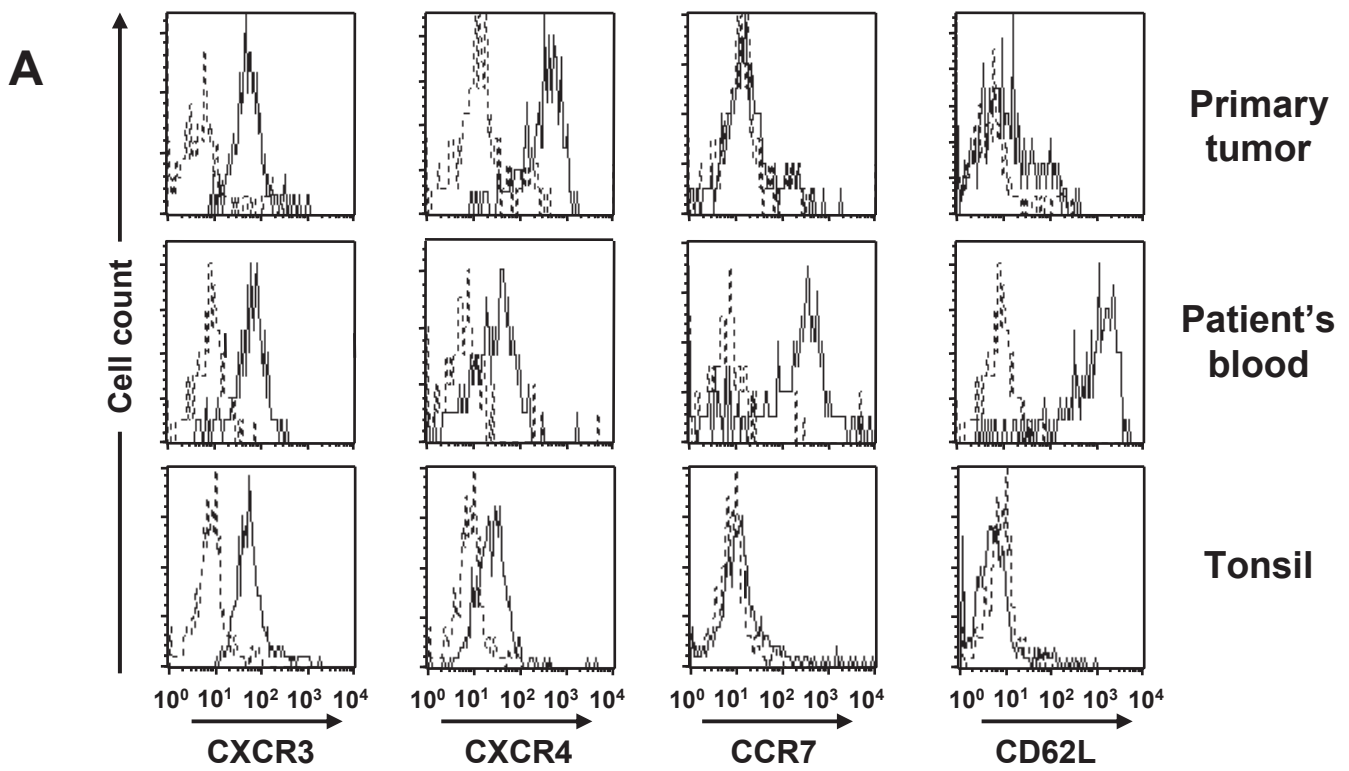


Figure 3

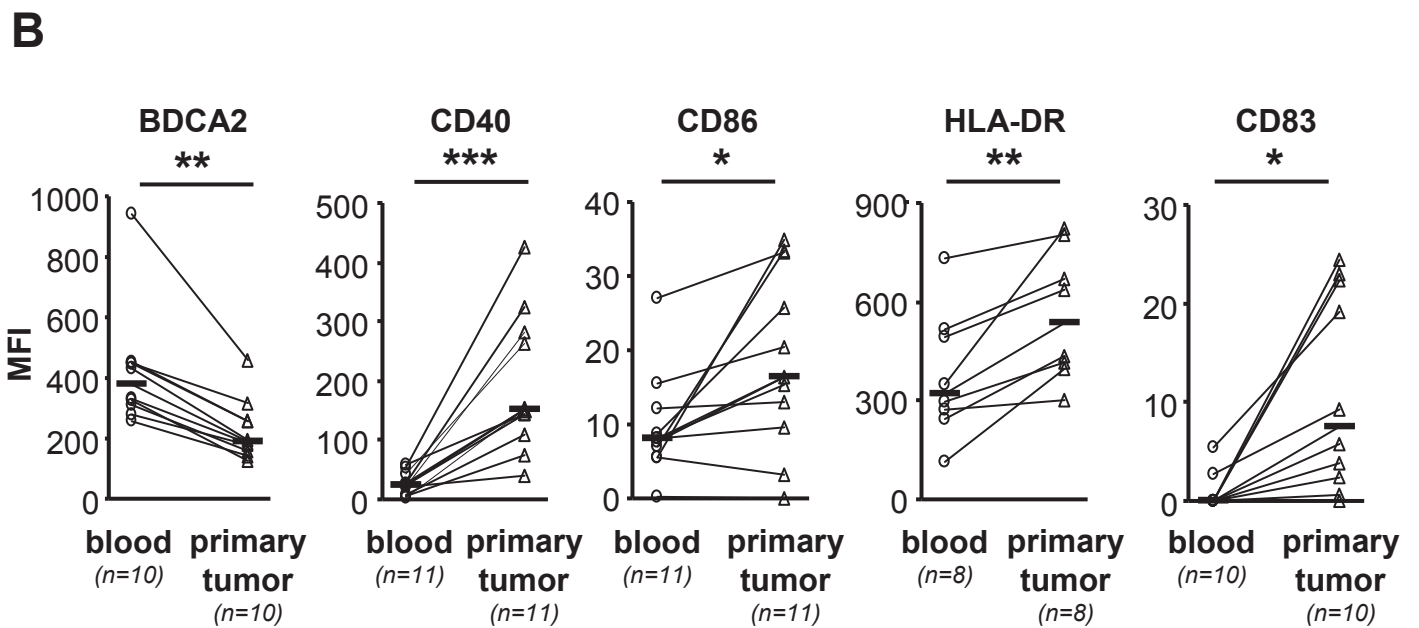
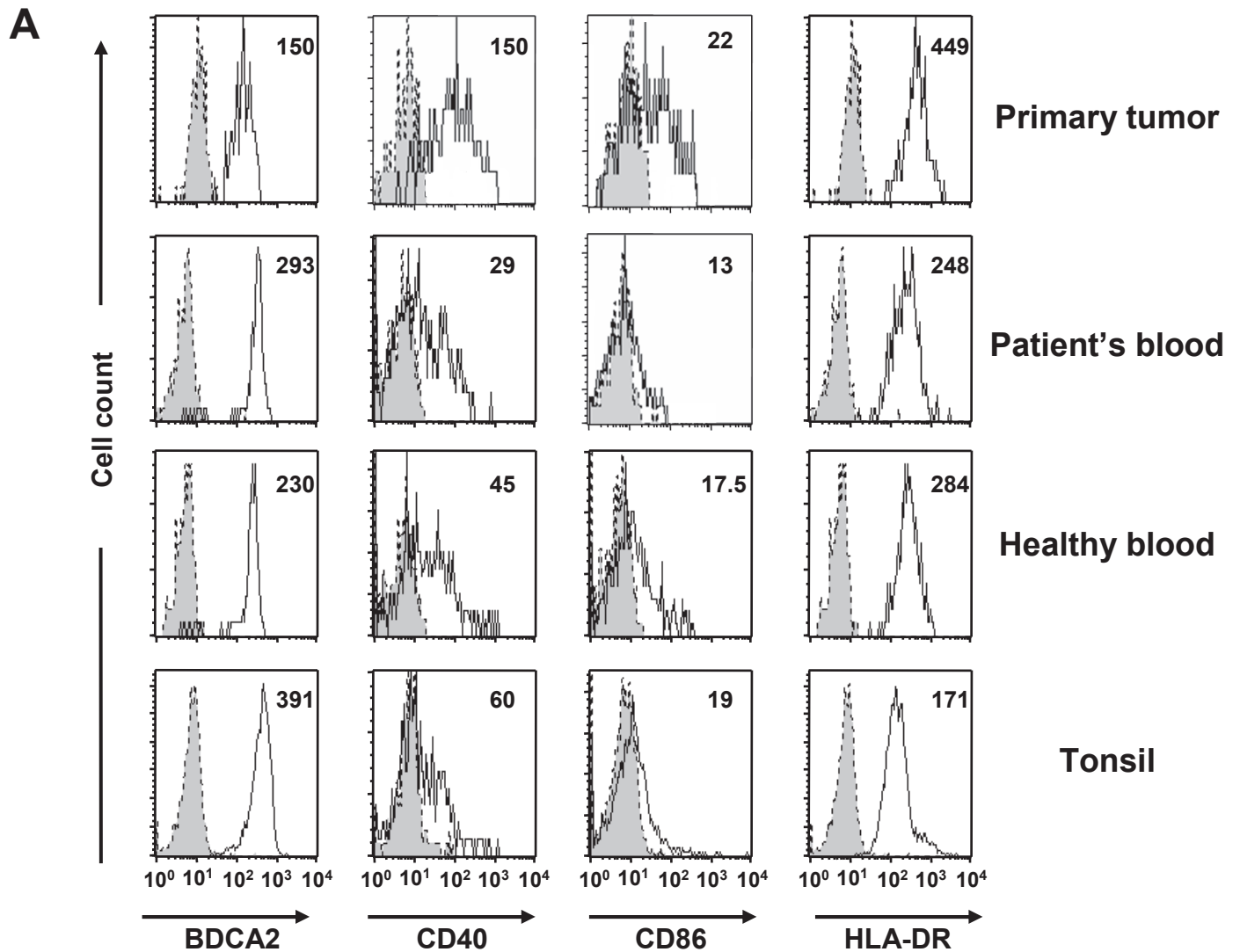


Figure 4

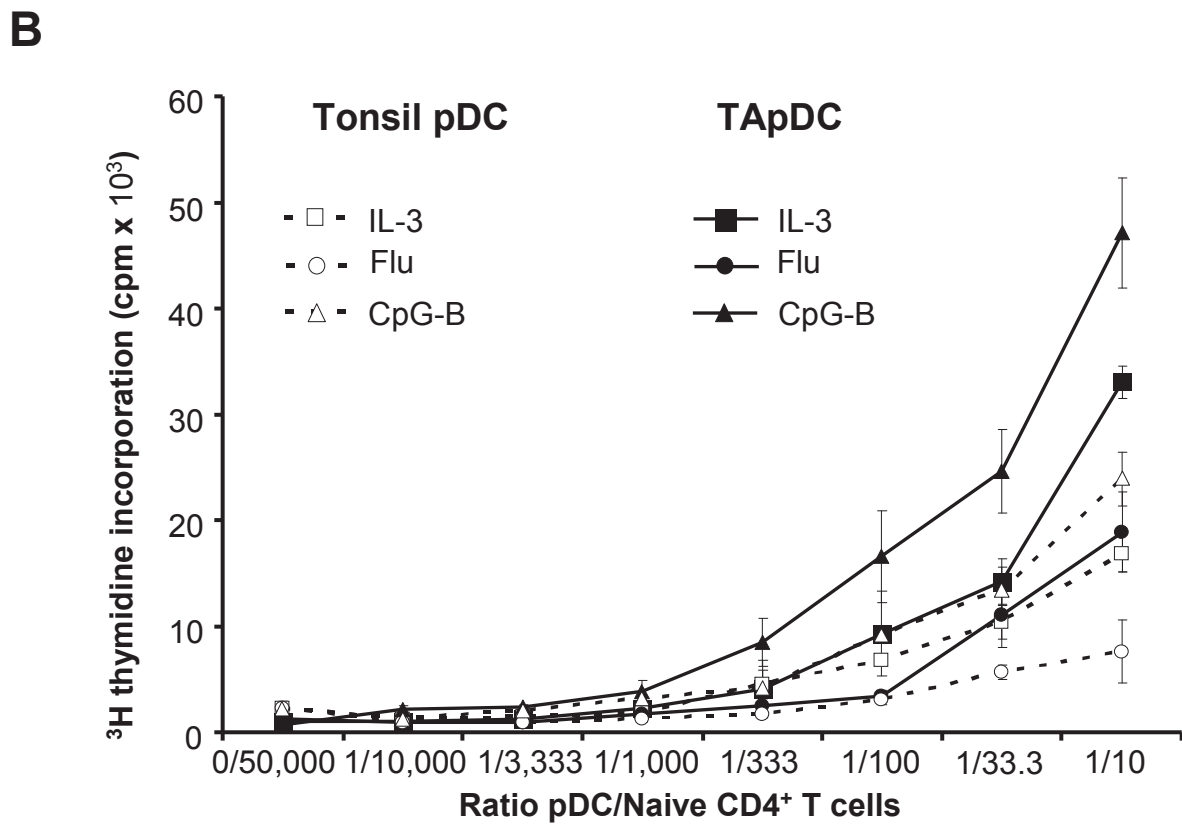
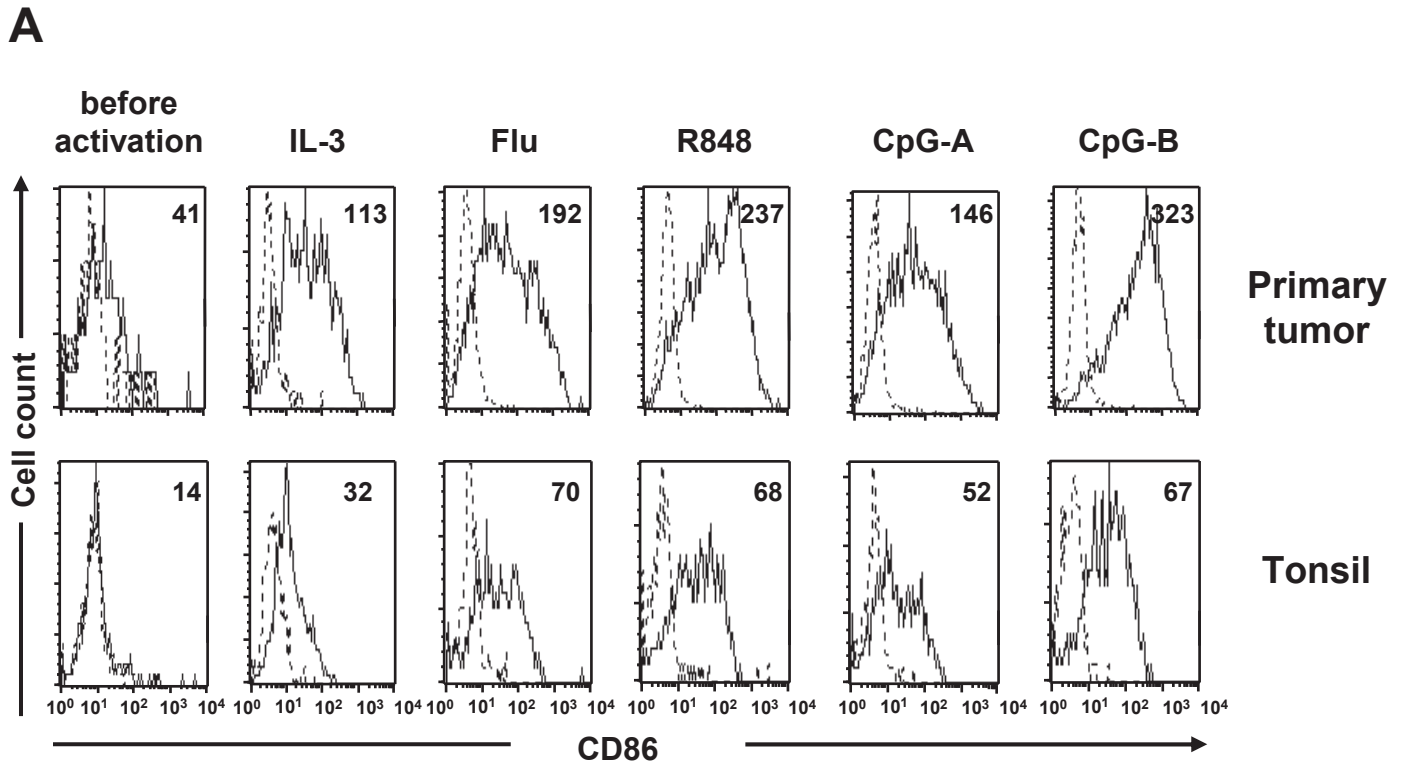
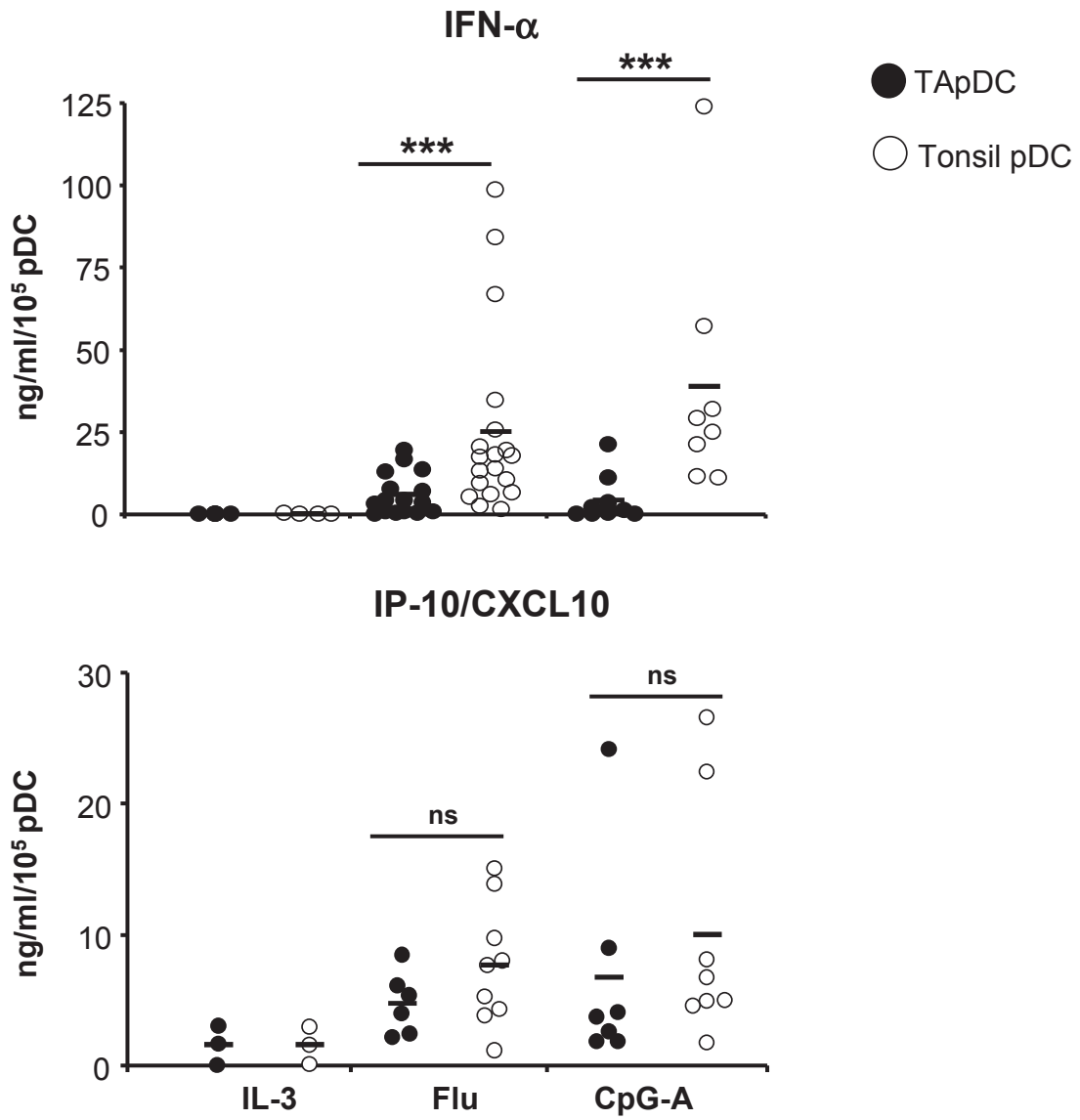


Figure 5

A



B

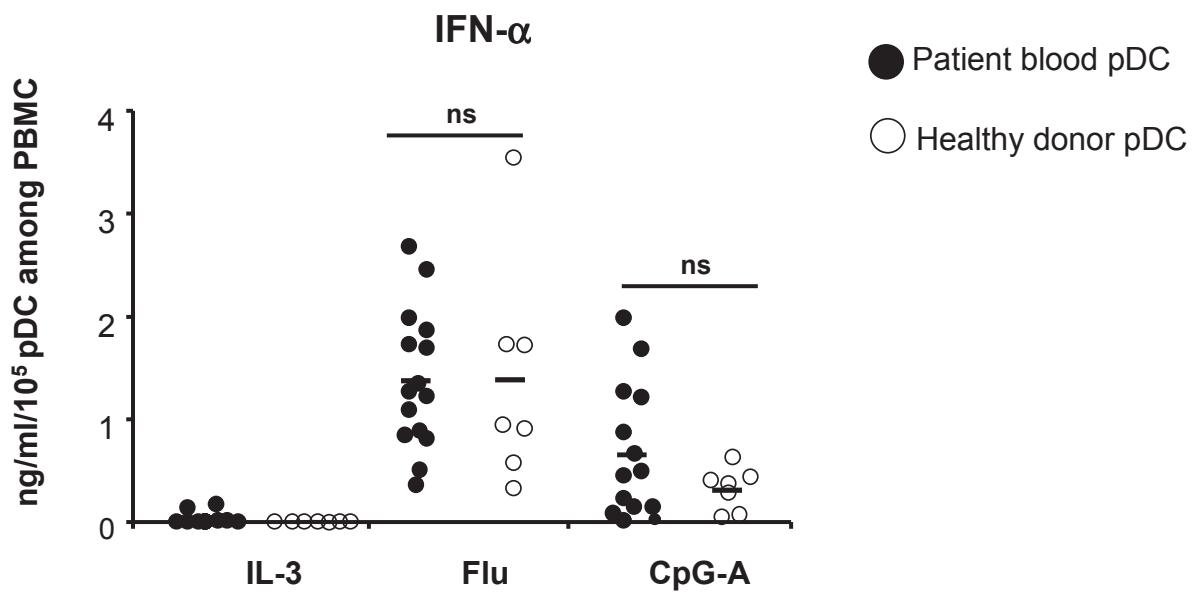


Figure 6

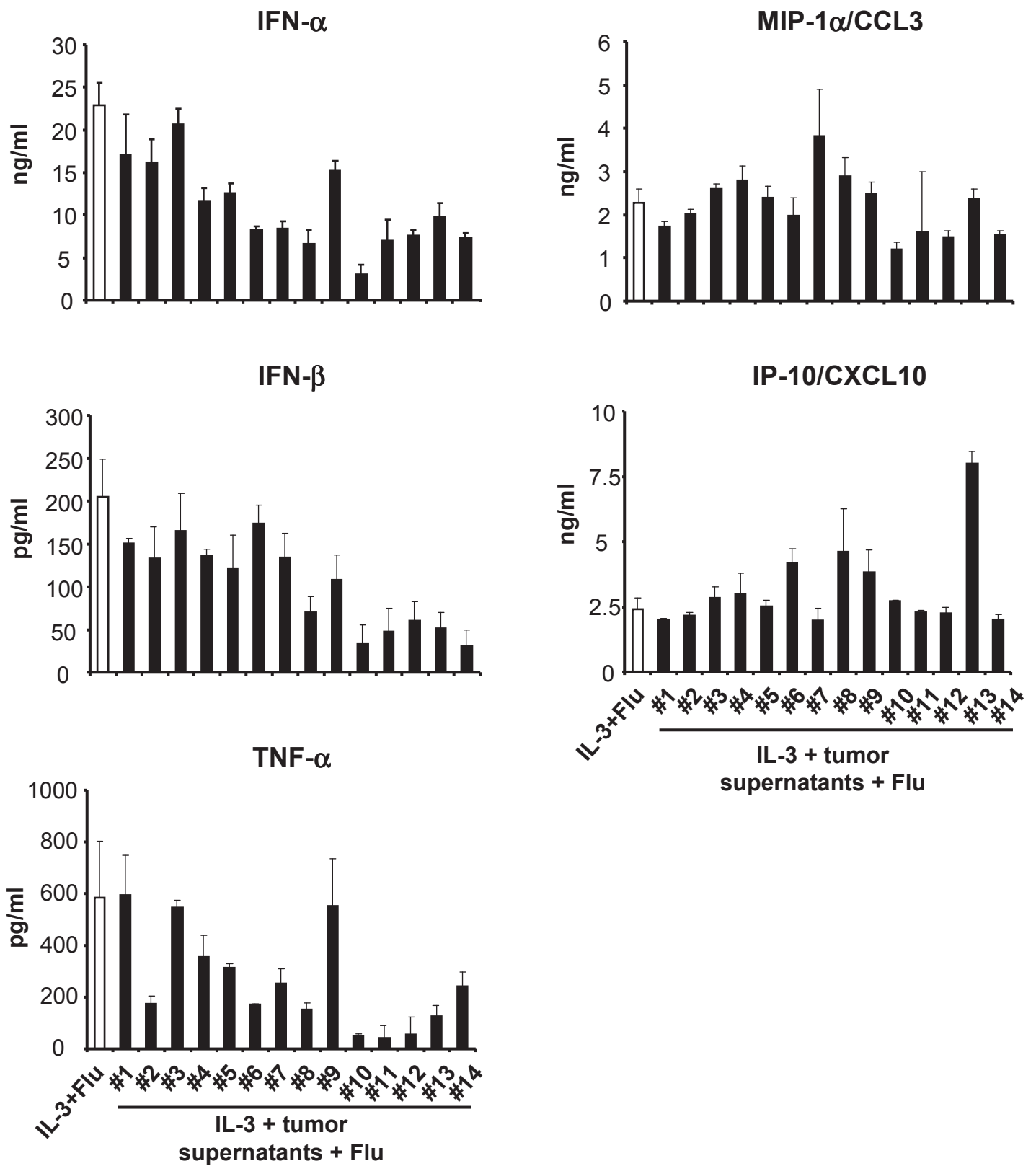


Figure 7

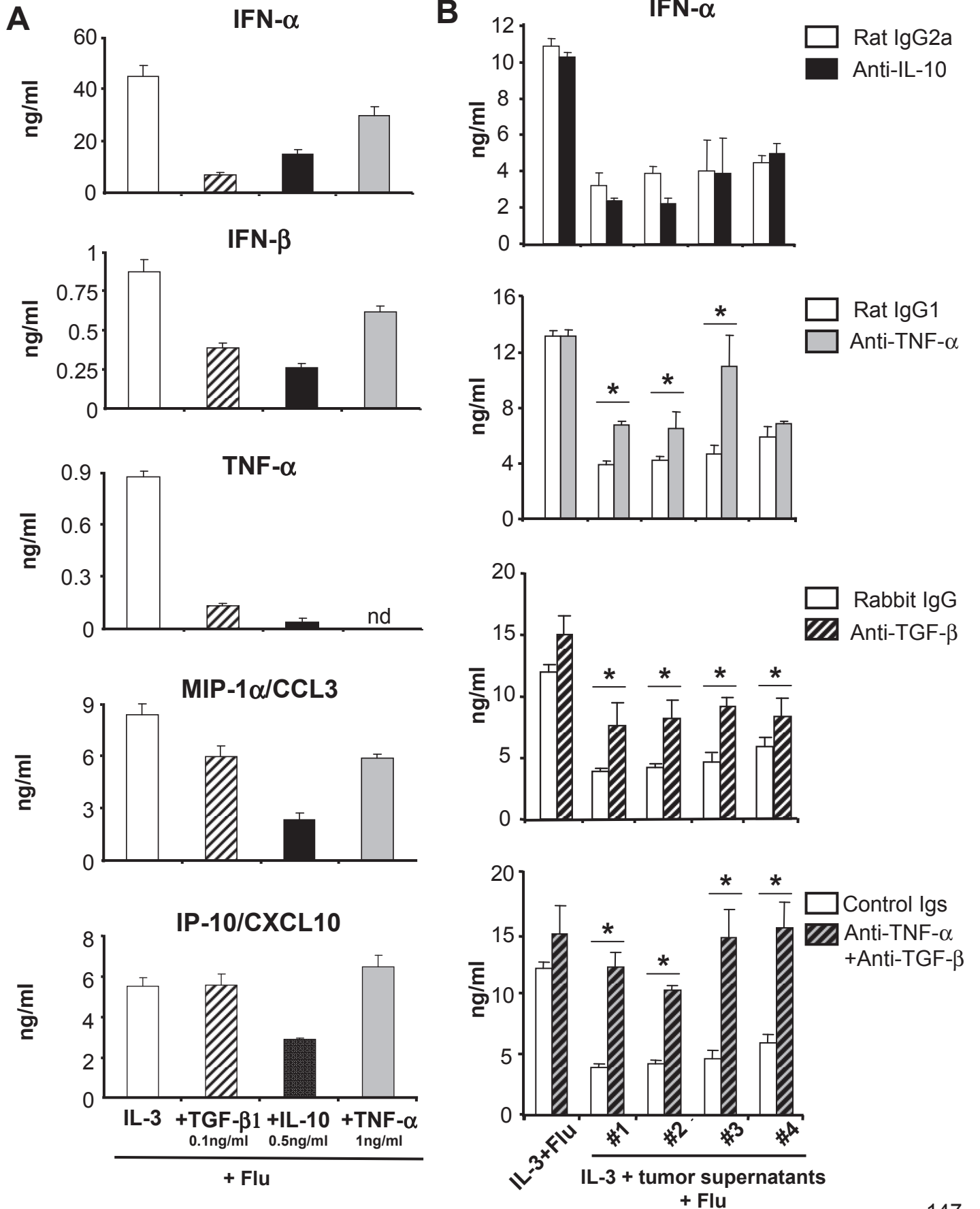


Figure 8

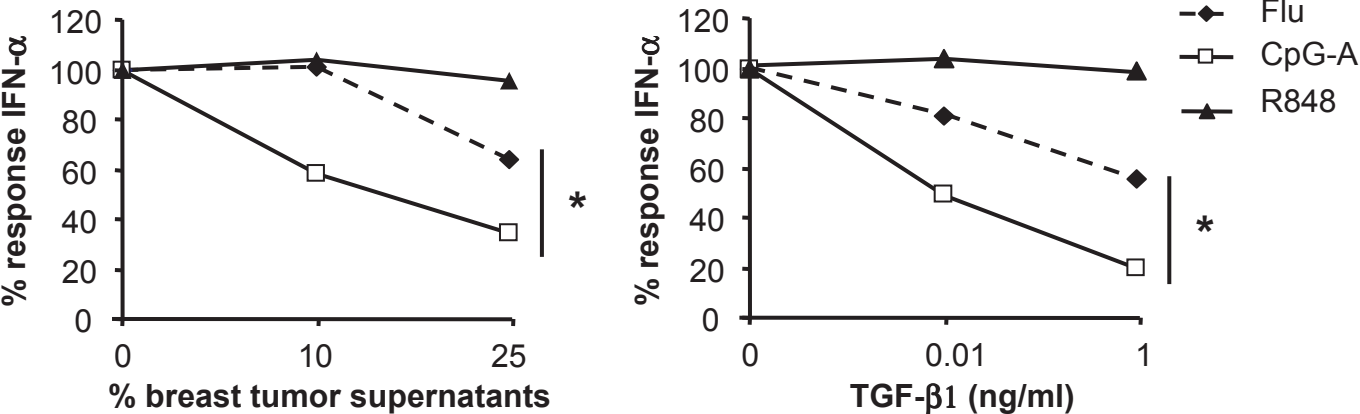
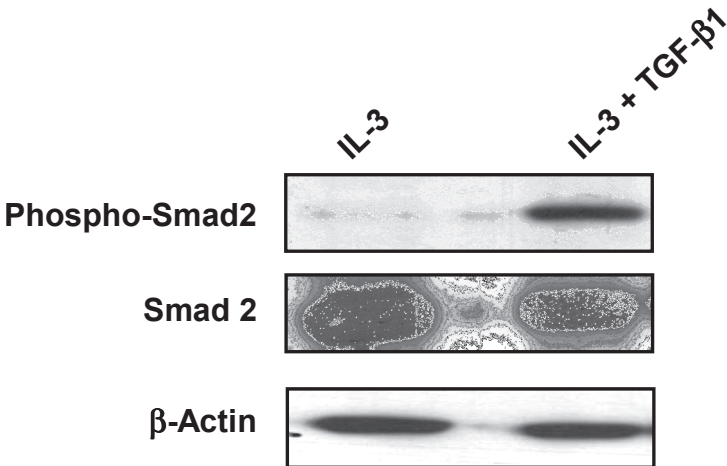


Figure 9

A



B

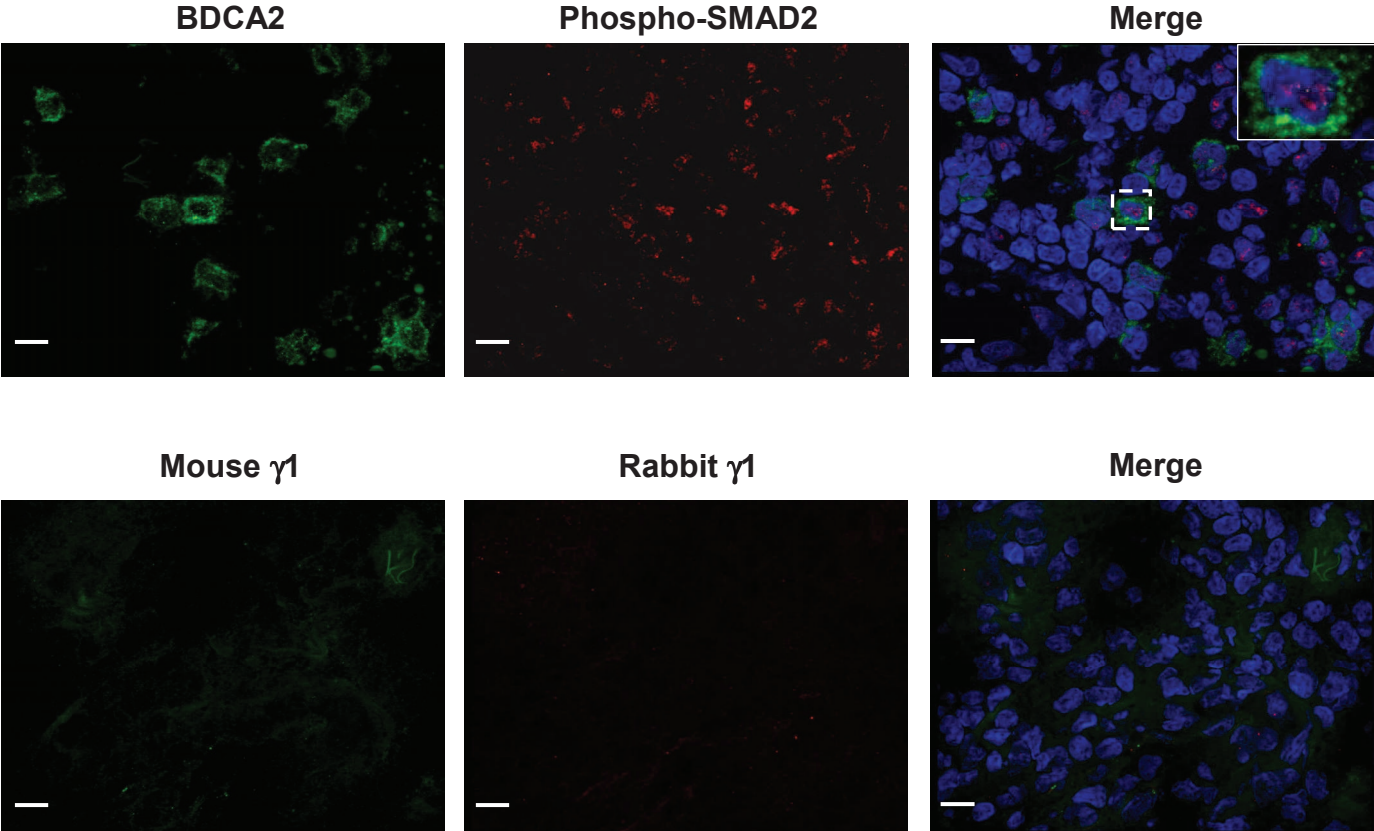


Figure S1

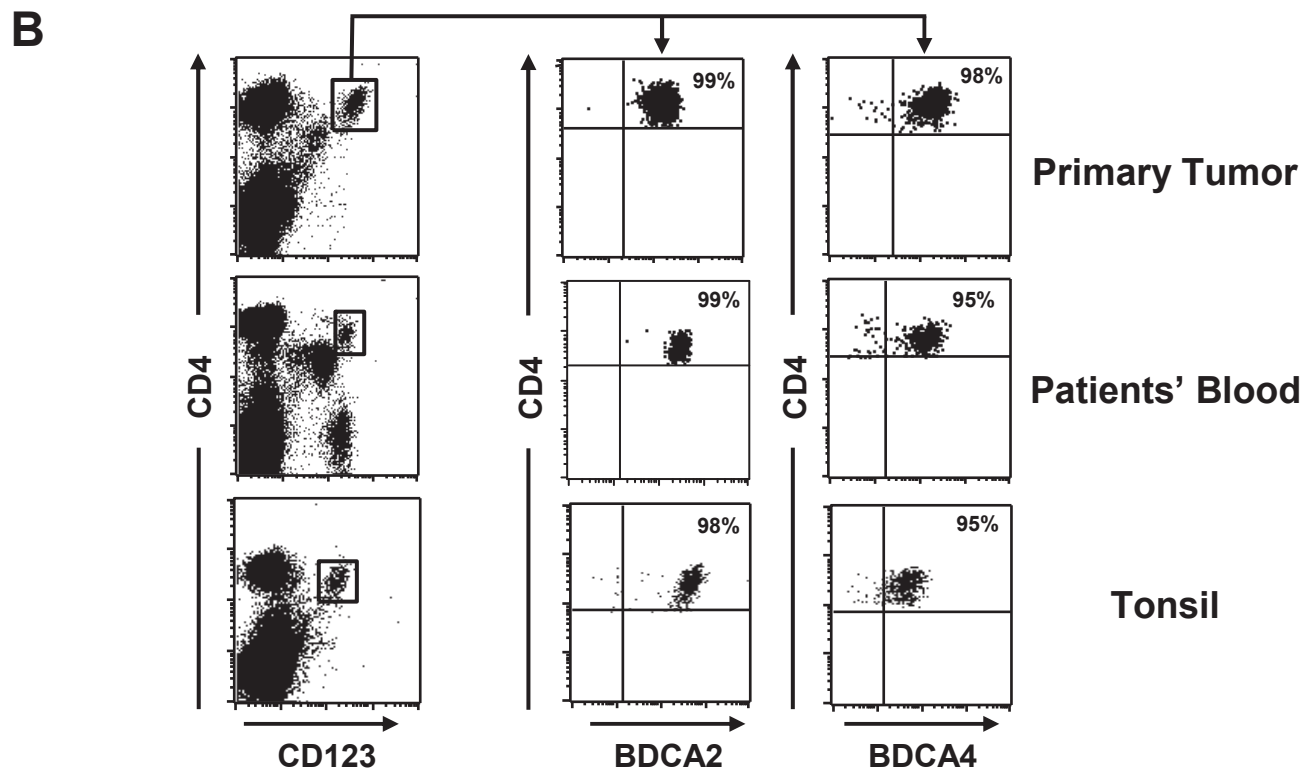
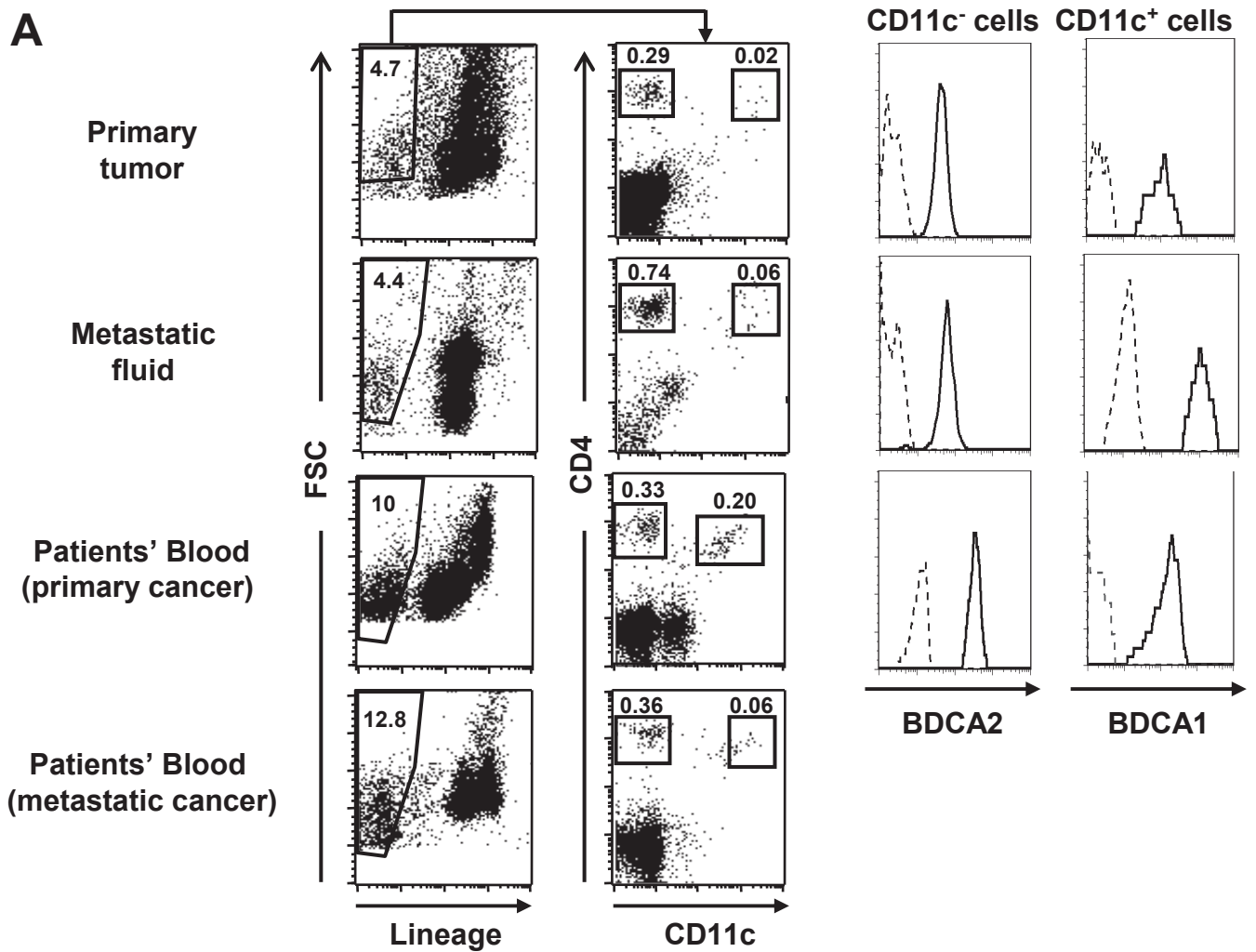
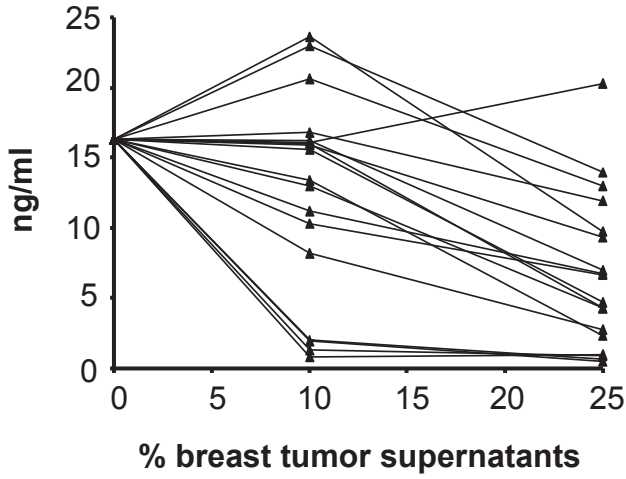


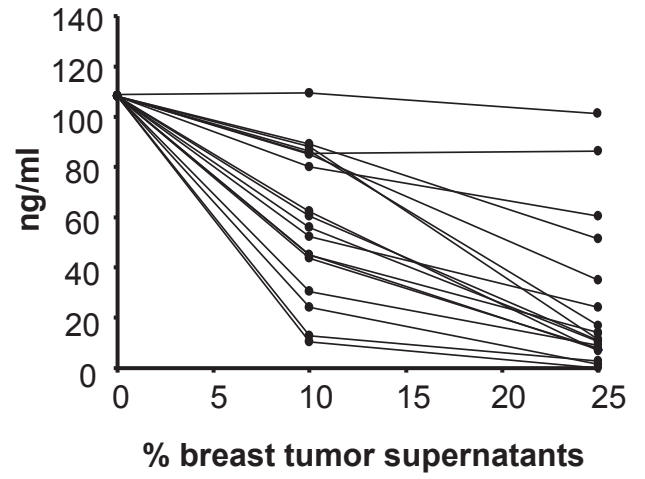
Figure S2

A

IFN- α after Flu activation



IFN- α after CpG-A activation



B

IFN- α

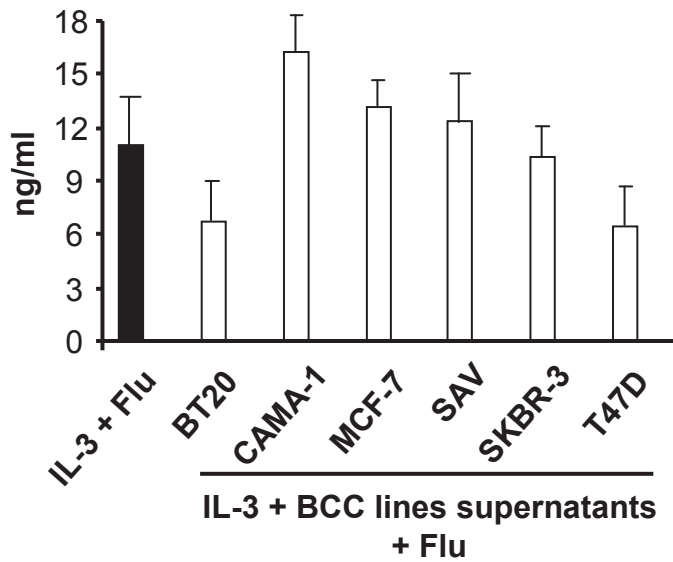


Figure S3

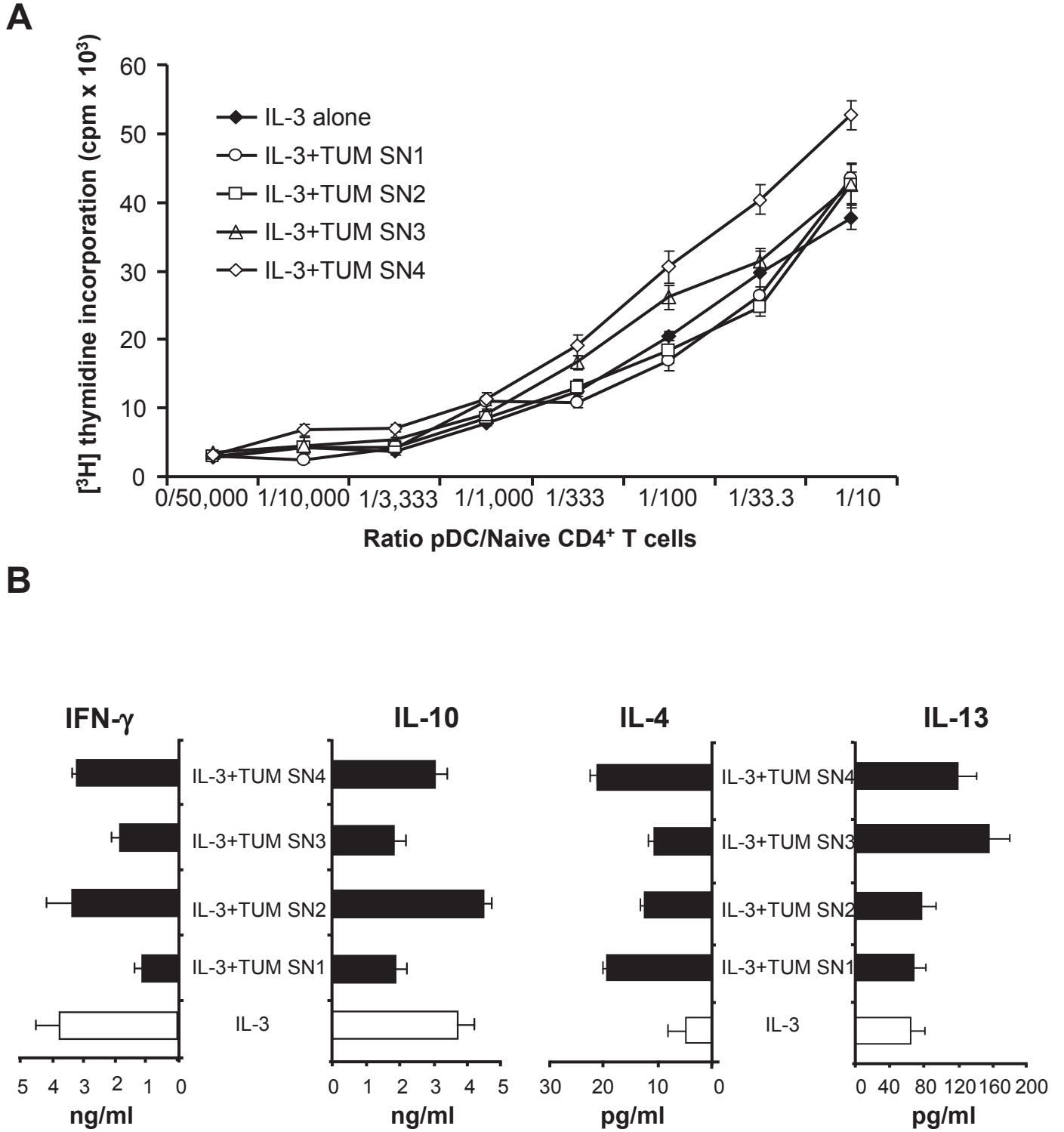


Figure S4

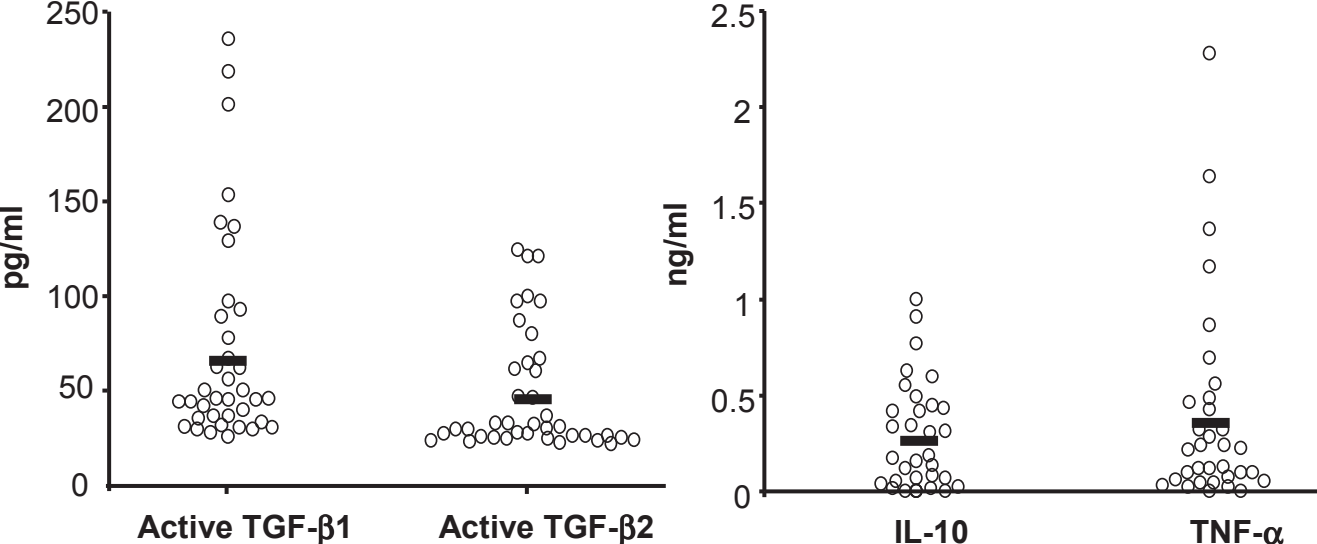


Figure S5

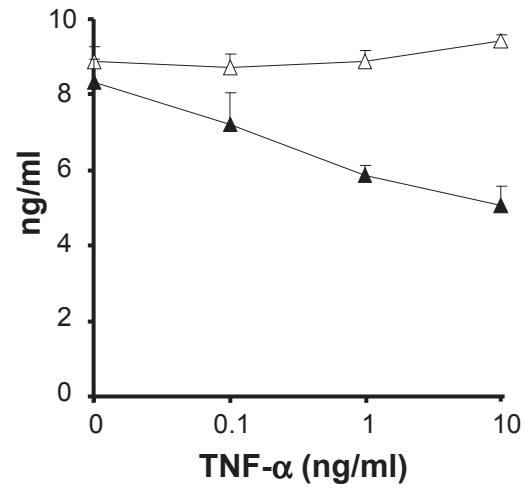
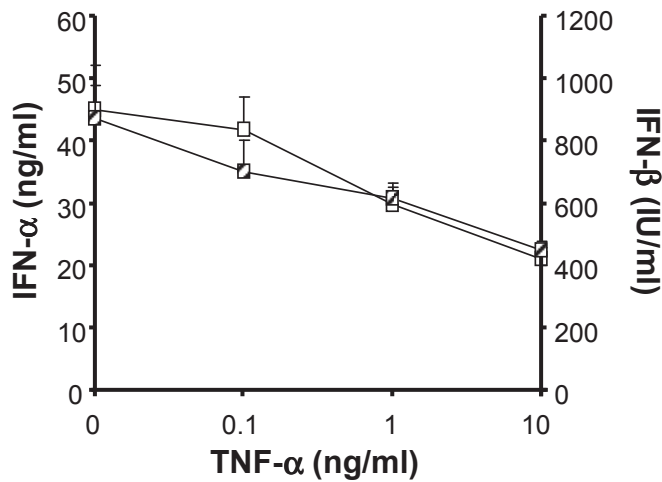
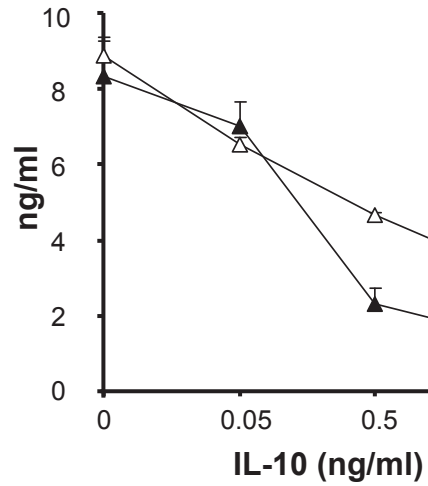
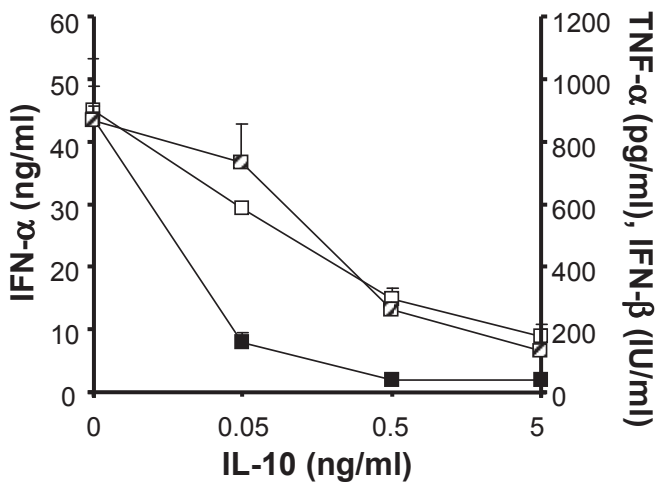
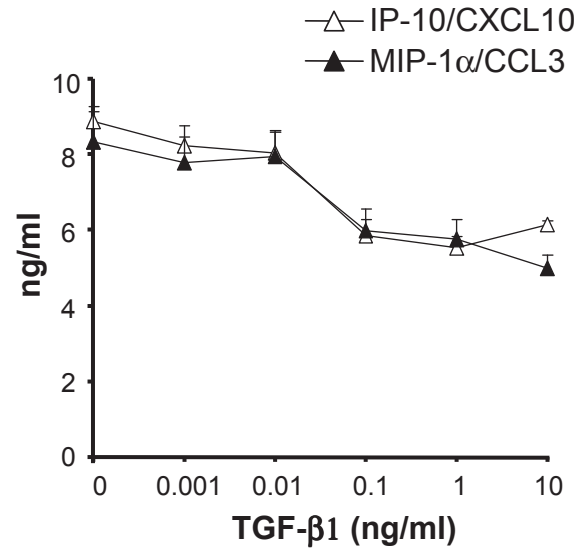
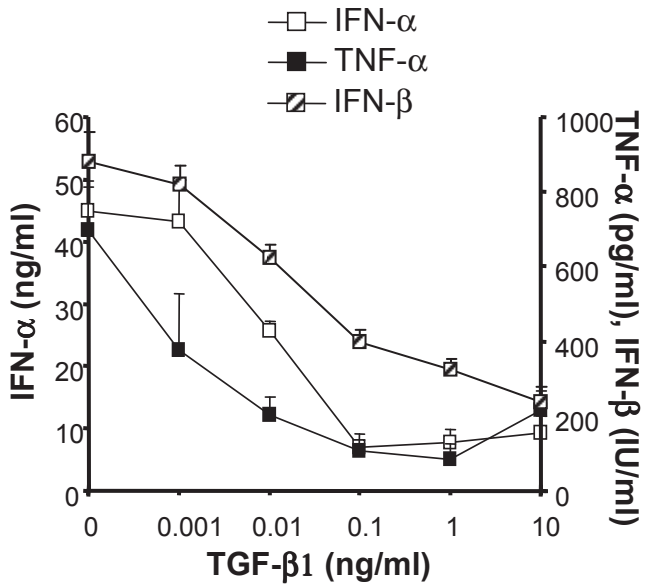


Figure S6

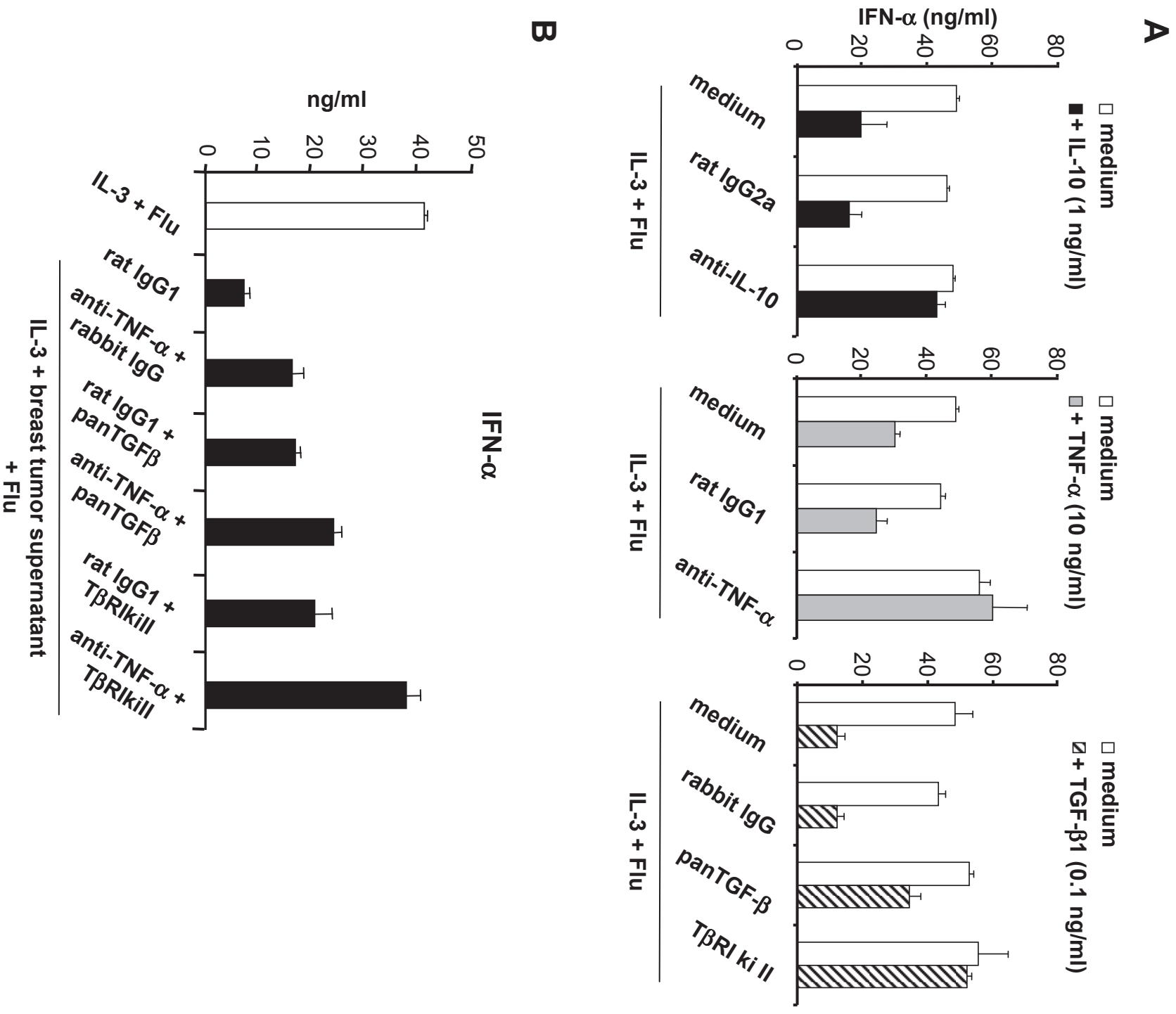


Figure S7

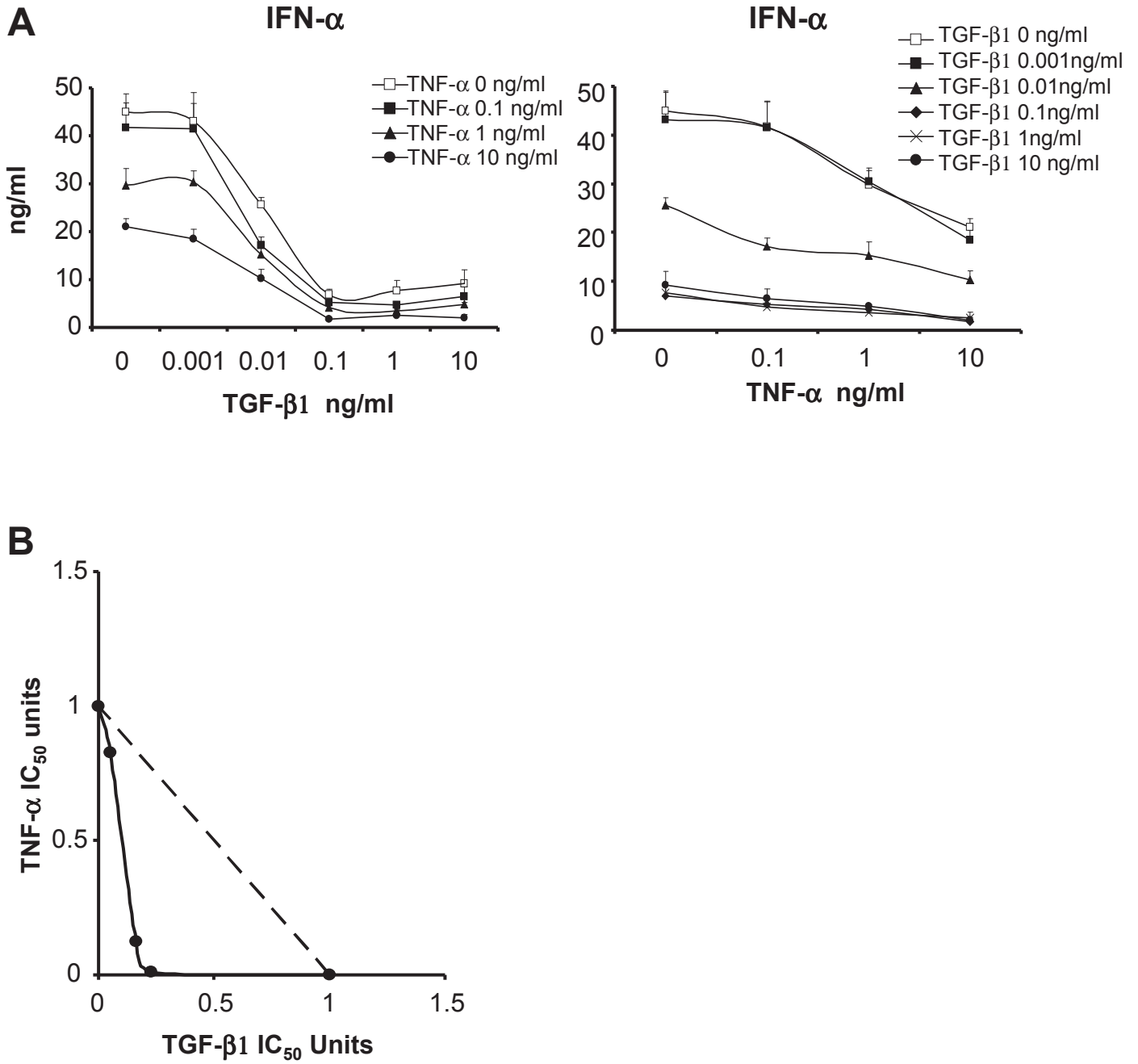
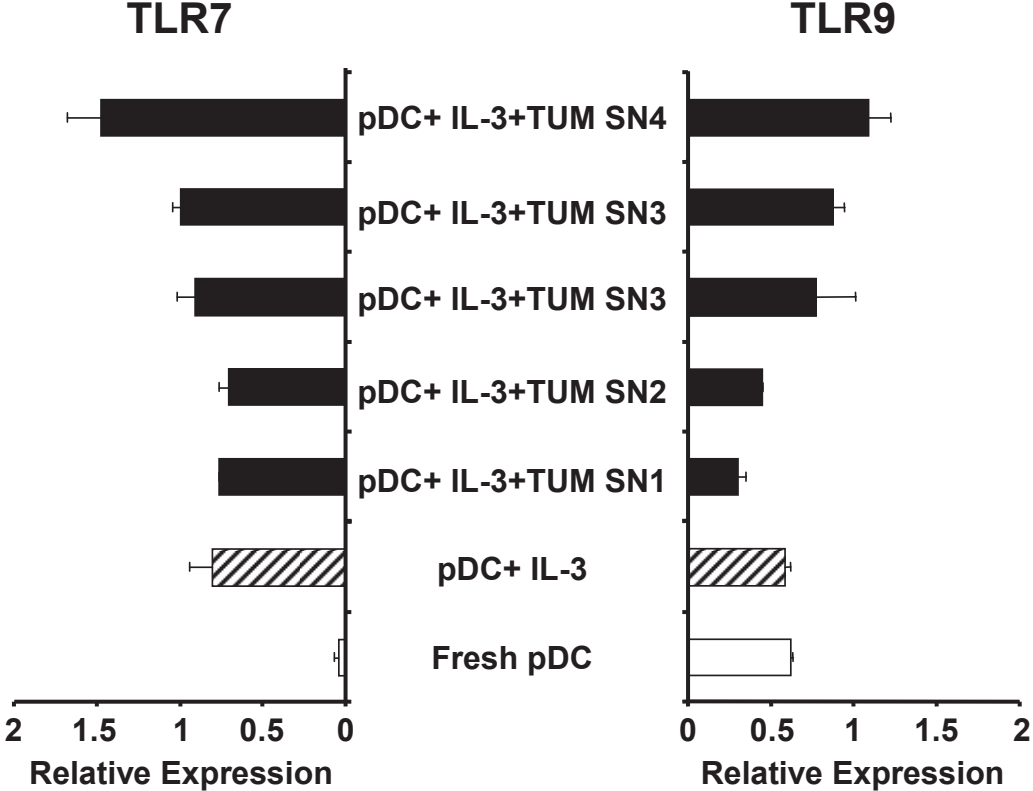


Figure S8



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Reference List

A

- Abe, M., Wang, Z., De Creus, A., and Thomson, A. W. (2005). Plasmacytoid dendritic cell precursors induce allogeneic T-cell hyporesponsiveness and prolong heart graft survival. *Am. J. Transplant.* *5*, 1808-1819.
- Ackerman, A. L., Giodini, A., and Cresswell, P. (2006). A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity.* *25*, 607-617.
- Ahmadi, M., Emery, D. C., and Morgan, D. J. (2008). Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8⁺ T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo. *Cancer Res.* *68*, 7520-7529.
- Ahmed, R., Butler, L. D., and Bhatti, L. (1988). T4⁺ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J. Virol.* *62*, 2102-2106.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* *2*, 675-680.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Pallotta, S., Daniele, R., Bosisio, D., Madonna, S., Fortugno, P., Gonzalvo-Feo, S., Franssen, J. D., Parmentier, M., De Pita, O., Girolomoni, G., and Sozzani, S. (2009). Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J. Exp. Med.* *206*, 249-258.
- Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha_vbeta₅ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *188*, 1359-1368.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732-738.
- Allan, R. S., Smith, C. M., Belz, G. T., van Lint, A. L., Wakim, L. M., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha⁺ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* *301*, 1925-1928.
- Allan, R. S., Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C. M., Villadangos, J. A., Zhan, Y., Lew, A. M., Shortman, K., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity.* *25*, 153-162.
- Allavena, P., Piemonti, L., Longoni, D., Bernasconi, S., Stoppacciaro, A., Ruco, L., and Mantovani, A. (1998). IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur. J. Immunol.* *28*, 359-369.

Allman,D., Dalod,M., Asselin-Paturel,C., Delale,T., Robbins,S.H., Trinchieri,G., Biron,C.A., Kastner,P., and Chan,S. (2006). Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* 108, 4025-4034.

Almand,B., Clark,J.I., Nikitina,E., van Beynen,J., English,N.R., Knight,S.C., Carbone,D.P., and Gabrilovich,D.I. (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J. Immunol.* 166, 678-689.

Almand,B., Resser,J.R., Lindman,B., Nadaf,S., Clark,J.I., Kwon,E.D., Carbone,D.P., and Gabrilovich,D.I. (2000). Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 1755-1766.

Anderson,M.J., Shafer-Weaver,K., Greenberg,N.M., and Hurwitz,A.A. (2007). Tolerization of tumor-specific T cells despite efficient initial priming in a primary murine model of prostate cancer. *J. Immunol.* 178, 1268-1276.

Anjuere,F., Martin,P., Ferrero,I., Fraga,M.L., Del Hoyo,G.M., Wright,N., and Ardavin,C. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93, 590-598.

Anjuere,F., Martinez,d.H., Martin,P., and Ardavin,C. (2000). Langerhans cells acquire a CD8+ dendritic cell phenotype on maturation by CD40 ligation. *J. Leukoc. Biol.* 67, 206-209.

Ardavin,C., Wu,L., Li,C.L., and Shortman,K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-763.

Arpinati,M., Green,C.L., Heimfeld,S., Heuser,J.E., and Anasetti,C. (2000). Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 95, 2484-2490.

Aspord,C., Pedroza-Gonzalez,A., Gallegos,M., Tindle,S., Burton,E.C., Su,D., Marches,F., Banchereau,J., and Palucka,A.K. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J. Exp. Med.* 204, 1037-1047.

Asselin-Paturel,C., Boonstra,A., Dalod,M., Durand,I., Yessaad,N., Dezutter-Dambuyant,C., Vicari,A., O'Garra,A., Biron,C., Briere,F., and Trinchieri,G. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* 2, 1144-1150.

Asselin-Paturel,C., Brizard,G., Chemin,K., Boonstra,A., O'Garra,A., Vicari,A., and Trinchieri,G. (2005). Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J. Exp. Med.* 201, 1157-1167.

Asselin-Paturel,C., Brizard,G., Pin,J.J., Briere,F., and Trinchieri,G. (2003). Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J. Immunol.* 171, 6466-6477.

Austyn,J.M., Hankins,D.F., Larsen,C.P., Morris,P.J., Rao,A.S., and Roake,J.A. (1994). Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J. Immunol.* 152, 2401-2410.

B

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 767-811.

Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Asselin-Paturel, C., Colonna, M., and Kalinke, U. (2002). Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J. Exp. Med.* *195*, 507-516.

Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R.L. (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*, 1131-1139.

Basu, S., Binder, R.J., Ramalingam, T., and Srivastava, P.K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity.* *14*, 303-313.

Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J.W., Scherer, B., Kremer, J.P., Wagner, H., and Lipford, G.B. (2001). Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J. Immunol.* *166*, 5000-5007.

Beckebaum, S., Zhang, X., Chen, X., Yu, Z., Frilling, A., Dworacki, G., Grosse-Wilde, H., Broelsch, C.E., Gerken, G., and Cicinnati, V.R. (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.

Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., Brooks, A.G., and Heath, W.R. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* *10*, 488-495.

Bell, D., Chomarat, P., Broyles, D., Netto, G., Harb, G.M., Lebecque, S., Valladeau, J., Davoust, J., Palucka, K.A., and Banchereau, J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J. Exp. Med.* *190*, 1417-1426.

Bellone, G., Carbone, A., Smirne, C., Scirelli, T., Buffolino, A., Novarino, A., Stacchini, A., Bertetto, O., Palestro, G., Sorio, C., Scarpa, A., Emanuelli, G., and Rodeck, U. (2006). Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J. Immunol.* *177*, 3448-3460.

Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Miller, J.F., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C.G., Mueller, S.N., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002a). The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J. Exp. Med.* *196*, 1099-1104.

Belz, G.T., Shortman, K., Bevan, M.J., and Heath, W.R. (2005). CD8alpha+ dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *J. Immunol.* *175*, 196-200.

Belz,G.T., Smith,C.M., Eichner,D., Shortman,K., Karupiah,G., Carbone,F.R., and Heath,W.R. (2004a). Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J. Immunol.* *172*, 1996-2000.

Belz,G.T., Smith,C.M., Kleinert,L., Reading,P., Brooks,A., Shortman,K., Carbone,F.R., and Heath,W.R. (2004b). Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 8670-8675.

Belz,G.T., Vremec,D., Febbraio,M., Corcoran,L., Shortman,K., Carbone,F.R., and Heath,W.R. (2002b). CD36 is differentially expressed by CD8+ splenic dendritic cells but is not required for cross-presentation in vivo. *J. Immunol.* *168*, 6066-6070.

Bendriss-Vermare,N., Barthelemy,C., Durand,I., Bruand,C., Dezutter-Dambuyant,C., Moulian,N., Berrih-Aknin,S., Caux,C., Trinchieri,G., and Briere,F. (2001). Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J. Clin. Invest* *107*, 835-844.

Benitez-Ribas,D., Adema,G.J., Winkels,G., Klasen,I.S., Punt,C.J., Figdor,C.G., and de Vries,I.J. (2006). Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc{gamma}RII-mediated uptake. *J. Exp. Med.*

Bennett,S.R., Carbone,F.R., Karamalis,F., Flavell,R.A., Miller,J.F., and Heath,W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* *393*, 478-480.

Bennett,S.R., Carbone,F.R., Karamalis,F., Miller,J.F., and Heath,W.R. (1997). Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J. Exp. Med.* *186*, 65-70.

Bergwelt-Baildon,M.S., Popov,A., Saric,T., Chemnitz,J., Classen,S., Stoffel,M.S., Fiore,F., Roth,U., Beyer,M., Debey,S., Wickenhauser,C., Hanisch,F.G., and Schultze,J.L. (2006). CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood* *108*, 228-237.

Bevan,M.J. (1976). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol.* *117*, 2233-2238.

Bevan,M.J. (2004). Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 595-602.

Bilsborough,J., George,T.C., Norment,A., and Viney,J.L. (2003). Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* *108*, 481-492.

Bjorck,P. (2001). Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- treated mice. *Blood* *98*, 3520-3526.

Blanco,P., Palucka,A.K., Gill,M., Pascual,V., and Banchereau,J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* *294*, 1540-1543.

Blander, J.M. and Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 440, 808-812.

Blasius, A., Vermi, W., Krug, A., Facchetti, F., Cella, M., and Colonna, M. (2004). A cell-surface molecule selectively expressed on murine natural interferon-producing cells that blocks secretion of interferon-alpha. *Blood* 103, 4201-4206.

Blasius, A.L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T., and Colonna, M. (2006a). Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* 107, 2474-2476.

Blasius, A.L. and Colonna, M. (2006). Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. *Trends Immunol.* 27, 255-260.

Blasius, A.L., Giurisato, E., Cella, M., Schreiber, R.D., Shaw, A.S., and Colonna, M. (2006b). Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J. Immunol.* 177, 3260-3265.

Blom, B., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (2000). Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192, 1785-1796.

Boasso, A., Herbeuval, J.P., Hardy, A.W., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Fuchs, D., and Shearer, G.M. (2007). HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 109, 3351-3359.

Bonmort, M., Dalod, M., Mignot, G., Ullrich, E., Chaput, N., and Zitvogel, L. (2008). Killer dendritic cells: IKDC and the others. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 558-565.

Bonnotte, B., Crittenden, M., Larmonier, N., Gough, M., and Vile, R.G. (2004). MIP-3alpha transfection into a rodent tumor cell line increases intratumoral dendritic cell infiltration but enhances (facilitates) tumor growth and decreases immunogenicity. *J. Immunol.* 173, 4929-4935.

Bontkes, H.J., Ruizendaal, J.J., Kramer, D., Meijer, C.J., and Hooijberg, E. (2005). Plasmacytoid dendritic cells are present in cervical carcinoma and become activated by human papillomavirus type 16 virus-like particles. *Gynecol. Oncol.* 96, 897-901.

Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y.J., and O'Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J. Exp. Med.* 197, 101-109.

Bosnjak, L., Miranda-Saksena, M., Koelle, D.M., Boadle, R.A., Jones, C.A., and Cunningham, A.L. (2005). Herpes simplex virus infection of human dendritic cells induces apoptosis and allows cross-presentation via uninfected dendritic cells. *J. Immunol.* 174, 2220-2227.

Brawand, P., Fitzpatrick, D.R., Greenfield, B.W., Brasel, K., Maliszewski, C.R., and De Smedt, T. (2002). Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J. Immunol.* 169, 6711-6719.

Brossart,P. and Bevan,M.J. (1997). Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 90, 1594-1599.

Buller,R.M., Holmes,K.L., Hugin,A., Frederickson,T.N., and Morse,H.C., III (1987). Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature* 328, 77-79.

Burgdorf,S., Kautz,A., Bohnert,V., Knolle,P.A., and Kurts,C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612-616.

Burgdorf,S., Lukacs-Kornek,V., and Kurts,C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J. Immunol.* 176, 6770-6776.

Burgdorf,S., Scholz,C., Kautz,A., Tampe,R., and Kurts,C. (2008). Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol.* 9, 558-566.

Bursch,L.S., Wang,L., Igyarto,B., Kissenpfennig,A., Malissen,B., Kaplan,D.H., and Hogquist,K.A. (2007). Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204, 3147-3156.

C

Cao,W., Bover,L., Cho,M., Wen,X., Hanabuchi,S., Bao,M., Rosen,D.B., Wang,Y.H., Shaw,J.L., Du,Q., Li,C., Arai,N., Yao,Z., Lanier,L.L., and Liu,Y.J. (2009). Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J. Exp. Med.* 206, 1603-1614.

Cao,W., Rosen,D.B., Ito,T., Bover,L., Bao,M., Watanabe,G., Yao,Z., Zhang,L., Lanier,L.L., and Liu,Y.J. (2006). Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J. Exp. Med.* 203, 1399-1405.

Cao,W., Zhang,L., Rosen,D.B., Bover,L., Watanabe,G., Bao,M., Lanier,L.L., and Liu,Y.J. (2007). BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Biol.* 5, e248.

Carbone,F.R. and Bevan,M.J. (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J. Exp. Med.* 171, 377-387.

Cella,M., Facchetti,F., Lanzavecchia,A., and Colonna,M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat. Immunol.* 1, 305-310.

Cella,M., Jarrossay,D., Facchetti,F., Alebardi,O., Nakajima,H., Lanzavecchia,A., and Colonna,M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5, 919-923.

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., and Jacob,M.C. (2001).

Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 97, 3210-3217.

Chaperot,L., Blum,A., Manches,O., Lui,G., Angel,J., Molens,J.P., and Plumas,J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 176, 248-255.

Chaperot,L., Perrot,I., Jacob,M.C., Blanchard,D., Salaun,V., Deneys,V., Lebecque,S., Briere,F., Bensa,J.C., and Plumas,J. (2004). Leukemic plasmacytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts. *Eur. J. Immunol.* 34, 418-426.

Chaux,P., Favre,N., Martin,M., and Martin,F. (1997). Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen- presenting function and inducible B7 expression in rats. *Int. J. Cancer* 72, 619-624.

Chaux,P., Hammann,A., Martin,F., and Martin,M. (1993). Surface phenotype and functions of tumor-infiltrating dendritic cells: CD8 expression by a cell subpopulation. *Eur. J. Immunol.* 23, 2517-2525.

Chaux,P., Moutet,M., Faivre,J., Martin,F., and Martin,M. (1996). Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest* 74, 975-983.

Chen,W., Antonenko,S., Sederstrom,J.M., Liang,X., Chan,A.S., Kanzler,H., Blom,B., Blazar,B.R., and Liu,Y.J. (2004). Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 103, 2547-2553.

Chen,W., Liang,X., Peterson,A.J., Munn,D.H., and Blazar,B.R. (2008). The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J. Immunol.* 181, 5396-5404.

Cheng,P., Corzo,C.A., Luetkeke,N., Yu,B., Nagaraj,S., Bui,M.M., Ortiz,M., Nacken,W., Sorg,C., Vogl,T., Roth,J., and Gabrilovich,D.I. (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J. Exp. Med.* 205, 2235-2249.

Chiodoni,C., Paglia,P., Stoppacciaro,A., Rodolfo,M., Parenza,M., and Colombo,M.P. (1999). Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response. *J. Exp. Med.* 190, 125-133.

Chung,Y., Chang,J.H., Kweon,M.N., Rennert,P.D., and Kang,C.Y. (2005). CD8alpha-11b+ dendritic cells but not CD8alpha+ dendritic cells mediate cross-tolerance toward intestinal antigens. *Blood* 106, 201-206.

Cisse,B., Caton,M.L., Lehner,M., Maeda,T., Scheu,S., Locksley,R., Holmberg,D., Zweier,C., den Hollander,N.S., Kant,S.G., Holter,W., Rauch,A., Zhuang,Y., and Reizis,B. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 135, 37-48.

Colvin,B.L., Sumpter,T.L., Tokita,D., Salati,J., Mellor,A.L., and Thomson,A.W. (2009). Allostimulatory activity of bone marrow-derived plasmacytoid dendritic cells is independent of indoleamine dioxygenase but regulated by inducible costimulator ligand expression. *Hum. Immunol.* *70*, 313-320.

Contractor,N., Louten,J., Kim,L., Biron,C.A., and Kelsall,B.L. (2007). Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J. Immunol.* *179*, 2690-2694.

Curiel,T.J., Cheng,P., Mottram,P., Alvarez,X., Moons,L., Evdemon-Hogan,M., Wei,S., Zou,L., Kryczek,I., Hoyle,G., Lackner,A., Carmeliet,P., and Zou,W. (2004). Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res.* *64*, 5535-5538.

Curiel,T.J., Wei,S., Dong,H., Alvarez,X., Cheng,P., Mottram,P., Krzysiek,R., Knutson,K.L., Daniel,B., Zimmermann,M.C., David,O., Burow,M., Gordon,A., Dhurandhar,N., Myers,L., Berggren,R., Hemminki,A., Alvarez,R.D., Emilie,D., Curiel,D.T., Chen,L., and Zou,W. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* *9*, 562-567.

Curtsinger,J.M., Gerner,M.Y., Lins,D.C., and Mescher,M.F. (2007). Signal 3 availability limits the CD8 T cell response to a solid tumor. *J. Immunol.* *178*, 6752-6760.

D

Dalgaard,J., Beckstrom,K.J., Jahnsen,F.L., and Brinchmann,J.E. (2005). Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets. *J. Leukoc. Biol.* *77*, 689-698.

Dalod,M., Hamilton,T., Salomon,R., Salazar-Mather,T.P., Henry,S.C., Hamilton,J.D., and Biron,C.A. (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J. Exp. Med.* *197*, 885-898.

Dalod,M., Salazar-Mather,T.P., Malmgaard,L., Lewis,C., Asselin-Paturel,C., Briere,F., Trinchieri,G., and Biron,C.A. (2002). Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J. Exp. Med.* *195*, 517-528.

Datta,S.K., Redecke,V., Prilliman,K.R., Takabayashi,K., Corr,M., Tallant,T., DiDonato,J., Dziarski,R., Akira,S., Schoenberger,S.P., and Raz,E. (2003). A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J. Immunol.* *170*, 4102-4110.

de Heer,H.J., Hammad,H., Soullie,T., Hijdra,D., Vos,N., Willart,M.A., Hoogsteden,H.C., and Lambrecht,B.N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* *200*, 89-98.

- de Heusch,M., Blocklet,D., Egrise,D., Hauquier,B., Vermeersch,M., Goldman,S., and Moser,M. (2007). Bidirectional MHC molecule exchange between migratory and resident dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 82, 861-868.
- del Rio,M.L., Rodriguez-Barbosa,J.I., Kremmer,E., and Forster,R. (2007). *C. J. Immunol.* 178, 6861-6866.
- Della,B.S., Gennaro,M., Vaccari,M., Ferraris,C., Nicola,S., Riva,A., Clerici,M., Greco,M., and Villa,M.L. (2003). Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* 89, 1463-1472.
- den Haan,J.M. and Bevan,M.J. (2002). Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 196, 817-827.
- den Haan,J.M., Lehar,S.M., and Bevan,M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192, 1685-1696.
- Dercamp,C., Chemin,K., Caux,C., Trinchieri,G., and Vicari,A.P. (2005). Distinct and overlapping roles of interleukin-10 and CD25+ regulatory T cells in the inhibition of antitumor CD8 T-cell responses. *Cancer Res.* 65, 8479-8486.
- Di Domizio,J., Blum,A., Gallagher-Gambarelli,M., Molens,J.P., Chaperot,L., and Plumas,J. (2009). TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. *Blood* 114, 1794-1802.
- Di Pucchio,T., Chatterjee,B., Smed-Sorensen,A., Clayton,S., Palazzo,A., Montes,M., Xue,Y., Mellman,I., Banachereau,J., and Connolly,J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol.* 9, 551-557.
- Diebold,S.S., Kaisho,T., Hemmi,H., Akira,S., and Reis e Sousa (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- Dolan,B.P., Gibbs,K.D., Jr., and Ostrand-Rosenberg,S. (2006). Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8+ T cells. *J. Immunol.* 177, 6018-6024.
- Dudziak,D., Kamphorst,A.O., Heidkamp,G.F., Buchholz,V.R., Trumfheller,C., Yamazaki,S., Cheong,C., Liu,K., Lee,H.W., Park,C.G., Steinman,R.M., and Nussenzweig,M.C. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107-111.
- Duhen,T., Geiger,R., Jarrossay,D., Lanzavecchia,A., and Sallusto,F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10, 857-863.
- Dzionic,A., Fuchs,A., Schmidt,P., Cremer,S., Zysk,M., Miltenyi,S., Buck,D.W., and Schmitz,J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165, 6037-6046.

Dzionic, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y., and Schmitz, J. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum. Immunol.* *63*, 1133-1148.

Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y., and Schmitz, J. (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*, 1823-1834.

E

Edwards, A.D., Diebold, S.S., Slack, E.M., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., and Reis e Sousa (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* *33*, 827-833.

F

Facchetti, F., Wolf-Peeters, C., Mason, D.Y., Pulford, K., Van den Oord, J.J., and Desmet, V.J. (1988). Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am. J. Pathol.* *133*, 15-21.

Fallarino, F., Asselin-Paturel, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Fioretti, M.C., Trinchieri, G., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J. Immunol.* *173*, 3748-3754.

Fallarino, F., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Asselin-Paturel, C., Fioretti, M.C., Trinchieri, G., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2005). Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *Int. Immunol.* *17*, 1429-1438.

Fanning, S.L., George, T.C., Feng, D., Feldman, S.B., Megjugorac, N.J., Izaguirre, A.G., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2006). Receptor cross-linking on human plasmacytoid dendritic cells leads to the regulation of IFN-alpha production. *J. Immunol.* *177*, 5829-5839.

Feller, A.C., Lennert, K., Stein, H., Bruhn, H.D., and Wuthe, H.H. (1983). Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases. *Histopathology* *7*, 825-839.

Ferguson, T.A., Herndon, J., Elzey, B., Griffith, T.S., Schoenberger, S., and Green, D.R. (2002). Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8(+) T cells produce active immune unresponsiveness. *J. Immunol.* *168*, 5589-5595.

Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol. Ther.* *60*, 39-62.

Fonteneau, J.F., Gilliet, M., Larsson, M., Dasilva, I., Munz, C., Liu, Y.J., and Bhardwaj, N. (2003). Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* *101*, 3520-3526.

Fonteneau, J.F., Larsson, M., Beignon, A.S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y.J., Lifson, J.D., Littman, D.R., and Bhardwaj, N. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J. Virol.* *78*, 5223-5232.

Frleta, D., Yu, C.I., Klechevsky, E., Flamar, A.L., Zurawski, G., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2009). Influenza virus and poly(I:C) inhibit MHC class I-restricted presentation of cell-associated antigens derived from infected dead cells captured by human dendritic cells. *J. Immunol.* *182*, 2766-2776.

Fuchs, A., Cella, M., Kondo, T., and Colonna, M. (2005). Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood* *106*, 2076-2082.

Fugier-Vivier, I.J., Rezzoug, F., Huang, Y., Graul-Layman, A.J., Schanie, C.L., Xu, H., Chilton, P.M., and Ildstad, S.T. (2005). Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment. *J. Exp. Med.* *201*, 373-383.

G

Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* *92*, 4150-4166.

Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1996a). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells [published erratum appears in *Nat Med* 1996 Nov;2(11):1267]. *Nat. Med.* *2*, 1096-1103.

Gabrilovich, D.I., Ciernik, I.F., and Carbone, D.P. (1996b). Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell Immunol.* *170*, 101-110.

Gabrilovich, D.I., Corak, J., Ciernik, I.F., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1997). Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *3*, 483-490.

Gabrilovich, D.I., Ishida, T., Nadaf, S., Ohm, J.E., and Carbone, D.P. (1999). Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin. Cancer Res.* *5*, 2963-2970.

Gabrilovich, D.I., Nadaf, S., Corak, J., Berzofsky, J.A., and Carbone, D.P. (1996c). Dendritic cells in antitumor immune responses. II. Dendritic cells grown from bone marrow precursors, but not mature DC from tumor-bearing mice, are effective antigen carriers in the therapy of established tumors. *Cell Immunol.* *170*, 111-119.

Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F.J., Zal, T., and Gilliet, M. (2009). Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.* *206*, 1983-1994.

- Germain,R.N. and Margulies,D.H. (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* *11*, 403-450.
- Gerner,M.Y., Casey,K.A., and Mescher,M.F. (2008). Defective MHC class II presentation by dendritic cells limits CD4 T cell help for antitumor CD8 T cell responses. *J. Immunol.* *181*, 155-164.
- Gerner,M.Y. and Mescher,M.F. (2009). Antigen processing and MHC-II presentation by dermal and tumor-infiltrating dendritic cells. *J. Immunol.* *182*, 2726-2737.
- Gerosa,F., Gobbi,A., Zorzi,P., Burg,S., Briere,F., Carra,G., and Trinchieri,G. (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J. Immunol.* *174*, 727-734.
- GeurtsvanKessel,C.H., Willart,M.A., van Rijt,L.S., Muskens,F., Kool,M., Baas,C., Thielemans,K., Bennett,C., Clausen,B.E., Hoogsteden,H.C., Osterhaus,A.D., Rimmelzwaan,G.F., and Lambrecht,B.N. (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *205*, 1621-1634.
- Ghiringhelli,F., Puig,P.E., Roux,S., Parcellier,A., Schmitt,E., Solary,E., Kroemer,G., Martin,F., Chauffert,B., and Zitvogel,L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* *202*, 919-929.
- Gilliet,M., Cao,W., and Liu,Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 594-606.
- Gilliet,M. and Liu,Y.J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *195*, 695-704.
- Ginhoux,F., Collin,M.P., Bogunovic,M., Abel,M., Leboeuf,M., Helft,J., Ochando,J., Kissenpfennig,A., Malissen,B., Grisotto,M., Snoeck,H., Randolph,G., and Merad,M. (2007). Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J. Exp. Med.* *204*, 3133-3146.
- Girolomoni,G., Caux,C., Lebecque,S., Dezutter-Dambuyant,C., and Ricciardi-Castagnoli,P. (2002). Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells. *Trends Immunol.* *23*, 6-8.
- Gobert,M., Treilleux,I., Bendriss-Vermare,N., Bachelot,T., Goddard-Leon,S., Arfi,V., Biota,C., Doffin,A.C., Durand,I., Olive,D., Perez,S., Pasqual,N., Faure,C., Ray-Coquard,I., Puisieux,A., Caux,C., Blay,J.Y., and Menetrier-Caux,C. (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*, 2000-2009.
- Gondois-Rey,F., Dental,C., Halfon,P., Baumert,T.F., Olive,D., and Hirsch,I. (2009). Hepatitis C virus is a weak inducer of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells in comparison with influenza and human herpesvirus type-1. *PLoS. One.* *4*, e4319.

Gottfried,E., Kunz-Schughart,L.A., Ebner,S., Mueller-Klieser,W., Hoves,S., Andreesen,R., Mackensen,A., and Kreutz,M. (2006). Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* *107*, 2013-2021.

Goubier,A., Dubois,B., Gheit,H., Joubert,G., Villard-Truc,F., Asselin-Paturel,C., Trinchieri,G., and Kaiserlian,D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity*. *29*, 464-475.

Green,D.S., Lum,T., and Green,J.A. (2004). IgG-derived Fc down-regulates virus-induced plasmacytoid dendritic cell (pDC) IFN α production. *Cytokine* *26*, 209-216.

Grohmann,U., Volpi,C., Fallarino,F., Bozza,S., Bianchi,R., Vacca,C., Orabona,C., Belladonna,M.L., Ayroldi,E., Nocentini,G., Boon,L., Bistoni,F., Fioretti,M.C., Romani,L., Riccardi,C., and Puccetti,P. (2007). Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nat. Med.* *13*, 579-586.

Grouard,G., Rissoan,M.C., Filgueira,L., Durand,I., Banchereau,J., and Liu,Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* *185*, 1101-1111.

Guermonprez,P., Saveanu,L., Kleijmeer,M., Davoust,J., Van Endert,P., and Amigorena,S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* *425*, 397-402.

Guiducci,C., Vicari,A.P., Sangaletti,S., Trinchieri,G., and Colombo,M.P. (2005). Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res.* *65*, 3437-3446.

Gursel,M., Verthelyi,D., and Klinman,D.M. (2002). CpG oligodeoxynucleotides induce human monocytes to mature into functional dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *32*, 2617-2622.

H

Haeryfar,S.M. (2005). The importance of being a pDC in antiviral immunity: the IFN mission versus Ag presentation? *Trends Immunol.* *26*, 311-317.

Hamilton-Williams,E.E., Lang,A., Benke,D., Davey,G.M., Wiesmuller,K.H., and Kurts,C. (2005). Cutting edge: TLR ligands are not sufficient to break cross-tolerance to self-antigens. *J. Immunol.* *174*, 1159-1163.

Harding,C.V. and Song,R. (1994). Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol.* *153*, 4925-4933.

Hardy,A.W., Graham,D.R., Shearer,G.M., and Herbeuval,J.P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 17453-17458.

Hart,D.N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* *90*, 3245-3287.

- Hart,D.N. and Fabre,J.W. (1981). Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J. Exp. Med.* *154*, 347-361.
- Hartmann,E., Wollenberg,B., Rothenfusser,S., Wagner,M., Wellisch,D., Mack,B., Giese,T., Gires,O., Endres,S., and Hartmann,G. (2003). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* *63*, 6478-6487.
- Hemmi,H., Kaisho,T., Takeuchi,O., Sato,S., Sanjo,H., Hoshino,K., Horiuchi,T., Tomizawa,H., Takeda,K., and Akira,S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* *3*, 196-200.
- Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Henri,S., Vremec,D., Kamath,A., Waithman,J., Williams,S., Benoist,C., Burnham,K., Saeland,S., Handman,E., and Shortman,K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J. Immunol.* *167*, 741-748.
- Hernandez,J., Aung,S., Redmond,W.L., and Sherman,L.A. (2001). Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J. Exp. Med.* *194*, 707-717.
- Heufler,C., Koch,F., and Schuler,G. (1988). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* *167*, 700-705.
- Hildner,K., Edelson,B.T., Purtha,W.E., Diamond,M., Matsushita,H., Kohyama,M., Calderon,B., Schraml,B.U., Unanue,E.R., Diamond,M.S., Schreiber,R.D., Murphy,T.L., and Murphy,K.M. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* *322*, 1097-1100.
- Hoeffel,G., Ripoche,A.C., Matheoud,D., Nascimbeni,M., Escriou,N., Lebon,P., Heshmati,F., Guillet,J.G., Gannage,M., Caillat-Zucman,S., Casartelli,N., Schwartz,O., De la,S.H., Hanau,D., Hosmalin,A., and Maranon,C. (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* *27*, 481-492.
- Hoffmann,T.K., Muller-Berghaus,J., Ferris,R.L., Johnson,J.T., Storkus,W.J., and Whiteside,T.L. (2002). Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* *8*, 1787-1793.
- Honda,K., Ohba,Y., Yanai,H., Negishi,H., Mizutani,T., Takaoka,A., Taya,C., and Taniguchi,T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* *434*, 1035-1040.
- Honda,K. and Taniguchi,T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 644-658.
- Hou,S., Mo,X.Y., Hyland,L., and Doherty,P.C. (1995). Host response to Sendai virus in mice lacking class II major histocompatibility complex glycoproteins. *J. Virol.* *69*, 1429-1434.

Houde,M., Bertholet,S., Gagnon,E., Brunet,S., Goyette,G., Laplante,A., Princiotta,M.F., Thibault,P., Sacks,D., and Desjardins,M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.

Houot,R., Perrot,I., Garcia,E., Durand,I., and Lebecque,S. (2006). Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. *J. Immunol.* 176, 5293-5298.

Huang,A.Y., Bruce,A.T., Pardoll,D.M., and Levitsky,H.I. (1996a). In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity.* 4, 349-355.

Huang,A.Y., Golumbek,P., Ahmadzadeh,M., Jaffee,E., Pardoll,D., and Levitsky,H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264, 961-965.

Huang,M., Sharma,S., Mao,J.T., and Dubinett,S.M. (1996b). Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. *J. Immunol.* 157, 5512-5520.

Hugues,S., Mougneau,E., Ferlin,W., Jeske,D., Hofman,P., Homann,D., Beaudoin,L., Schrike,C., Von Herrath,M., Lehuen,A., and Glaichenhaus,N. (2002). Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells. *Immunity.* 16, 169-181.

Huysamen,C., Willment,J.A., Dennehy,K.M., and Brown,G.D. (2008). CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *J. Biol. Chem.* 283, 16693-16701.

I

Idoyaga,J., Moreno,J., and Bonifaz,L. (2007). Tumor cells prevent mouse dendritic cell maturation induced by TLR ligands. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 1237-1250.

Ishida,T., Oyama,T., Carbone,D.P., and Gabrilovich,D.I. (1998). Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors. *J. Immunol.* 161, 4842-4851.

Ito,T., Amakawa,R., Inaba,M., Hori,T., Ota,M., Nakamura,K., Takebayashi,M., Miyaji,M., Yoshimura,T., Inaba,K., and Fukuhara,S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J. Immunol.* 172, 4253-4259.

Ito,T., Hanabuchi,S., Wang,Y.H., Park,W.R., Arima,K., Bover,L., Qin,F.X., Gilliet,M., and Liu,Y.J. (2008). Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* 28, 870-880.

Ito,T., Kanzler,H., Duramad,O., Cao,W., and Liu,Y.J. (2006). Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood* 107, 2423-2431.

Ito,T., Yang,M., Wang,Y.H., Lande,R., Gregorio,J., Perng,O.A., Qin,X.F., Liu,Y.J., and Gilliet,M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* 204, 105-115.

Iyoda,T., Shimoyama,S., Liu,K., Omatsu,Y., Akiyama,Y., Maeda,Y., Takahara,K., Steinman,R.M., and Inaba,K. (2002). The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* *195*, 1289-1302.

J

Jaehn,P.S., Zaenker,K.S., Schmitz,J., and Dzionek,A. (2008). Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1822-1832.

Jahnsen,F.L., Lund-Johansen,F., Dunne,J.F., Farkas,L., Haye,R., and Brandtzaeg,P. (2000). Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123^{high}) dendritic cells in human nasal allergy. *J. Immunol.* *165*, 4062-4068.

Jahr,S., Hentze,H., Englisch,S., Hardt,D., Fackelmayer,F.O., Hesch,R.D., and Knippers,R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* *61*, 1659-1665.

Jakubzick,C., Tacke,F., Ginhoux,F., Wagers,A.J., van Rooijen,N., Mack,M., Merad,M., and Randolph,G.J. (2008). Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103⁺ and CD103⁻ pulmonary dendritic cell populations. *J. Immunol.* *180*, 3019-3027.

Jarrossay,D., Napolitani,G., Colonna,M., Sallusto,F., and Lanzavecchia,A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3388-3393.

Jego,G., Palucka,A.K., Blanck,J.P., Chalouni,C., Pascual,V., and Banchereau,J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* *19*, 225-234.

Jirmo,A.C., Nagel,C.H., Bohnen,C., Sodeik,B., and Behrens,G.M. (2009). Contribution of direct and cross-presentation to CTL immunity against herpes simplex virus 1. *J. Immunol.* *182*, 283-292.

Jung,S., Unutmaz,D., Wong,P., Sano,G., De los,S.K., Sparwasser,T., Wu,S., Vuthoori,S., Ko,K., Zavala,F., Pamer,E.G., Littman,D.R., and Lang,R.A. (2002). In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity.* *17*, 211-220.

K

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

Kadowaki,N., Ho,S., Antonenko,S., Malefyt,R.W., Kastelein,R.A., Bazan,F., and Liu,Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* *194*, 863-869.

Kalinski,P., Schuitemaker,J.H., Hilkens,C.M., and Kapsenberg,M.L. (1998). Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a⁺CD83⁺ dendritic cells: the levels of IL-

- 12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* *161*, 2804-2809.
- Kamogawa-Schifter, Y., Ohkawa, J., Namiki, S., Arai, N., Arai, K., and Liu, Y. (2005). Ly49Q defines 2 pDC subsets in mice. *Blood* *105*, 2787-2792.
- Kanazawa, N., Okazaki, T., Nishimura, H., Tashiro, K., Inaba, K., and Miyachi, Y. (2002). DCIR acts as an inhibitory receptor depending on its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J. Invest Dermatol.* *118*, 261-266.
- Kaplan, D.H., Jenison, M.C., Saeland, S., Shlomchik, W.D., and Shlomchik, M.J. (2005). Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity.* *23*, 611-620.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* *23*, 19-28.
- Katze, M.G., He, Y., and Gale, M., Jr. (2002). Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 675-687.
- Kawai, T. and Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1143*, 1-20.
- Kawamura, K., Kadowaki, N., Kitawaki, T., and Uchiyama, T. (2006). Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4+ cytotoxic regulatory T cells. *Blood* *107*, 1031-1038.
- Ke, Y. and Kapp, J.A. (1996). Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J. Exp. Med.* *184*, 1179-1184.
- Kemp, T.J., Elzey, B.D., and Griffith, T.S. (2003). 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.* *171*, 212-218.
- Kerkmann, M., Costa, L.T., Richter, C., Rothenfusser, S., Battiany, J., Hornung, V., Johnson, J., Englert, S., Ketterer, T., Heckl, W., Thalhammer, S., Endres, S., and Hartmann, G. (2005). Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon- α induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 8086-8093.
- Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (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*, 4465-4474.
- Kerksiek, K.M., Niedergang, F., Chavrier, P., Busch, D.H., and Brocker, T. (2005). Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo. *Blood* *105*, 742-749.

- Kiertscher,S.M., Luo,J., Dubinett,S.M., and Roth,M.D. (2000). Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte- derived dendritic cells [In Process Citation]. *J Immunol* *164*, 1269-1276.
- Kim,Y.M., Brinkmann,M.M., Paquet,M.E., and Ploegh,H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* *452*, 234-238.
- Kohrgruber,N., Groger,M., Meraner,P., Kriehuber,E., Petzelbauer,P., Brandt,S., Stingl,G., Rot,A., and Maurer,D. (2004). Plasmacytoid dendritic cell recruitment by immobilized CXCR3 ligands. *J. Immunol.* *173*, 6592-6602.
- Kolumam,G.A., Thomas,S., Thompson,L.J., Sprent,J., and Murali-Krishna,K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J. Exp. Med.* *202*, 637-650.
- Kool,M., van Nimwegen,M., Willart,M.A., Muskens,F., Boon,L., Smit,J.J., Coyle,A., Clausen,B.E., Hoogsteden,H.C., Lambrecht,B.N., and Hammad,H. (2009). An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation. *J. Immunol.* *183*, 1074-1082.
- Kovacsovic-Bankowski,M., Clark,K., Benacerraf,B., and Rock,K.L. (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 4942-4946.
- Kovacsovic-Bankowski,M. and Rock,K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* *267*, 243-246.
- Krug,A., French,A.R., Barchet,W., Fischer,J.A., Dzionek,A., Pingel,J.T., Orihuela,M.M., Akira,S., Yokoyama,W.M., and Colonna,M. (2004a). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity.* *21*, 107-119.
- Krug,A., Luker,G.D., Barchet,W., Leib,D.A., Akira,S., and Colonna,M. (2004b). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* *103*, 1433-1437.
- Krug,A., Towarowski,A., Britsch,S., Rothenfusser,S., Hornung,V., Bals,R., Giese,T., Engelmann,H., Endres,S., Krieg,A.M., and Hartmann,G. (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3026-3037.
- Krug,A., Uppaluri,R., Facchetti,F., Dorner,B.G., Sheehan,K.C., Schreiber,R.D., Cella,M., and Colonna,M. (2002). IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation. *J. Immunol.* *169*, 6079-6083.
- Krug,A., Veeraswamy,R., Pekosz,A., Kanagawa,O., Unanue,E.R., Colonna,M., and Cella,M. (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*, 899-906.

Kurts,C., Cannarile,M., Klebba,I., and Brocker,T. (2001). Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J. Immunol.* *166*, 1439-1442.

Kurts,C., Carbone,F.R., Barnden,M., Blanas,E., Allison,J., Heath,W.R., and Miller,J.F. (1997a). CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J. Exp. Med.* *186*, 2057-2062.

Kurts,C., Heath,W.R., Carbone,F.R., Allison,J., Miller,J.F., and Kosaka,H. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J. Exp. Med.* *184*, 923-930.

Kurts,C., Heath,W.R., Kosaka,H., Miller,J.F., and Carbone,F.R. (1998a). The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J. Exp. Med.* *188*, 415-420.

Kurts,C., Kosaka,H., Carbone,F.R., Miller,J.F., and Heath,W.R. (1997b). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* *186*, 239-245.

Kurts,C., Miller,J.F., Subramaniam,R.M., Carbone,F.R., and Heath,W.R. (1998b). Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.* *188*, 409-414.

Kurts,C., Sutherland,R.M., Davey,G., Li,M., Lew,A.M., Blanas,E., Carbone,F.R., Miller,J.F., and Heath,W.R. (1999). CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 12703-12707.

Kuwana,M., Kaburaki,J., Wright,T.M., Kawakami,Y., and Ikeda,Y. (2001). Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2547-2557.

L

Ladanyi,A., Kiss,J., Somlai,B., Gilde,K., Fejos,Z., Mohos,A., Gaudi,I., and Timar,J. (2007). Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol. Immunother.* *56*, 1459-1469.

Lambert,A.A., Gilbert,C., Richard,M., Beaulieu,A.D., and Tremblay,M.J. (2008). The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* *112*, 1299-1307.

Lambrecht,B.N., De Veerman,M., Coyle,A.J., Gutierrez-Ramos,J.C., Thielemans,K., and Pauwels,R.A. (2000). Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest* *106*, 551-559.

Lande,R., Gregorio,J., Facchinetti,V., Chatterjee,B., Wang,Y.H., Homey,B., Cao,W., Wang,Y.H., Su,B., Nestle,F.O., Zal,T., Mellman,I., Schroder,J.M., Liu,Y.J., and Gilliet,M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* *449*, 564-569.

- Larsen, C.P., Steinman, R.M., Witmer-Pack, M., Hankins, D.F., Morris, P.J., and Austyn, J.M. (1990). Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J. Exp. Med.* *172*, 1483-1493.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* *4*, 1009-1015.
- Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* *315*, 1398-1401.
- Lee, H.K., Zamora, M., Linehan, M.M., Iijima, N., Gonzalez, D., Haberman, A., and Iwasaki, A. (2009). Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. *J. Exp. Med.* *206*, 359-370.
- LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Reis e Sousa, Acha-Orbea, H., and Reith, W. (2004). MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat. Immunol.* *5*, 899-908.
- Lennert, K., Kaiserling, E., and Muller-Hermelink, H.K. (1975). Letter: T-associated plasma-cells. *Lancet* *1*, 1031-1032.
- Li, L., Liu, S., Zhang, T., Pan, W., Yang, X., and Cao, X. (2008). Splenic stromal microenvironment negatively regulates virus-activated plasmacytoid dendritic cells through TGF-beta. *J. Immunol.* *180*, 2951-2956.
- Li, M., Davey, G.M., Sutherland, R.M., Kurts, C., Lew, A.M., Hirst, C., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2001). Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J. Immunol.* *166*, 6099-6103.
- Lin, M.L., Zhan, Y., Proietto, A.I., Prato, S., Wu, L., Heath, W.R., Villadangos, J.A., and Lew, A.M. (2008). Selective suicide of cross-presenting CD8⁺ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 3029-3034.
- Lindstedt, M., Lundberg, K., and Borrebaeck, C.A. (2005). Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J. Immunol.* *175*, 4839-4846.
- Liu, C., Lou, Y., Lizee, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., Kim, G.J., Wang, Y.H., Ye, Y., Sikora, A.G., Overwijk, W.W., Liu, Y.J., Wang, G., and Hwu, P. (2008). Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J. Clin. Invest* *118*, 1165-1175.
- Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K., and Steinman, R.M. (2002). Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J. Exp. Med.* *196*, 1091-1097.
- Lou, Y., Liu, C., Kim, G.J., Liu, Y.J., Hwu, P., and Wang, G. (2007). Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses. *J. Immunol.* *178*, 1534-1541.

Lui,G., Manches,O., Angel,J., Molens,J.P., Chaperot,L., and Plumas,J. (2009). Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS. One.* 4, e7111.

Lund,J., Sato,A., Akira,S., Medzhitov,R., and Iwasaki,A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198, 513-520.

Lund,J.M., Alexopoulou,L., Sato,A., Karow,M., Adams,N.C., Gale,N.W., Iwasaki,A., and Flavell,R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 5598-5603.

M

Macatonia,S.E., Knight,S.C., Edwards,A.J., Griffiths,S., and Fryer,P. (1987). Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J. Exp. Med.* 166, 1654-1667.

Mahnke,K., Ring,S., Johnson,T.S., Schallenberg,S., Schonfeld,K., Storn,V., Bedke,T., and Enk,A.H. (2007). Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 37, 2117-2126.

Manches,O., Munn,D., Fallahi,A., Lifson,J., Chaperot,L., Plumas,J., and Bhardwaj,N. (2008). HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J. Clin. Invest* 118, 3431-3439.

Marigo,I., Dolcetti,L., Serafini,P., Zanovello,P., and Bronte,V. (2008). Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol. Rev.* 222, 162-179.

Martin,P., Del Hoyo,G.M., Anjuere,F., Arias,C.F., Vargas,H.H., Fernandez,L., Parrillas,V., and Ardavin,C. (2002). Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100, 383-390.

Martin,P., Del Hoyo,G.M., Anjuere,F., Ruiz,S.R., Arias,C.F., Marin,A.R., and Ardavin,C. (2000). Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood* 96, 2511-2519.

Martinelli,E., Cicala,C., Van Ryk,D., Goode,D.J., Macleod,K., Arthos,J., and Fauci,A.S. (2007). HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 3396-3401.

Martinez,d.H., Martin,P., Arias,C.F., Marin,A.R., and Ardavin,C. (2002). CD8alpha+ dendritic cells originate from the CD8alpha- dendritic cell subset by a maturation process involving CD8alpha, DEC-205, and CD24 up-regulation. *Blood* 99, 999-1004.

- Maurer, T., Heit, A., Hochrein, H., Ampenberger, F., O'Keeffe, M., Bauer, S., Lipford, G.B., Vabulas, R.M., and Wagner, H. (2002). CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *32*, 2356-2364.
- McBride, J.M., Jung, T., de Vries, J.E., and Aversa, G. (2002). IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol.* *215*, 162-172.
- McLellan, A.D., Kapp, M., Eggert, A., Linden, C., Bommhardt, U., Brocker, E.B., Kammerer, U., and Kampgen, E. (2002). Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. *Blood* *99*, 2084-2093.
- Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T., and Luster, A.D. (2005). Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest* *115*, 407-417.
- Menetrier-Caux, C., Montmain, G., Dieu, M.C., Bain, C., Favrot, M.C., Caux, C., and Blay, J.Y. (1998). Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* *92*, 4778-4791.
- Menetrier-Caux, C., Thomachot, M.C., Alberti, L., Montmain, G., and Blay, J.Y. (2001). IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells. *Cancer Res.* *61*, 3096-3104.
- Merad, M., Fong, L., Bogenberger, J., and Engleman, E.G. (2000). Differentiation of myeloid dendritic cells into CD8alpha-positive dendritic cells in vivo. *Blood* *96*, 1865-1872.
- Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 935-947.
- Meyer-Wentrup, F., Benitez-Ribas, D., Tacke, P.J., Punt, C.J., Figdor, C.G., de Vries, I.J., and Adema, G.J. (2008). Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood* *111*, 4245-4253.
- Moore, M.W., Carbone, F.R., and Bevan, M.J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* *54*, 777-785.
- Moron, G., Rueda, P., Casal, I., and Leclerc, C. (2002). CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. *J. Exp. Med.* *195*, 1233-1245.
- Moseman, E.A., Liang, X., Dawson, A.J., Panoskaltsis-Mortari, A., Krieg, A.M., Liu, Y.J., Blazar, B.R., and Chen, W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* *173*, 4433-4442.
- Mouries, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G., and Leclerc, C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* *112*, 3713-3722.

Munn,D.H., Sharma,M.D., Hou,D., Baban,B., Lee,J.R., Antonia,S.J., Messina,J.L., Chandler,P., Koni,P.A., and Mellor,A.L. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest* 114, 280-290.

N

Naik,S., Vremec,D., Wu,L., O'Keeffe,M., and Shortman,K. (2003). CD8alpha+ mouse spleen dendritic cells do not originate from the CD8alpha- dendritic cell subset. *Blood* 102, 601-604.

Nakano,H., Yanagita,M., and Gunn,M.D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 194, 1171-1178.

Narbutt,J., Lesiak,A., Zak-Prelich,M., Wozniacka,A., Sysa-Jedrzejowska,A., Tybura,M., Robak,T., and Smolewski,P. (2004). The distribution of peripheral blood dendritic cells assayed by a new panel of anti-BDCA monoclonal antibodies in healthy representatives of the polish population. *Cell Mol. Biol. Lett.* 9, 497-509.

Nefedova,Y., Huang,M., Kusmartsev,S., Bhattacharya,R., Cheng,P., Salup,R., Jove,R., and Gabrilovich,D. (2004). Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J. Immunol.* 172, 464-474.

Nestle,F.O., Burg,G., Fah,J., Wrone-Smith,T., and Nickoloff,B.J. (1997). Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am. J. Pathol.* 150, 641-651.

Nestle,F.O., Conrad,C., Tun-Kyi,A., Homey,B., Gombert,M., Boyman,O., Burg,G., Liu,Y.J., and Gilliet,M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *J. Exp. Med.* 202, 135-143.

Norbury,C.C., Chambers,B.J., Prescott,A.R., Ljunggren,H.G., and Watts,C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 280-288.

Norbury,C.C., Hewlett,L.J., Prescott,A.R., Shastri,N., and Watts,C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity.* 3, 783-791.

Norian,L.A., Rodriguez,P.C., O'Mara,L.A., Zabaleta,J., Ochoa,A.C., Cella,M., and Allen,P.M. (2009). Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+ T cell function via L-arginine metabolism. *Cancer Res.* 69, 3086-3094.

O

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

O'Donnell,R.K., Mick,R., Feldman,M., Hino,S., Wang,Y., Brose,M.S., and Muschel,R.J. (2007). Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. *Cancer Lett.* 255, 145-152.

O'Keeffe,M., Grumont,R.J., Hochrein,H., Fuchsberger,M., Gugasyan,R., Vremec,D., Shortman,K., and Gerondakis,S. (2005). Distinct roles for the NF-kappaB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 106, 3457-3464.

O'Keeffe,M., Hochrein,H., Vremec,D., Caminschi,I., Miller,J.L., Anders,E.M., Wu,L., Lahoud,M.H., Henri,S., Scott,B., Hertzog,P., Tatarczuch,L., and Shortman,K. (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* 196, 1307-1319.

O'Keeffe,M., Hochrein,H., Vremec,D., Scott,B., Hertzog,P., Tatarczuch,L., and Shortman,K. (2003). Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* 101, 1453-1459.

Obeid,M., Tesniere,A., Ghiringhelli,F., Fimia,G.M., Apetoh,L., Perfettini,J.L., Castedo,M., Mignot,G., Panaretakis,T., Casares,N., Metivier,D., Larochette,N., Van Endert,P., Ciccosanti,F., Piacentini,M., Zitvogel,L., and Kroemer,G. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* 13, 54-61.

Ochando,J.C., Homma,C., Yang,Y., Hidalgo,A., Garin,A., Tacke,F., Angeli,V., Li,Y., Boros,P., Ding,Y., Jessberger,R., Trinchieri,G., Lira,S.A., Randolph,G.J., and Bromberg,J.S. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* 7, 652-662.

Oldenborg,P.A., Zheleznyak,A., Fang,Y.F., Lagenaur,C.F., Gresham,H.D., and Lindberg,F.P. (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288, 2051-2054.

Olweus,J., BitMansour,A., Warnke,R., Thompson,P.A., Carballido,J., Picker,L.J., and Lund-Johansen,F. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12551-12556.

P

Palamara,F., Meindl,S., Holcman,M., Luhrs,P., Stingl,G., and Sibilina,M. (2004). Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J. Immunol.* 173, 3051-3061.

Palliser,D., Ploegh,H., and Boes,M. (2004). Myeloid differentiation factor 88 is required for cross-priming in vivo. *J. Immunol.* 172, 3415-3421.

Parolini,S., Santoro,A., Marcenaro,E., Luini,W., Massardi,L., Facchetti,F., Communi,D., Parmentier,M., Majorana,A., Sironi,M., Tabellini,G., Moretta,A., and Sozzani,S. (2007). The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood* 109, 3625-3632.

Peguet-Navarro,J., Sportouch,M., Popa,I., Berthier,O., Schmitt,D., and Portoukalian,J. (2003). Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J. Immunol.* *170*, 3488-3494.

Penna,G., Sozzani,S., and Adorini,L. (2001). Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* *167*, 1862-1866.

Penna,G., Vulcano,M., Sozzani,S., and Adorini,L. (2002). Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum. Immunol.* *63*, 1164-1171.

Perrot,I., Blanchard,D., Freymond,N., Isaac,S., Guibert,B., Pacheco,Y., and Lebecque,S. (2007). Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J. Immunol.* *178*, 2763-2769.

Pfeifer,J.D., Wick,M.J., Roberts,R.L., Findlay,K., Normark,S.J., and Harding,C.V. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* *361*, 359-362.

Pinzon-Charry,A., Ho,C.S., Laherty,R., Maxwell,T., Walker,D., Gardiner,R.A., O'Connor,L., Pyke,C., Schmidt,C., Furnival,C., and Lopez,J.A. (2005). A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. *Neoplasia.* *7*, 1112-1122.

Piqueras,B., Connolly,J., Freitas,H., Palucka,A.K., and Banchereau,J. (2006). Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* *107*, 2613-2618.

Pooley,J.L., Heath,W.R., and Shortman,K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J. Immunol.* *166*, 5327-5330.

Preynat-Seauve,O., Schuler,P., Contassot,E., Beermann,F., Huard,B., and French,L.E. (2006). Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection. *J. Immunol.* *176*, 61-67.

Puccetti,P. and Fallarino,F. (2008). Generation of T cell regulatory activity by plasmacytoid dendritic cells and tryptophan catabolism. *Blood Cells Mol. Dis.* *40*, 101-105.

Pulendran,B., Banchereau,J., Burkeholder,S., Kraus,E., Guinet,E., Chalouni,C., Caron,D., Maliszewski,C., Davoust,J., Fay,J., and Palucka,K. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J. Immunol.* *165*, 566-572.

Q

Qu,C., Nguyen,V.A., Merad,M., and Randolph,G.J. (2009). MHC class I/peptide transfer between dendritic cells overcomes poor cross-presentation by monocyte-derived APCs that engulf dying cells. *J. Immunol.* *182*, 3650-3659.

R

Ravichandran,K.S. and Lorenz,U. (2007). Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 964-974.

Regnault,A., Lankar,D., Lacabanne,V., Rodriguez,A., Thery,C., Rescigno,M., Saito,T., Verbeek,S., Bonnerot,C., Ricciardi-Castagnoli,P., and Amigorena,S. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189, 371-380.

Ridge,J.P., Di Rosa,F., and Matzinger,P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.

Rissoan,M.C., Soumelis,V., Kadowaki,N., Grouard,G., Briere,F., de Waal,M.R., and Liu,Y.J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.

Roake,J.A., Rao,A.S., Morris,P.J., Larsen,C.P., Hankins,D.F., and Austyn,J.M. (1995). Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J. Exp. Med.* 181, 2237-2247.

Robbins,S.H., Walzer,T., Dembele,D., Thibault,C., Defays,A., Bessou,G., Xu,H., Vivier,E., Sellars,M., Pierre,P., Sharp,F.R., Chan,S., Kastner,P., and Dalod,M. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9, R17.

Robinson,S.P., Patterson,S., English,N., Davies,D., Knight,S.C., and Reid,C.D. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 2769-2778.

Rock,K.L., Rothstein,L., Gamble,S., and Fleischacker,C. (1993). Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules. *J. Immunol.* 150, 438-446.

Rodriguez,A., Regnault,A., Kleijmeer,M., Ricciardi-Castagnoli,P., and Amigorena,S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 362-368.

Romani,N., Koide,S., Crowley,M., Witmer-Pack,M., Livingstone,A.M., Fathman,C.G., Inaba,K., and Steinman,R.M. (1989). Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 169, 1169-1178.

S

Sadaka,C., Marloie-Provost,M.A., Soumelis,V., and Benaroch,P. (2009). Developmental regulation of MHC II expression and transport in human plasmacytoid-derived dendritic cells. *Blood* 113, 2127-2135.

- Saito,H., Tsujitani,S., Ikeguchi,M., Maeta,M., and Kaibara,N. (1998). Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br. J. Cancer* 78, 1573-1577.
- Sakakura,K., Chikamatsu,K., Takahashi,K., Whiteside,T.L., and Furuya,N. (2006). Maturation of circulating dendritic cells and imbalance of T-cell subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 151-159.
- Salio,M., Cella,M., Suter,M., and Lanzavecchia,A. (1999). Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol.* 29, 3245-3253.
- Salio,M., Cella,M., Vermi,W., Facchetti,F., Palmowski,M.J., Smith,C.L., Shepherd,D., Colonna,M., and Cerundolo,V. (2003). Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur. J. Immunol.* 33, 1052-1062.
- Salio,M., Palmowski,M.J., Atzberger,A., Hermans,I.F., and Cerundolo,V. (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, 567-579.
- Salvadori,S., Martinelli,G., and Zier,K. (2000). Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity. *J. Immunol.* 164, 2214-2220.
- Sancho,D., Joffre,O.P., Keller,A.M., Rogers,N.C., Martinez,D., Hernanz-Falcon,P., Rosewell,I., and Reis e Sousa (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458, 899-903.
- Sancho,D., Mourao-Sa,D., Joffre,O.P., Schulz,O., Rogers,N.C., Pennington,D.J., Carlyle,J.R., and Reis e Sousa (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J. Clin. Invest* 118, 2098-2110.
- Sandel,M.H., Dadabayev,A.R., Menon,A.G., Morreau,H., Melief,C.J., Offringa,R., van der Burg,S.H., Janssen-van Rhijn,C.M., Ensink,N.G., Tollenaar,R.A., van de Velde,C.J., and Kuppen,P.J. (2005). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin. Cancer Res.* 11, 2576-2582.
- Sapozhnikov,A., Fischer,J.A., Zaft,T., Krauthgamer,R., Dzionek,A., and Jung,S. (2007). Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204, 1923-1933.
- Schlecht,G., Garcia,S., Escriou,N., Freitas,A.A., Leclerc,C., and Dadaglio,G. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation. *Blood* 104, 1808-1815.
- Schnorrer,P., Behrens,G.M., Wilson,N.S., Pooley,J.L., Smith,C.M., El Sukkari,D., Davey,G., Kupresanin,F., Li,M., Maraskovsky,E., Belz,G.T., Carbone,F.R., Shortman,K., Heath,W.R., and Villadangos,J.A. (2006). The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 10729-10734.
- Schnurr,M., Chen,Q., Shin,A., Chen,W., Toy,T., Jenderek,C., Green,S., Miloradovic,L., Drane,D., Davis,I.D., Villadangos,J., Shortman,K., Maraskovsky,E., and Cebon,J. (2005).

Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105, 2465-2472.

Schoenberger,S.P., Toes,R.E., van der Voort,E.I., Offringa,R., and Melief,C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.

Schroeder,J.T., Bieneman,A.P., Xiao,H., Chichester,K.L., Vasagar,K., Saini,S., and Liu,M.C. (2005). *J. Immunol.* 175, 5724-5731.

Schuler,G. and Steinman,R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161, 526-546.

Schulz,O., Diebold,S.S., Chen,M., Naslund,T.I., Nolte,M.A., Alexopoulou,L., Azuma,Y.T., Flavell,R.A., Liljestrom,P., and Reis e Sousa (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433, 887-892.

Schulz,O., Pennington,D.J., Hodivala-Dilke,K., Febbraio,M., and Reis e Sousa (2002). CD36 or alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins are not essential for MHC class I cross-presentation of cell-associated antigen by CD8 alpha+ murine dendritic cells. *J. Immunol.* 168, 6057-6065.

Schulz,O. and Reis e Sousa (2002). Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* 107, 183-189.

Schuurhuis,D.H., Ioan-Facsinay,A., Nagelkerken,B., van Schip,J.J., Sedlik,C., Melief,C.J., Verbeek,J.S., and Ossendorp,F. (2002). Antigen-antibody immune complexes empower dendritic cells to efficiently prime specific CD8+ CTL responses in vivo. *J. Immunol.* 168, 2240-2246.

Sciarra,A., Lichtner,M., Autran,G.A., Mastroianni,C., Rossi,R., Mengoni,F., Cristini,C., Gentilucci,A., Vullo,V., and Di Silverio,F. (2007). Characterization of circulating blood dendritic cell subsets DC123+ (lymphoid) and DC11C+ (myeloid) in prostate adenocarcinoma patients. *Prostate* 67, 1-7.

Seeds,R.E., Gordon,S., and Miller,J.L. (2009). Characterisation of myeloid receptor expression and interferon alpha/beta production in murine plasmacytoid dendritic cells by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.*

Segura,E., Guerin,C., Hogg,N., Amigorena,S., and Thery,C. (2007). CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J. Immunol.* 179, 1489-1496.

Shafer-Weaver,K.A., Watkins,S.K., Anderson,M.J., Draper,L.J., Malyguine,A., Alvord,W.G., Greenberg,N.M., and Hurwitz,A.A. (2009). Immunity to murine prostatic tumors: continuous provision of T-cell help prevents CD8 T-cell tolerance and activates tumor-infiltrating dendritic cells. *Cancer Res.* 69, 6256-6264.

Sharma,M.D., Baban,B., Chandler,P., Hou,D.Y., Singh,N., Yagita,H., Azuma,M., Blazar,B.R., Mellor,A.L., and Munn,D.H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest* 117, 2570-2582.

- Sharma,S., Stolina,M., Lin,Y., Gardner,B., Miller,P.W., Kronenberg,M., and Dubinett,S.M. (1999). T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J. Immunol.* *163*, 5020-5028.
- Sharma,S., Stolina,M., Yang,S.C., Baratelli,F., Lin,J.F., Atianzar,K., Luo,J., Zhu,L., Lin,Y., Huang,M., Dohadwala,M., Batra,R.K., and Dubinett,S.M. (2003). Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin. Cancer Res.* *9*, 961-968.
- Shiina,M. and Rehermann,B. (2008). Cell culture-produced hepatitis C virus impairs plasmacytoid dendritic cell function. *Hepatology* *47*, 385-395.
- Shin,A., Toy,T., Rothenfusser,S., Robson,N., Vorac,J., Dauer,M., Stuplich,M., Endres,S., Cebon,J., Maraskovsky,E., and Schnurr,M. (2008). P2Y receptor signaling regulates phenotype and IFN-alpha secretion of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *111*, 3062-3069.
- Siegal,F.P., Kadowaki,N., Shodell,M., Fitzgerald-Bocarsly,P.A., Shah,K., Ho,S., Antonenko,S., and Liu,Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* *284*, 1835-1837.
- Sigal,L.J., Crotty,S., Andino,R., and Rock,K.L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* *398*, 77-80.
- Smit,J.J., Lindell,D.M., Boon,L., Kool,M., Lambrecht,B.N., and Lukacs,N.W. (2008). The balance between plasmacytoid DC versus conventional DC determines pulmonary immunity to virus infections. *PLoS. One.* *3*, e1720.
- Smit,J.J., Rudd,B.D., and Lukacs,N.W. (2006). Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* *203*, 1153-1159.
- Smith,C.M., Belz,G.T., Wilson,N.S., Villadangos,J.A., Shortman,K., Carbone,F.R., and Heath,W.R. (2003). Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are preferentially involved in CTL priming after footpad infection with herpes simplex virus-1. *J. Immunol.* *170*, 4437-4440.
- Smith,C.M., Wilson,N.S., Waithman,J., Villadangos,J.A., Carbone,F.R., Heath,W.R., and Belz,G.T. (2004). Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat. Immunol.* *5*, 1143-1148.
- Smyth,L.A., Harker,N., Turnbull,W., El Doueik,H., Klavinskis,L., Kioussis,D., Lombardi,G., and Lechler,R. (2008). The relative efficiency of acquisition of MHC:peptide complexes and cross-presentation depends on dendritic cell type. *J. Immunol.* *181*, 3212-3220.
- Sombroek,C.C., Stam,A.G., Masterson,A.J., Lougheed,S.M., Schakel,M.J., Meijer,C.J., Pinedo,H.M., van den Eertwegh,A.J., Scheper,R.J., and de Gruijl,T.D. (2002). Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J. Immunol.* *168*, 4333-4343.

- Son, Y., Ito, T., Ozaki, Y., Tanijiri, T., Yokoi, T., Nakamura, K., Takebayashi, M., Amakawa, R., and Fukuhara, S. (2006). Prostaglandin E is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells. *Immunology*.
- Stary, G., Bangert, C., Tauber, M., Strohal, R., Kopp, T., and Stingl, G. (2007). Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1441-1451.
- Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* *9*, 271-296.
- Steinman, R.M., Adams, J.C., and Cohn, Z.A. (1975). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J. Exp. Med.* *141*, 804-820.
- Steinman, R.M. and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* *137*, 1142-1162.
- Steinman, R.M. and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* *139*, 380-397.
- Steinman, R.M., Gutchinov, B., Witmer, M.D., and Nussenzweig, M.C. (1983). Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J. Exp. Med.* *157*, 613-627.
- Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D., and Cohn, Z.A. (1979). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J. Exp. Med.* *149*, 1-16.
- Steinman, R.M., Lustig, D.S., and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.* *139*, 1431-1445.
- Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* *191*, 411-416.
- Steinman, R.M. and Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *75*, 5132-5136.
- Stent, G., Reece, J.C., Baylis, D.C., Ivinson, K., Paukovics, G., Thomson, M., and Cameron, P.U. (2002). Heterogeneity of freshly isolated human tonsil dendritic cells demonstrated by intracellular markers, phagocytosis, and membrane dye transfer. *Cytometry* *48*, 167-176.
- Stoitzner, P., Green, L.K., Jung, J.Y., Price, K.M., Atarea, H., Kivell, B., and Ronchese, F. (2008). Inefficient presentation of tumor-derived antigen by tumor-infiltrating dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* *57*, 1665-1673.
- Stoitzner, P., Tripp, C.H., Eberhart, A., Price, K.M., Jung, J.Y., Bursch, L., Ronchese, F., and Romani, N. (2006). Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 7783-7788.

Stolina,M., Sharma,S., Lin,Y., Dohadwala,M., Gardner,B., Luo,J., Zhu,L., Kronenberg,M., Miller,P.W., Portanova,J., Lee,J.C., and Dubinett,S.M. (2000). Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J. Immunol.* *164*, 361-370.

Stroinigg,N. and Srivastava,M.D. (2005). Modulation of toll-like receptor 7 and LL-37 expression in colon and breast epithelial cells by human beta-defensin-2. *Allergy Asthma Proc.* *26*, 299-309.

Sung,S.S., Fu,S.M., Rose,C.E., Jr., Gaskin,F., Ju,S.T., and Beaty,S.R. (2006). A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J. Immunol.* *176*, 2161-2172.

Suss,G. and Shortman,K. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* *183*, 1789-1796.

T

Tabarkiewicz,J., Rybojad,P., Jablonka,A., and Rolinski,J. (2008). CD1c+ and CD303+ dendritic cells in peripheral blood, lymph nodes and tumor tissue of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* *19*, 237-243.

Tai,L.H., Goulet,M.L., Belanger,S., Toyama-Sorimachi,N., Fodil-Cornu,N., Vidal,S.M., Troke,A.D., McVicar,D.W., and Makrigiannis,A.P. (2008). Positive regulation of plasmacytoid dendritic cell function via Ly49Q recognition of class I MHC. *J. Exp. Med.* *205*, 3187-3199.

Tai,L.H., Goulet,M.L., Belanger,S., Troke,A.D., St Laurent,A.G., Mesci,A., Toyama-Sorimachi,N., Carlyle,J.R., and Makrigiannis,A.P. (2007). Recognition of H-2K(b) by Ly49Q suggests a role for class Ia MHC regulation of plasmacytoid dendritic cell function. *Mol. Immunol.* *44*, 2638-2646.

Thomachot,M.C., Bendriss-Vermare,N., Massacrier,C., Biota,C., Treilleux,I., Goddard,S., Caux,C., Bachelot,T., Blay,J.Y., and Menetrier-Caux,C. (2004). Breast carcinoma cells promote the differentiation of CD34+ progenitors towards 2 different subpopulations of dendritic cells with CD1a(high)CD86(-)Langerin- and CD1a(+)-CD86(+)-Langerin+ phenotypes. *Int. J. Cancer* *110*, 710-720.

Thyrell,L., Erickson,S., Zhivotovsky,B., Pokrovskaja,K., Sangfelt,O., Castro,J., Einhorn,S., and Grander,D. (2002). Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* *21*, 1251-1262.

Touret,N., Paroutis,P., Terebiznik,M., Harrison,R.E., Trombetta,S., Pypaert,M., Chow,A., Jiang,A., Shaw,J., Yip,C., Moore,H.P., van der,W.N., Houben,D., Peters,P.J., de Chastellier,C., Mellman,I., and Grinstein,S. (2005). Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* *123*, 157-170.

Traver,D., Akashi,K., Manz,M., Merad,M., Miyamoto,T., Engleman,E.G., and Weissman,I.L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* *290*, 2152-2154.

Treilleux,I., Blay,J.Y., Bendriss-Vermare,N., Ray-Coquard,I., Bachelot,T., Guastalla,J.P., Bremond,A., Goddard,S., Pin,J.J., Barthelemy-Dubois,C., and Lebecque,S. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *10*, 7466-7474.

Tripp,R.A., Sarawar,S.R., and Doherty,P.C. (1995). Characteristics of the influenza virus-specific CD8+ T cell response in mice homozygous for disruption of the H-2IAb gene. *J. Immunol.* *155*, 2955-2959.

Troy,A.J., Summers,K.L., Davidson,P.J., Atkinson,C.H., and Hart,D.N. (1998). Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *4*, 585-593.

Tsuge,K., Takeda,H., Kawada,S., Maeda,K., and Yamakawa,M. (2005). Characterization of dendritic cells in differentiated thyroid cancer. *J. Pathol.* *205*, 565-576.

Tsukamoto,N., Okada,S., Onami,Y., Sasaki,Y., Umezawa,K., and Kawakami,Y. (2009). Impairment of plasmacytoid dendritic cells for IFN production by the ligand for immunoglobulin-like transcript 7 expressed on human cancer cells. *Clin. Cancer Res.* *15*, 5733-5743.

U

Urosevic,M., Dummer,R., Conrad,C., Beyeler,M., Laine,E., Burg,G., and Gilliet,M. (2005). Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid predendritic cells following imiquimod treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* *97*, 1143-1153.

V

Valladeau,J. and Saeland,S. (2005). Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.* *17*, 273-283.

van Mierlo,G.J., Boonman,Z.F., Dumortier,H.M., den Boer,A.T., Fransen,M.F., Nouta,J., van der Voort,E.I., Offringa,R., Toes,R.E., and Melief,C.J. (2004). Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8+ CTL to cause tumor eradication. *J. Immunol.* *173*, 6753-6759.

van Rijjt,L.S., Jung,S., Kleinjan,A., Vos,N., Willart,M., Duez,C., Hoogsteden,H.C., and Lambrecht,B.N. (2005). In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J. Exp. Med.* *201*, 981-991.

Vanbervliet,B., Bendriss-Vermare,N., Massacrier,C., Homey,B., de Bouteiller,O., Briere,F., Trinchieri,G., and Caux,C. (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.

Vermaelen,K.Y., Carro-Muino,I., Lambrecht,B.N., and Pauwels,R.A. (2001). Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J. Exp. Med.* *193*, 51-60.

Vermi,W., Bonecchi,R., Facchetti,F., Bianchi,D., Sozzani,S., Festa,S., Berenzi,A., Cella,M., and Colonna,M. (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., Vecchi, A., Franssen, J.D., Communi, D., Massardi, L., Sironi, M., Mantovani, A., Parmentier, M., Facchetti, F., and Sozzani, S. (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.

Vezys, V. and Lefrancois, L. (2002). Cutting edge: inflammatory signals drive organ-specific autoimmunity to normally cross-tolerizing endogenous antigen. *J. Immunol.* *169*, 6677-6680.

Vezys, V., Olson, S., and Lefrancois, L. (2000). Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. *Immunity.* *12*, 505-514.

Vicari, A.P., Chiodoni, C., Vaure, C., Ait-Yahia, S., Dercamp, C., Matsos, F., Reynard, O., Taverne, C., Merle, P., Colombo, M.P., O'Garra, A., Trinchieri, G., and Caux, C. (2002). Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J. Exp. Med.* *196*, 541-549.

Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K.M., Reeves, W.H., Bauer, S., and Krieg, A.M. (2005). Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med.* *202*, 1575-1585.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* *164*, 2978-2986.

W

Waithman, J., Allan, R.S., Kosaka, H., Azukizawa, H., Shortman, K., Lutz, M.B., Heath, W.R., Carbone, F.R., and Belz, G.T. (2007). Skin-derived dendritic cells can mediate deletional tolerance of class I-restricted self-reactive T cells. *J. Immunol.* *179*, 4535-4541.

Wall, E.M., Milne, K., Martin, M.L., Watson, P.H., Theiss, P., and Nelson, B.H. (2007). Spontaneous mammary tumors differ widely in their inherent sensitivity to adoptively transferred T cells. *Cancer Res.* *67*, 6442-6450.

Wang, H., Peters, N., and Schwarze, J. (2006). Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol.* *177*, 6263-6270.

Watanabe, M., Takagi, Y., Kotani, M., Hara, Y., Inamine, A., Hayashi, K., Ogawa, S., Takeda, K., Tanabe, K., and Abe, R. (2008). Down-regulation of ICOS ligand by interaction with ICOS functions as a regulatory mechanism for immune responses. *J. Immunol.* *180*, 5222-5234.

Watarai, H., Sekine, E., Inoue, S., Nakagawa, R., Kaisho, T., and Taniguchi, M. (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*, 2993-2998.

Wei,S., Kryczek,I., Zou,L., Daniel,B., Cheng,P., Mottram,P., Curiel,T., Lange,A., and Zou,W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 65, 5020-5026.

Weinlich,G., Heine,M., Stossel,H., Zanella,M., Stoitzner,P., Ortner,U., Smolle,J., Koch,F., Sepp,N.T., Schuler,G., and Romani,N. (1998). Entry into afferent lymphatics and maturation in situ of migrating murine cutaneous dendritic cells. *J. Invest Dermatol.* 110, 441-448.

Wilson,N.S. and Villadangos,J.A. (2004). Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol. Cell Biol.* 82, 91-98.

Wilson,N., I-Sukkari,D., Belz,G., Smith,C., Steptoe,R., Heath,W., Shortman,K., and Shortman,K. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood.*

Wollenberg,A., Wagner,M., Gunther,S., Towarowski,A., Tuma,E., Moderer,M., Rothenfusser,S., Wetzel,S., Endres,S., and Hartmann,G. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J. Invest Dermatol.* 119, 1096-1102.

Wu,L., D'Amico,A., Hochrein,H., O'Keeffe,M., Shortman,K., and Lucas,K. (2001). Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98, 3376-3382.

Y

Yoneyama,H., Matsuno,K., Toda,E., Nishiwaki,T., Matsuo,N., Nakano,A., Narumi,S., Lu,B., Gerard,C., Ishikawa,S., and Matsushima,K. (2005). Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J. Exp. Med.* 202, 425-435.

Yoneyama,H., Matsuno,K., Zhang,Y., Nishiwaki,T., Kitabatake,M., Ueha,S., Narumi,S., Morikawa,S., Ezaki,T., Lu,B., Gerard,C., Ishikawa,S., and Matsushima,K. (2004). Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int. Immunol.* 16, 915-928.

Young,L.J., Wilson,N.S., Schnorrer,P., Proietto,A., ten Broeke,T., Matsuki,Y., Mount,A.M., Belz,G.T., O'Keeffe,M., Ohmura-Hoshino,M., Ishido,S., Stoorvogel,W., Heath,W.R., Shortman,K., and Villadangos,J.A. (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* 9, 1244-1252.

Yu,S., Liu,C., Su,K., Wang,J., Liu,Y., Zhang,L., Li,C., Cong,Y., Kimberly,R., Grizzle,W.E., Falkson,C., and Zhang,H.G. (2007). Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *J. Immunol.* 178, 6867-6875.

Z

Zasloff,M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

Zhang,J., Raper,A., Sugita,N., Hingorani,R., Salio,M., Palmowski,M.J., Cerundolo,V., and Crocker,P.R. (2006). Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood* 107, 3600-3608.

Zou,W., Machelon,V., Coulomb-L'Hermin,A., Borvak,J., Nome,F., Isaeva,T., Wei,S., Krzysiek,R., Durand-Gasselín,I., Gordon,A., Pustilnik,T., Curiel,D.T., Galanaud,P., Capron,F., Emilie,D., and Curiel,T.J. (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* 7, 1339-1346.