



**HAL**  
open science

# Etude de l'efficacité et des mécanismes de la présentation croisée d'antigènes cellulaires tumoraux intacts par les cellules dendritiques

Camille Baey

► **To cite this version:**

Camille Baey. Etude de l'efficacité et des mécanismes de la présentation croisée d'antigènes cellulaires tumoraux intacts par les cellules dendritiques. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T054 . tel-00930283

**HAL Id: tel-00930283**

**<https://theses.hal.science/tel-00930283>**

Submitted on 3 Mar 2014

**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.

**Thèse de doctorat de l'Université Paris V- René Descartes  
Ecole Doctorale B3MI**

**Doctorat en sciences  
Spécialité : Immunologie**

Présentée par Camille BAEY  
Pour l'obtention du titre de docteur de l'Université Paris V

**Etude de l'efficacité et des mécanismes de la  
présentation croisée d'antigènes cellulaires tumoraux  
intacts par les cellules dendritiques**

Soutenue le 25 novembre 2013, devant le jury composé de :

Pr Eric Tartour

Pr Pascale Jeannin

Dr Joel Plumas

Dr Stéphanie Graff Dubois

Dr Anne Hosmalin

Dr Vincent Feuillet

Président

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse

Directeur de thèse

*« Il est des moments où il faut choisir entre vivre sa propre vie pleinement, entièrement, complètement, ou traîner l'existence dégradante, creuse et fausse que le monde, dans son hypocrisie, nous impose. »*

Oscar Wilde

# Remerciements

Je tiens à remercier Pascale Jeannin et Joel Plumas pour avoir accepté de rapporter mon travail de thèse, Stéphanie Graff-Dubois pour avoir accepté de participer à l'examen de ma thèse ainsi qu'Eric Tartour pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier Anne Hosmalin, ma directrice de thèse, de m'avoir accueillie au sein de son équipe et de l'Institut Cochin, sans qui cette formidable expérience n'aurait pu avoir lieu.

Je tiens particulièrement à remercier Vincent Feuillet, mon co-directeur de thèse. Inutile de te dire que sans toi et sans la confiance que tu m'as donnée, je ne serai pas où j'en suis. Tu es non seulement un bon scientifique, un passionné, un perfectionniste, un chouillat autoritaire au besoin, qui pousse toujours ses étudiants vers le haut : un vrai chef en somme, qui mérite sans aucun doute sa place dans ce monde. Tu es également une personne de confiance, un ami avec qui je peux discuter musique, art et autres sujets divers autour d'une bière sans jugement : merci Vincent pour ces années. Restes comme tu es et cours vite t'épanouir dans ce que tu aimes le plus !!

Un petit mot pour ma Diana, qui m'a aidée quand j'étais tout bébé (bien sûr, scientifiquement parlant) en master 2. Tu m'as appris et donné ton amour pour la science et je t'en remercie encore. Tu es et resteras une amie chère à mes yeux.

Merci à ceux qui sont partis. Charly, le fou de l'équipe. Tu es passionné et ultra drôle quand tu t'y mets !! Merci de m'avoir rendu le sourire à certains moments, mais Charly take it easy et arrête de trop stresser !!!! Arnaud avec qui je partage la passion pour la science et la musique : you rock !!! J'attends toujours de voir ton bébé avec ta basse en main ;). Alfredo, la gentillesse incarnée, avec qui j'ai discuté des heures au labo de tout, absolument tout : on attend tous de te revoir Mr le doc !!! Pauline, qui m'a soutenue lors de mon master 2 et qui a été de très bons conseils dans des moments pas faciles. Quitterie, nous nous sommes rapprochée pour une raison assez particulière et j'ai été agréablement surprise de découvrir qui tu es. Merci pour tes conseils et pour cette amitié naissante. Tu me dois cependant une virée à la Tour 13 (tu te débrouilles non mais !!).

Oui oui j'y viens !! Oh là là, aucune patience dis donc ☺ ! Mon équipe... Un point en commun ? Je crois qu'on est tous un peu fou à notre manière et c'est ce que j'ai tant aimé.

Mika, ou plutôt « poisson rouge » c'est bien aussi non ?! Merci d'avoir été présent durant mes quatre années au labo : tu as été là pour moi au moment où il le fallait et m'as fait rire un bon nombre de fois avec tes vidéos improbables !!! Mais le must Mika, c'est quand même la boîte de nuit « P2 » : musique qui fait trembler les murs avec toi qui danse, c'est juste un spectacle hilarant ! J'en rigole rien qu'à t'imaginer.

Sonia, tu es juste géniale : souriante, intelligente, entière (fais moi confiance sur ça), que j'adore malgré ton côté taré de faire des tableaux de malade que personne ne comprend (sérieux... Va falloir m'expliquer là !!). Je n'oublierai jamais nos confessions et fous rires (pas plus tard qu'hier d'ailleurs). Tu sais ce que je pense de toi, go ahead (et apprends moi ces fichus expressions « wech » !! Tu es en train de m'arnaquer là).

Lene, tu es une femme extraordinaire : dès qu'on a besoin de toi, tu es là (c'est pour ça que tu es notre « maman »). J'ai découvert une personne sensible, forte et déterminée dans la vie et ton aide à mes côtés m'a été d'un énorme réconfort. Attention aux apparences car on voit bien ton côté un peu fofolle, toujours prête à venir boire un coup ! A quand notre soirée délire ?!

Kahina, tu me fais rire avec tes histoires et ton tempérament de feu ! Ta force t'a permis d'arriver jusqu'ici, ne la perd pas. Tu es devenue une amie et une confidente qui me fera toujours sourire (surtout quand tu as un petit quelque chose à raconter, si tu vois ce que je veux dire ☺). Merci d'avoir été là pour moi.

Aux nouveaux de l'équipe : Marco, « come stai ? », l'Italie à Paris... Quel bonheur !! Souriant et bilingue en 1 an, well done ☺. Jennifer, la « Houla dancer » de l'équipe : you're amazing and crazy (in a good way obviously), and thanks for your words ! Stéphane, non... « minus » (pour une fois qu'il y a plus jeune que moi ☺) : enfin pire que moi niveau bière !! Yesssss !!! Benjamin, on ne se connaît pas encore, mais je soupçonne tout de même en toi un grain de folie qui te lie définitivement à cette équipe.

Merci à Yolande pour tes conseils bien avisés, à Gwenoline pour m'apporter un peu la joie et la folie de London !! A Pascale, pour m'aider dans l'entretien de cette fichue hotte ☺ et enfin à Agnès pour tes conseils sur mes manips.

Je tiens également à remercier tout le 8<sup>ème</sup> étage avec qui j'ai partagé d'énormes souvenirs, tant en soirées, qu'autour de notre super table à manger. Bruno (et ton merveilleux sens de l'humour), Cédric merci pour votre soutien lors de ma thèse, vos conseils bien placés m'ont beaucoup aidé. Mister Lucas, merci de m'avoir fait rire durant ces années et de m'avoir soutenue (je retiens tout de même une chose : ne jamais faire de pari avec toi !!). Nelly, je suis désolée mais tes origines te rattrapent et tu ne peux échapper à l'envie d'une bière et d'un petit palais breton, merci de m'en avoir fait profiter. Aurélie, quelle mini chef de ouf ! Tu gères sans aucuns doutes et merci pour ton gâteau au chocolat ! Arnaud, que j'aime appeler « monsieur raisin », tu es une personne adorable, un sportif sans relâche, un passionné de science et un musicien qui plus est !! Que demander de plus ?! Eclates toi aux States et n'oublies pas le raisin (mais le blanc, c'est très important ☺). Laetitia, ma bordélique adorée. Tu es une femme entière qui a toujours été là pour moi et qui m'a poussée à m'ouvrir lorsqu'il le fallait. Un souvenir restera à jamais en tête que je te décris en trois mots : manque, sol, pièce de culture... Laisse moi avec cet énorme fou rire. Llyod, tu nous apportes le soleil et la chaleur de ton île. Ta joie, ta bonne humeur et ta capacité à écouter les gens me surprendront toujours : t'es un mec en or ! Meriem, tu es une fille formidable qui se donne à fond pour ta passion. Continues à nous impressionner et merci pour « asos » ! Renée, tu m'as fait peur dès mon premier jour, puis j'ai découvert une personne complètement délirante avec qui j'ai aimé partager ma culture cellulaire (comme quoi c'est possible d'aimer la culture cell ☺). Enfin, Armelle, merci pour tes conseils sur mes manips et ton soutien lors de ces années.

Je tiens également à remercier le 3<sup>ème</sup> étage, nos amis immunologistes, pour m'avoir laissé squatter un bon nombre de fois durant ces années... Clin d'œil à Céline grâce à qui mes Western Blot rock, à Elisa, Houcine et Chloé pour votre aide et vos conseils en microscopie et votre soutien lors de mes derniers mois de thèse...

Merci à mes amis, les proches, les moins proches, ceux qui sont loin de moi et ceux qui sont à deux pas de moi, qui ont été là pour moi pour faire la fête, boire un verre, écouter mes malheurs, mes bonheurs, mes bêtises, mes folies. Tant de personnes à remercier, je ferai un clin d'œil à toi Christine, Myriam avec qui je tisse un lien fort depuis 10 ans (j'ai compté !!) ; « barbe rousse » (saches qu'il y a un chanteur qui s'appelle « barbarossa », donc

assumes ce fichu surnom et arrêtes de d'en\*\*\*\*\*), je te kiffe car tu es un ami complètement taré comme moi. A vous, Sonia, Téa, Euryale, Thomas qui êtes, malgré la distance, près de moi.

Merci à toi, qui m'a fait partager ta musique, notre passion commune, ton univers artistique, et ta joie. J'ai eu la chance de te connaître et d'aimer la passion que tu dégages dans divers domaines, le côté foufou que l'on partage et autres subtilités que toi seul connais. Ne changes pas. « Top of the city » est pour toi... Let's Δ Δ.

Shirley, tu me connais depuis mes 18 mois. Tu es ma famille, mon amie, et que sais-je encore. Ce lien incroyable que tu as gardé avec moi est un cadeau que peu de gens peuvent offrir. Tu es là où je suis et tu me manques terriblement à l'autre bout du monde...

Retour aux sources... Je vous épargne vos surnoms mais juste pour cette fois ☺. Merci maman pour toutes tes attentions quotidiennes qui bout à bout font incroyablement du bien. Merci papa pour me comprendre et m'avoir donné ta passion de la photo. Vous êtes chacun enrobé d'une force et d'une sensibilité qui m'ont toujours passionnées. Merci d'avoir toujours été là pour moi quand ça n'allait pas et de m'avoir ouvert votre porte et vos oreilles même lorsque je n'étais pas agréable (bon c'est pas si souvent quand même ☺). Et surtout merci d'être tarés !!!!! Et j'en ai des preuves mouahahahah !!!

Charlotte... C'est toujours très dur pour moi de te dire mes mots car ils sont assez personnels et me retournent l'esprit. Tu es ma grande sœur (on le sait tous ☺ donc arrêtes d'insister ça suffit maintenant !), ma moitié, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Je ne sais même plus quel mot utiliser pour te dire à quel point tu comptes pour moi, à quel point je te remercie d'être simplement qui tu es. Merci d'être là, de m'écouter des heures, d'être aussi délire que moi et de m'engueuler quand il faut. Beaucoup de choses nous lient meuf, et tu connais ma crainte la plus forte pour nous. Ne changes pas et profite de ta vie. J'ai trop hâte de partir avec toi en Australie babyyyyyyy... Enfin un rêve qui devient réalité !! Je t'aime.

J'aimerais finalement faire un clin d'œil à mon idole qui m'aide au quotidien avec sa voix et son univers dans lequel je me retrouve. A toi ma Kate Bush... Tu m'as aidé et m'aideras rien qu'à l'écoute de tes mots.

Je vais m'arrêter ici, et je m'excuse pour les personnes que j'ai pu oublier... Une chose est certaine (et même pour ces dernières) : je vous remercie tous de faire partie de moi. C'est une richesse que je me permets de conserver le plus longtemps possible.

# Résumé

Les cellules dendritiques (DC) sont spécialisées dans la capture, l'apprêtement et la présentation des antigènes. Elles ont développé une voie spécifique de présentation, la présentation croisée, leur permettant d'internaliser des antigènes exogènes, de les digérer et de les associer aux molécules du CMH de classe I afin de les présenter aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. La présentation croisée est essentielle à la présentation d'antigènes qui ne sont pas synthétisés directement dans les DC (antigènes du soi, de tumeurs, de microorganismes n'infectant pas les DC) et donc à l'établissement de réponses T CD8<sup>+</sup> anti-infectieuses ou anti-tumorales. Son étude est donc primordiale pour la vaccination et pour l'immunothérapie mettant en jeu une présentation par les DC.

Notre équipe a montré qu'à l'instar des cellules apoptotiques, les cellules vivantes sont une source d'antigènes efficace pour la présentation croisée par les DC *in vitro* et *in vivo*. Elle a ainsi montré que l'immunisation de souris avec des DC ayant capturé du matériel provenant de cellules vivantes permettait de protéger efficacement contre une tumeur dérivée de cellules de mélanome (B16) dans un protocole de type prophylactique. Durant ma thèse, j'ai pu montrer que cette immunisation était également très efficace dans un protocole de type thérapeutique. De façon surprenante, la protection et la réponse T CD8<sup>+</sup> obtenues en utilisant des cellules vivantes comme source d'antigènes sont meilleures que celles obtenues avec des cellules apoptotiques. Les DC cultivées avec des cellules donneuses d'antigènes, vivantes ou apoptotiques, expriment des niveaux équivalents de molécules de costimulation. En revanche, les DC cultivées avec des cellules apoptotiques sécrètent plus d'IL-10, leur conférant un phénotype plus tolérogène. De plus, nous avons également montré que les antigènes tumoraux étaient mieux préservés au sein des cellules vivantes que des cellules apoptotiques, et que la quantité de complexes CMH-I/peptide à la surface des DC après culture avec des cellules vivantes était plus importante qu'après culture avec des cellules apoptotiques.

Dans une seconde partie de ma thèse, je me suis attachée à caractériser les récepteurs et mécanismes impliqués dans le transfert d'antigènes provenant de cellules vivantes aux DC. J'ai pu montrer que ce transfert ne dépend ni de la sécrétion d'exosomes, ni du « cross-dressing ». En revanche, il est initié après un contact étroit avec les DC qui semble dépendre au moins en partie des récepteurs de type scavenger (SR) et de la calréticuline. Les images obtenues en microscopie suggèrent le passage de molécules de grande taille au sein d'une structure qui pourrait s'apparenter aux jonctions annulaires (*Annular Gap Junctions*). En effet, nous observons le passage de connexine 43 (Cx3) et de matériel cellulaire sous une conformation native (protéine GFP de 70kDa) provenant de la cellule vivante et colocalisant partiellement avec le marqueur d'endosomes précoces EEA-1 dans la DC. Cependant, l'utilisation de shRNA spécifique de la Cx43 indique que la présentation croisée ne nécessite pas son expression. Nos résultats suggèrent donc l'existence d'un mécanisme de communication intercellulaire permettant le passage d'antigènes de grande taille, qui pourraient ensuite être apprêtés par la DC.

# Liste des abréviations

ABC	ATP Binding Cassette
acLDL	acetylated Low Density Lipoprotein
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
AEP	Asparagine EndoPeptidase
AGE	advanced glycation end products
AP	Assemblage Proteins
APC	Antigen Presenting Cell
ARN	Acide RiboNucléique
ASGPR	ASialoGlycoProtein Receptor
ATP	Adenosine TriPhosphate
BAI1	Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1
Batf3	Basic leucine zipper transcription factor ATF like 3
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BCR	B Cell Receptor
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen
BIR	Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat
BMDC	Bone Marrow derived Dendritic Cell
BrdU	BromodéoxyUridine
BSA	Bovine Serum Albumine
CARD	CAspase Recruitment Domains
CD	Cluster of Differentiation
cDC	conventional Dendritic cell
CFSE	CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester
CHIP	Carboxylterminus of Hsc70-Interacting Protein
CLIP	Class II associated li Peptide
CLR	C type Lectin Receptor
CME	Clathrin Mediated Endocytosis
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPRG	ChloroPhenol Red- $\beta$ -D-Galactopyranoside
CRP	C Reactive Protein
CRT	Calreticuline
Cx	Connexine
DAMPs	Damage Associated Molecular Pattern
DC	Dendritic Cell
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DCIR	Dendritic Cell ImmunoReceptor
DFMO	ornithine decarboxylase inhibitor difluoromethylornithine
DNFB	Dinitrofluorobenzene
DRiPs	Defective Ribosomal Products
DTR	Diphtheric Toxine Receptor
EDTA	EthyleneDiamineTetra acetic Acid
EEA-1	Early Endosome Antigen 1
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



ELISPOT	Enzyme-Linked Immunospot
ERAAP	Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase associated with Antigen Processing
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation
ERGIC	ER-Golgi Intermediate Compartment
FACS	Fluorescence Activating Cell Sorting
FDA	Food and Drug Administration
FDC	Follicular Dendritic Cell
FoxP3	Forkhead box P3
G2A	G2 Accumulation protein
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage 34
Gas6	Growth arrest specific 6
GATA-3	GATA binding protein 3
GFP	Green Fluorescent Protein
GILT	Gamma Inducible Lysosomal Thiol reductase
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPI	GlycosylPhosphatidylInositol
HLA	Human Leucocyte Antigen
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP	Heat Shock Protein
IAP	Integrin-Associated Protein
ICAM-1	IntraCellular Adhesion Molecule 1
iE-DAP	$\gamma$ -D-glutamyl-meso-diAminoPimelic
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iPLA2	Phospholipase A2 calcium independent
IRAP	Insulin Regulated AminoPeptidase
IRF	Interferon Regulatory Factor
LAMP	Lysosomal Associated Membrane Protein
LC	Langerhans Cell
LDL	Low-Density Lipoprotein
LFA-3	Lymphocyte Function Associated Antigen 3
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology 2
li	light invariant chain
LOX-1	Lectin-like OXidized LDL receptor-1
LPC	LysoPhosphatidylCholine
LPS	Lipopolysaccharides
LRP	LDL Receptor-related Protein
LRR	Leucine-Rich-Repeat
MARCO	MAcrophage Receptor with COllagenous structure
MBL	Mannose Binding Lectin
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated gene 5
MDP	Muramyl DiPeptide
MECL-1	Multicatalytic Endopeptidase Complex-Like-1
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast

MFG-E8	Milk Fat Globule EGF factor 8
MIIC	MHC clasII Compartments
MLR	Mix Leukocyte Reaction
MSU	MonoSodium d'Urate
MVB	MultiVesicular Bodies
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (réduit)
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NLR	NOD Like Receptor
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
OVA	Ovalbumine
oxLDL	oxydised Low Density Lipoprotein
PAMPs	Pathogenes Associated Molecular Patterns
PAP	Prostatic Acid Phosphatase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	PhosphatidylCholine
pDC	plasmacytoid Dendritic Cell
PFA	Paraformaldehyde
PLC	Peptide Loading Complex
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PP1	Protein Phosphatase 1
PRRs	Pathogen Recognition Receptor
PS	Phosphatidylserine
PTX	Pentraxine
PVDF	PolyVinylidene Fluoride
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAP	Receptor Associated Protein
RE	Réticulum Endoplasmique
RIG	Retinoic acid Inducible Gene I
RIP	Rat Insulin Promoter
RLH	RIG-1-Like Helicases
RORγT	RAR-related Orphan Receptor γT
ROS	Reactive Oxygen Species
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
SAB	Sérum humain AB
SAP	Serum Amyloid Protein
SFC	Spots Forming Cells
SHP-1	Src Homology containing tyrosine Phosphatase 1
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	silenced RNA
Sirpα	Signal regulatory protein α
SNARE	Soluble NFS Attachment protein Receptor
SP	Surfactant Protein
SR	Scavenger Receptor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF	Sérum de Veau Feotal
T-bet	T-box transcription factor

TAA	Tumor Associated Antigen
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TCR	T Cell Receptor
TFn	Transferrine
TGFβ	Transforming Growth Factor β
Th	T helper
Tim	T cell immunoglobulin mucin protein
TLR	Toll Like Receptor
TLT2	(TREM)-Like protein 2
TNFB	Trinitrochlorobenzene
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TOP	Thimet OligoPeptidase
TPPII	TriPeptidyl Peptidase II
Tregs	T régulateurs
TRiC	TCP-1 Ring Complex
TSP	Thrombospondine
UTP	Uridine TriPhosphate
UV	UltraViolet
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
XCR1	XC Chemokine Receptor 1
β <sub>2</sub> -GPI	β <sub>2</sub> -glycoprotein I
β <sub>2</sub> m	β <sub>2</sub> microglobuline

# Table des matières

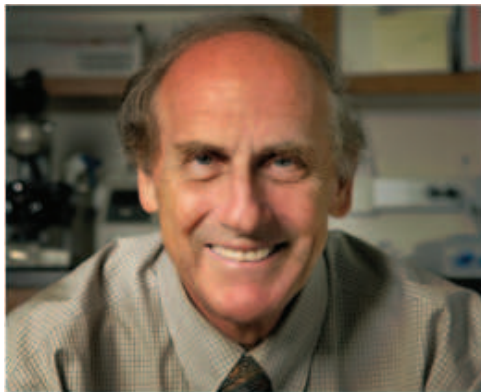
<b>Introduction.....</b>	<b>14</b>
1 Les cellules dendritiques : pivots du système immunitaire .....	15
1.1 Les cellules dendritiques : des APC pas comme les autres .....	16
1.2 Les sous types de cellules dendritiques .....	18
1.2.1 Les cellules dendritiques conventionnelles .....	19
1.2.1.1 Les DC migratoires des tissus non lymphoïdes .....	19
1.2.1.2 Les DC résidentes des tissus lymphoïdes .....	21
1.2.1.3 Les DC inflammatoires .....	22
1.2.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes .....	23
1.2.3 Les cellules dendritiques chez l'Homme .....	23
1.3 Le rôle central des cellules dendritiques dans le système immunitaire .....	24
1.3.1 Le rôle des cellules dendritiques dans l'immunité innée.....	24
1.3.2 Le rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative.....	26
1.4 Maturation des cellules dendritiques .....	28
2 La reconnaissance et la capture des antigènes par les cellules dendritiques .....	30
2.1 Reconnaissance des sources d'antigènes par les cellules dendritiques.....	30
2.1.1 Les signaux « find-me », « eat-me », « dont eat-me ».....	30
2.1.2 Les PAMPs et les DAMPs.....	39
2.1.3 Les PRRs .....	43
2.2 Mécanismes de capture et de transfert des antigènes par les cellules dendritiques.....	48
2.2.1 L'endocytose .....	48
2.2.2 Les jonctions gap.....	50
2.2.3 Les exosomes .....	53
2.2.4 La trogocytose et le nibbling.....	54
2.2.5 Le cross-dressing.....	55
3 La présentation antigénique .....	55
3.1 Présentation des antigènes associés aux molécules du CMH de classe II .....	55
3.1.1 Sources d'antigènes pour la présentation par les molécules du CMH de classe II .....	56
3.1.2 Génération des peptides se liant aux molécules du CMH de classe II .....	57
3.1.3 Chargement des peptides sur les molécules du CMH de classe II .....	58
3.2 Présentation des antigènes associés aux molécules du CMH de classe I .....	60
3.2.1 Sources d'antigènes pour la présentation par les molécules du CMH de classe I .....	60
3.2.2 Génération des peptides se liant aux molécules du CMH de classe I .....	62
3.2.3 Chargement des peptides sur les molécules du CMH de classe I .....	63
3.3 Présentation croisée des antigènes sur les molécules du CMH de classe I .....	65
3.3.1 Sources d'antigènes pour la présentation croisée.....	65

3.3.1.1	Les antigènes solubles .....	66
3.3.1.2	Les complexes immuns .....	66
3.3.1.3	Les antigènes particuliers.....	67
3.3.1.4	Les antigènes cellulaires .....	68
3.3.2	Les voies impliquées dans la présentation croisée .....	71
3.3.2.1	La voie cytosolique.....	72
3.3.2.1	La voie vacuolaire .....	73
3.3.3	Les cellules capables de faire la présentation croisée .....	75
3.3.3.1	Les cellules dendritiques résidentes CD8 $\alpha^+$ .....	75
3.3.3.2	Les cellules dendritiques migratoires CD103 $^+$ .....	76
3.3.3.3	Les autres cellules réalisant la présentation croisée.....	77
3.3.3.4	Caractéristique intrinsèque pour la présentation croisée .....	78
4	L'utilisation des cellules dendritiques en immunothérapie anti-tumorale .....	79
4.1	L'immunothérapie ciblant les cellules dendritiques .....	81
4.2	L'immunisation avec des cellules dendritiques .....	83
5	Objectif des travaux de thèse .....	85
	<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>87</b>
1	Souris.....	88
2	Anticorps, marquage cellulaire .....	88
3	Culture cellulaire .....	89
4	Expériences de présentation croisée .....	91
5	Analyse du mécanisme de capture de matériel cellulaire .....	91
6	Protection contre une épreuve tumorale <i>in vivo</i> .....	92
7	ELISPOT .....	92
8	Western Blot .....	93
9	ELISA.....	94
10	Microscopie à fluorescence .....	94
	<b>Résultats.....</b>	<b>95</b>
1	Protection contre l'implantation d'une tumeur dans un modèle thérapeutique .....	96
1.1	Les cellules dendritiques chargées avec des cellules vivantes de mélanome induisent une protection efficace contre une tumeur déjà installée .....	96
1.2	Les cellules dendritiques cultivées avec des cellules B16 apoptotiques produisent plus d'IL-10 que celles cultivées avec des cellules B16 vivantes.....	99
1.3	Les cellules vivantes améliorent la présentation croisée par les cellules dendritiques en conservant l'antigène sous sa forme native.....	102
2	Mécanismes impliqués dans le transfert et la présentation croisée des antigènes provenant de cellules vivantes .....	104

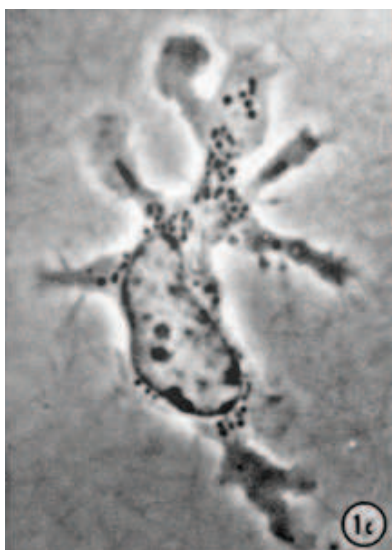
2.1	La capture de matériel provenant de cellules vivantes est dépendante du contact cellulaire, de la polymérisation de l'actine, des récepteurs de type scavenger et de la PI3Kinase.....	104
2.2	La présentation croisée à partir de cellules vivantes ne dépend pas des exosomes.....	106
2.3	Ce mécanisme de capture permet le transfert de molécules de grosse taille au sein de structures qui s'apparentent aux jonctions annulaires.....	108
2.4	La connexine 43 n'est pas nécessaire pour la présentation croisée d'OVA à partir de cellules vivantes ou apoptotiques.....	109
2.5	Le rôle des signaux « eat-me » et « don't eat-me » dans la capture de matériel provenant de cellules vivantes.....	112
2.6	Modèle de travail.....	114
	<b>Discussion.....</b>	<b>115</b>
1	Les cellules vivantes comme source d'antigènes en immunothérapie anti-tumorale.....	116
1.1	Qu'est-ce qui explique la meilleure immunogénicité des DC chargées avec des cellules vivantes ? .....	116
1.2	La conservation des antigènes sous leur forme native : est-ce une bonne chose ? .....	118
1.3	Cellules vivantes vs. cellules apoptotiques dans l'immunothérapie anti-tumorale.....	119
2	Mécanisme de capture des cellules vivantes .....	120
2.1	Existe-t-il des « Annular Gap Junction » sans Cx43 ? .....	121
2.2	Quid des signaux « eat-me » et « don't eat-me ».....	122
2.3	Qu'en est-il des autres molécules ? .....	124
2.4	S'agit-il vraiment d'un nouveau mécanisme ? .....	125
2.4.1	S'agit-il de phagoptose ?.....	125
2.4.2	S'agit-il de « nibbling » ?.....	125
3	Les cellules vivantes et la réponse immunitaire.....	126
3.1	De la cellule vivante à la cellule nécrotique : notion de continuum .....	126
3.2	Quelle pourrait être l'issue immunologique du transfert d'antigène à partir de cellules vivantes ? .....	127
3.2.1	Cellules vivantes et tolérance périphérique .....	129
3.2.2	Cellules vivantes et immunité.....	129
3.3	Existe-t-il un type de DC spécialisé dans la présentation croisée d'antigène provenant de cellules vivantes ?.....	131
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>132</b>
	<b>Annexe.....</b>	<b>162</b>

# Introduction

# 1 Les cellules dendritiques : pivots du système immunitaire



En 1973, Ralph Steinman (photo ci-contre) et Zanvil Cohn, qui étudiaient les cellules de la rate pour mieux comprendre comment se met en place une réponse immune, identifièrent une population de cellules ayant une morphologie et des mouvements différents des cellules adhérentes de la rate déjà connues (granulocytes, lymphocytes et macrophages)<sup>1</sup>. Parce que ces cellules possédaient des pseudopodes de taille, de longueur et de formes différentes, ainsi que des dendrites, ils les nommèrent « cellules dendritiques » (Figure 1). Ils montrèrent que ces cellules étaient présentes au niveau de la rate (environ 1% des cellules spléniques), des ganglions et des plaques de Peyer et qu'elles pouvaient être distinguées des macrophages. En effet, elles n'exprimaient pas l'ATPase, enzyme membranaire abondante et typique du macrophage, avaient peu de lysosomes, et possédaient de faibles capacités d'endocytose aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*<sup>2,3</sup>. De plus, ils montrèrent que ces cellules mouraient assez rapidement et avaient un temps de demi-vie court dans la rate, et suggérèrent qu'elles devaient provenir de précurseurs provenant de la moelle osseuse et de la rate. Dès 1974, ils proposèrent que les cellules dendritiques devaient avoir un rôle essentiel dans la réponse immunitaire puisque le développement de centre germinatif et la mise en place de la mémoire immunitaire étaient altérés suite à l'administration de stéroïdes ou de radiations ionisantes, auxquelles les DC sont particulièrement sensibles<sup>3</sup>.



**Figure 1 : Premières observations de la cellule dendritique.** Les cellules adhérentes de la rate ont été fixées avec de la glutaraldéhyde. Les cellules dendritiques sont facilement reconnaissables par leur morphologie, leur large noyau, leurs mitochondries sphériques, leurs dendrites de formes et de tailles différentes, ainsi que leur mouvement différent de celui des macrophages. D'après Steinman RM, Cohn Z, *The Journal of Experimental Medicine* 1974.



Depuis cette découverte, de nombreux laboratoires travaillent sur le développement, les fonctions et le rôle des DC dans l'immunité et la tolérance. Les travaux réalisés par ces laboratoires ont permis d'éclairer le caractère particulier de cette cellule présentatrice de l'antigène. Avec le temps, il apparaît de plus en plus évident que les DC jouent le rôle de véritables sentinelles, au carrefour de la réponse immunitaire innée et de la réponse adaptative. Comme nous le verrons, les capacités particulières des DC font également d'elles des cibles de choix pour la mise au point de thérapies vaccinales et de thérapies contre des pathogènes, des tumeurs ou encore des maladies auto-immunes. Dans mon introduction, je m'attacherai donc à mettre en lumière ce qui caractérise les DC et ce qui en fait des « championnes » de la présentation de l'antigène.

Au vue de l'importance de la découverte des DC, Ralph Steinman a reçu le Prix Nobel en « Physiologie ou Médecine » en 2011, juste avant son décès.

## 1.1 Les cellules dendritiques : des APC pas comme les autres

Les cellules présentatrices de l'antigène (APC) sont des cellules capables de capter un antigène et de le présenter aux lymphocytes T afin d'engendrer une réponse immunitaire contre cet antigène. Cette propriété découle principalement du fait qu'elles sont les seules à exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II).

Peu après la découverte des DC, celles-ci ont pu être purifiées de la rate pour étudier leurs fonctions. Une première étude entreprise en 1978 par Ralph Steinman et Margaret Witmer, a comparé la capacité des lymphocytes B, des macrophages et des DC à stimuler des lymphocytes T allogéniques au sein d'une réaction lymphocytaire mixe (MLR)<sup>4</sup>. Ils constatent alors que lorsque les lymphocytes B sont absents, la MLR n'est pas altérée. De même, lorsqu'ils utilisent une fraction de cellules enrichies en macrophages et dépourvue en DC, la MLR est quasiment inexistante. A l'inverse, les DC isolées sont capables d'engendrer une MLR 100 à 300 fois plus puissante que celle obtenue avec une population splénique totale. De ces observations, les DC ont alors été considérées comme les meilleures cellules stimulatrices de lymphocytes T. De même, une étude réalisée par Inaba *et al* quelques années plus tard montra que seules les DC spléniques, et dans une moindre mesure les cellules B blastiques (induites avec du LPS), mais ni les cellules B non stimulées, ni les macrophages traités avec de l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), n'étaient capables d'induire la prolifération de cellules allogéniques<sup>5</sup>. Cependant, lorsque les cellules T blastiques formées lors de ces MLRs étaient restimulées, toutes les APC étaient capables d'induire la

prolifération de ces cellules T. Cette étude a mis ainsi en évidence une distinction fonctionnelle entre la nécessité d'activer des cellules naïves et la restimulation de cellules déjà activées, propriété alors insoupçonnée.

Ces observations ont permis de démontrer que les DC étaient nécessaires à l'initiation de la réponse immunitaire, alors que les autres APC (macrophages et lymphocytes B) participeraient à l'amplification de cette réponse. Cette disparité entre les DC et les autres APC s'explique entre autres par une différence d'expression des molécules du CMH-II et des molécules de costimulation, ainsi qu'une localisation distincte<sup>6</sup>.

**Quelles sont plus précisément ces différences, et quelles caractéristiques possèdent ces APC ?**

- **Les lymphocytes B :** Ils possèdent de faibles capacités d'endocytose des antigènes, excepté via leurs immunoglobulines (Ig) membranaires qu'ils internalisent dans des compartiments d'endocytose après rencontre d'un antigène<sup>6,7</sup>. Ils expriment fortement les molécules du CMH-II, les molécules de costimulation et les molécules d'adhésion, Lymphocyte Function Associated Antigen 3 (LFA-3) et IntraCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), nécessaires à l'interaction avec les lymphocytes T<sup>6</sup>. Cependant, ils sont peu nombreux dans la zone T, ce qui leur empêcherait d'activer les lymphocytes T naïfs<sup>8</sup>.
- **Les macrophages :** Ils possèdent de très fortes capacités d'endocytose. Ils expriment des molécules du CMH-I et CMH-II, des molécules de costimulation, dont l'expression augmente lors de leur activation (par des cytokines inflammatoires ou des produits bactériens). Cependant, le niveau d'expression des molécules du CMH-II reste bien plus faible que celui des lymphocytes B et des DC<sup>6</sup>. De plus, les macrophages possèdent des organelles mieux adaptées à la digestion des microorganismes. Ceci explique en partie leur moins bonne efficacité à présenter l'antigène et stimuler les lymphocytes T<sup>6,9</sup>. Ils sont principalement localisés dans les tissus non lymphoïdes, et non dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires<sup>10</sup> (pulpe rouge de la rate, sinus sous capsulaire et médullaire des ganglions) : ces cellules auraient un rôle plus important dans l'activation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs que naïfs<sup>8</sup>.
- **Les cellules dendritiques :** Elles ont la capacité unique d'exister dans deux états : immature et mature (détaillé dans la partie 1.4 p.27). Elles ont la capacité de capturer très efficacement des antigènes en périphérie puis migrer dans les organes lymphoïdes secondaires. Lors de cette migration, l'expression de leurs molécules du

CMH-I, du CMH-II et de costimulation augmente considérablement, et l'antigène est apprêté très efficacement, ce qui permet une activation optimale des lymphocytes T naïfs<sup>6</sup>. Elles sont localisées aussi bien au niveau des tissus que dans les zones T des organes lymphoïdes<sup>11</sup>. Leur capacité à former des dendrites leur permettrait également de mieux interagir avec les lymphocytes T naïfs<sup>12</sup>.

C'est ainsi qu'est né le concept des DC comme sentinelles du système immunitaire, dont le rôle principal est de patrouiller dans les tissus et d'engendrer une réponse immunitaire adaptative. Elles sont aujourd'hui considérées comme les APC professionnelles.

## 1.2 Les sous types de cellules dendritiques

Les DC forment un réseau de cellules complexes et hétérogènes. Bien qu'elles soient toutes capables de capturer, de prendre en charge et de présenter des antigènes, les DC diffèrent par leur développement, leur localisation et leurs fonctions. Deux principales populations de DC ont été décrites chez la souris et l'homme : les DC conventionnelles (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC)<sup>13,14</sup> (Tableau 1).

	pDC	DC inflammatoires	DC résidentes des organes lymphoïdes		DC migratoires		
			DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	DC CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>	DC CD103 <sup>+</sup>	DC CD103 <sup>-</sup>	Langerhans
<b>Phénotype</b>	CD11c <sup>faible</sup> CMH-II <sup>faible</sup> B220 <sup>+</sup> SiglecH <sup>+</sup>	Ly6C <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CMH-II <sup>+</sup> CD11c <sup>int</sup>	CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD11b <sup>-</sup> Clec9a <sup>+</sup> CD205 <sup>fort</sup>	CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Clec9a <sup>-</sup> CD205 <sup>faible</sup>	CMH-II <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> Clec9a <sup>+</sup>	CMH-II <sup>+</sup> CD103 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> Clec9a <sup>-</sup>	CMH-II <sup>+</sup> CD11c <sup>int</sup> CD11b <sup>+</sup> CD205 <sup>fort</sup> Langerin <sup>fort</sup> Sirpa <sup>+</sup>
<b>Localisation</b>	Sang organes lymphoïdes	Tissus périphériques Organes lymphoïdes	Organes lymphoïdes Rate : zone T et marginale	Organes lymphoïdes Rate : zone marginale et pulpe rouge	Tissus périphériques : peau, tractus intestinal, poumons, foie, reins, etc		Epithéliums pluristratifiés (peau, muqueuses)
<b>Fonctions</b>	Production IFN type I Immunité antivirale	Présentation antigénique	Présentation croisée	Présentation classique de classe II	Capture antigénique Migration Présentation croisée	Capture antigénique Migration Présentation classe II	Capture antigénique Rôle dans l'immunité ?
<b>Equivalent chez l'homme</b>	pDC BDCA-2 <sup>+</sup>	-	DC CD141 <sup>+</sup> ou BDCA-3 <sup>+</sup>	DC CD1c <sup>+</sup> ou BDCA-1 <sup>+</sup>	-	-	LC

**Tableau 1 : Phénotypes, localisations et fonctions des différents sous types de DC.** Récapitulatif non exhaustif de quelques caractéristiques des DC qui seront développées ci après. Les DC équivalentes chez l'homme sont indiquées pour certaines des populations.

### 1.2.1 Les cellules dendritiques conventionnelles

Les cDC forment une petite population d'origine hématopoïétique qui occupe la plupart des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. En se basant sur des critères développemental, phénotypique et fonctionnel, les cDC peuvent être divisées en trois populations : les DC migratoires des tissus non lymphoïdes, les DC résidentes des tissus lymphoïdes et les DC inflammatoires<sup>15,16</sup>.

#### 1.2.1.1 Les DC migratoires des tissus non lymphoïdes

Ces cellules sont capables de capturer des antigènes et de migrer de la périphérie vers les ganglions drainants par les vaisseaux lymphatiques afférents, où elles peuvent initier une réponse immunitaire (directement ou en transmettant l'antigène aux DC résidentes des tissus lymphoïdes). Elles représentent environ 50% des DC des ganglions mais sont absentes de la rate et du thymus. En effet, ces organes ne reçoivent pas de vaisseaux lymphatiques afférents<sup>17,18</sup>. Il existe trois sous-types de DC migratoires : les cellules de Langerhans (LC), les DC périphériques CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> et les DC CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>.

**Les cellules de Langerhans (LC) :** Ces cellules sont retrouvées dans les épithéliums pluristratifiés, notamment dans l'épiderme et les différentes muqueuses de l'organisme. Elles représentent de 3 à 5% des cellules de l'épiderme chez la souris adulte, avec une densité de 700 LCs par mm<sup>2</sup><sup>19</sup>.

Des travaux de Merad *et al*<sup>20</sup> ont montré à l'aide de souris chimères, parabiotiques et en condition non inflammatoire, que les LC étaient résistantes à l'irradiation  $\gamma$  et que ni les précurseurs de la moelle osseuse ni ceux de la circulation sanguine n'étaient recrutés au niveau de la peau. Leur maintien à un nombre constant serait l'effet d'un renouvellement par des précurseurs présents au sein même de la peau. Au contraire, en condition inflammatoire (après irradiation UV), des précurseurs sont bien recrutés au site d'inflammation. Finalement, ils montrent par incorporation de BrdU dans l'épiderme, que ces cellules ont une longue durée de vie dans la peau (environ 3 semaines).

Les LCs sont caractérisées par la présence de granules de Birbeck, composés majoritairement de la langerine (CD207) (un récepteur du groupe des lectines de type C), devenu le marqueur par excellence de ces cellules. Phénotypiquement, Les LCs sont ainsi caractérisées : CMH-II<sup>+</sup> CD11c<sup>intermédiaire</sup> CD11b<sup>+</sup> CD205<sup>fort</sup> langerine<sup>fort</sup> Sirp $\alpha$ <sup>+16</sup>.

La fonction des LCs n'est pas encore totalement comprise. Les premières études ont été réalisées *in vitro*, mais depuis quelques années, des expériences *in vivo* se développent grâce aux modèles permettant d'éliminer spécifiquement les LCs. Ainsi, la déplétion des LCs dans une souris exprimant le récepteur de la toxine diphtérique (DTR) sous le promoteur de la langerine, ne semble pas affecter la réponse immunitaire contre le dinitrofluorobenzène (DNFB) introduit dans la peau<sup>21</sup>. Cependant, dans une autre étude, la déplétion spécifique semble diminuer la réponse allergique provoquée par l'administration de trinitrochlorobenzène (TNFB), suggérant un rôle négatif de ces cellules dans la résolution d'une réaction allergique<sup>22</sup>.

**Les cellules migratoires CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> et CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>**: Ces cellules sont retrouvées dans les différents tissus périphériques tels que la peau (on les appelle alors les DC dermiques puisqu'elles sont situées dans le derme), le tractus intestinal, les poumons, le foie ou encore les reins<sup>23</sup>.

Deux études ont montré qu'il existait dans la peau d'autres cellules migratoires que les LCs. Dans une première étude réalisée par l'équipe de B. Malissen<sup>24</sup>, l'utilisation de souris chimériques a permis d'identifier la présence de deux types de cellules langerine<sup>+</sup> EGFP<sup>+</sup> et langerine<sup>+</sup> EGFP<sup>-</sup> colocalisant la zone T dans les ganglions sous cutanés. L'expression du récepteur de la toxine diphtérique sous le promoteur du gène de la langerine dans ces chimères indique, qu'après administration de la toxine diphtérique, la population langerine<sup>+</sup> EGFP<sup>+</sup> se retrouve dans le derme et non l'épiderme. Ceci implique que cette population a une origine différente de celle des LCs. Dans une seconde étude, les auteurs montrent que ces cellules sont sensibles aux irradiations  $\gamma$  et représentent la majorité des cellules des ganglions cutanés. Ils sous-divisent les cellules dermiques en deux catégories en fonction de leur expression du CD11b et de CD103 (intégrine  $(\alpha E)-\beta 7$ )<sup>25</sup>. Elles sont aussi observées dans les poumons, le foie, les îlots pancréatiques et les reins, suggérant ainsi que ces cellules seraient les DC interstitielles de l'organisme<sup>26</sup>.

Ces cellules migratoires répondent au « paradigme des cellules de Langerhans », c'est à dire qu'elles migrent des tissus périphériques aux ganglions où elles présentent un phénotype mature (expliqué dans le chapitre 1.4 p.27)<sup>27</sup>. Cette migration et la maturation qui l'accompagne sont également observées dans des souris « germ free » (ne présentant pas de pathogènes), indiquant donc que ces processus sont indépendants de la présence de pathogènes mais qu'ils seraient en revanche potentialisés par leur présence<sup>28</sup>. Bien que la plupart des cellules migratoires meurent une fois leur fonction terminée dans les ganglions, il n'est pas exclu que certaines s'échappent dans la circulation sanguine via les vaisseaux lymphatiques efférents où elles peuvent contribuer à la réponse immunitaire dans d'autres tissus (comme la rate)<sup>11</sup>.

Beaucoup d'études se sont focalisées sur la population CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>. Elle semble être impliquée dans l'initiation et/ou la régulation des réponses immunitaires, en fonction du tissu dans lequel elle se localise<sup>23</sup>, et peut réaliser efficacement la présentation croisée d'antigènes<sup>29</sup> (fonction détaillée dans le chapitre 3.3.3.2, p75). A l'inverse, peu de travaux se sont vraiment intéressés aux DC CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>.

Finalement, il est largement considéré que les cellules CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> sont en étroite relation avec les cellules CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>CD205<sup>+</sup> résidentes des organes lymphoïdes secondaires, aussi bien en termes de développement que de spécificité fonctionnelle. Par exemple, dans des souris déficientes pour le facteur de transcription Batf3, nécessaire au développement des DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, les cellules CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> sont absentes de la peau, des poumons et de la lamina propria<sup>30</sup>.

### 1.2.1.2 Les DC résidentes des tissus lymphoïdes

Ces cellules se différencient et résident continuellement au sein des tissus lymphoïdes. Dans les ganglions, elles partagent l'environnement avec les DC migratoires alors que dans la rate et le thymus, elles occupent la totalité des compartiments consacrés aux DC<sup>16</sup>.

Deux types principaux de DC résidentes sont retrouvées dans les organes lymphoïdes et diffèrent par l'expression des molécules CD4 et CD8 $\alpha$ <sup>31</sup> : les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> Clec9a<sup>+</sup> CD205<sup>fort</sup> et les DC CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Clec9a<sup>-</sup> CD205<sup>faible</sup>. Cette dernière population est prédominante parmi les DC des organes lymphoïdes, tandis que la première représente de 20 à 40% des DC de la rate et des ganglions<sup>16</sup>. Nous pouvons également noter l'existence d'une troisième population, les DC CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD205<sup>faible</sup>, souvent confondue avec les DC CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>.

La localisation de ces cellules au sein des organes lymphoïdes est bien définie : les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> sont localisées dans la zone T et la zone marginale, alors que les DC CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> sont localisées dans la zone marginale et la pulpe rouge de la rate. Cependant, ces deux populations sont capables de migrer dans la zone T après activation<sup>32</sup>.

Ces cellules ne répondent pas au « paradigme des cellules de Langerhans » puisqu'elles sont retrouvées dans un état phénotypiquement immature tout au long de leur vie en condition non inflammatoire. En effet, elles expriment moins de molécules du CMH-II et de costimulation (ce qui permet de les distinguer des DC migratoires dans les ganglions). Elles peuvent néanmoins mûrir lors de leur rencontre avec des agents microbiens, tels que le lipopolysaccharide (LPS)<sup>33</sup>. Des expériences utilisant le BrdU indiquent que, dans la rate, ces cellules ont une durée de vie assez courte, d'environ 3 à 4 jours<sup>34</sup>.

Finalement, ces deux sous types de DC semblent présenter des fonctions différentes. Les DC CD8 $\alpha^+$  CD4 $^-$  seraient spécialisées dans les fonctions de capture d'antigènes pour la présentation croisée (fonction détaillée dans le chapitre 3.3.3.1 p73)<sup>35</sup>. Au contraire, les DC CD8 $\alpha^-$  CD4 $^+$  auraient un rôle prédominant dans la présentation par les molécules du CMH-II. Cette spécialisation serait en partie due à l'expression préférentielle de molécules impliquées dans l'une ou l'autre des voies de présentation<sup>36</sup>.

### 1.2.1.3 Les DC inflammatoires

Les DC inflammatoires, retrouvées dans les tissus périphériques, correspondent aux DC dérivées de monocytes (moDC) qui se développent en réponse à une inflammation. Elles disparaîtraient une fois l'inflammation résolue<sup>16</sup>. Des travaux réalisés par León *et al*<sup>37</sup> ont montré que lors d'une infection par *Leishmania major*, des monocytes étaient recrutés au niveau du derme et se différenciaient en « DC dermiques dérivées de monocytes ». Ces cellules étaient ensuite capables de migrer dans les ganglions drainants afin de stimuler les lymphocytes T spécifiques de *L. major*. Cette étude met en lumière le rôle important de la formation *de novo* de DC inflammatoires dans le contrôle de l'immunité contre certains pathogènes.

Le phénotype de ces cellules dépend de la nature du stimulus ou encore du tissu dans lequel elles se différencient. Cependant, elles peuvent être caractérisées comme étant Ly6C $^+$  CD11b $^+$  CMH-II $^+$  CD11c<sup>intermédiaire</sup>, bien que l'expression de Ly6C soit fortement diminuée lorsque les cellules entrent dans les tissus lymphoïdes (rendant la distinction assez difficile avec les DC CD8 $\alpha^-$  CD4 $^+$  CD11b $^+$  résidentes)<sup>16,38</sup>.

Ces cellules semblent être dépendantes du facteur de croissance GM-CSF (granulocyte monocyte colony stimulating factor), puisqu'elles ne sont pas présentes dans des souris génétiquement modifiées et déficientes pour le récepteur du GM-CSF (même après inflammation)<sup>39</sup>. Chez l'Homme, ces cellules peuvent être générées à partir de monocytes du sang périphérique stimulés en présence de GM-CSF et d'IL-4<sup>40</sup>. En revanche, chez la souris, les cellules générées à partir de la moelle osseuse en présence de GM-CSF seul, permettent d'obtenir une population similaire aux DC inflammatoires. La grande quantité de cellules obtenues après culture fait d'elles les plus utilisées en immunothérapie basée sur les DC ou pour des études *in vitro*.

Finalement, on suppose que ces cellules représentent une source de DC de « secours », générées lors d'une inflammation pour lutter plus efficacement contre un pathogène.

### **1.2.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes**

Les DC plasmacytoïdes (pDC) représentent une faible population qui s'accumule principalement dans le sang et les organes lymphoïdes. C'est d'ailleurs par voie sanguine qu'elles pénètrent dans ces organes. Les pDC sont caractérisées phénotypiquement comme étant CD11c<sup>low</sup> CMH-II<sup>low</sup> B220<sup>+</sup> SiglecH<sup>+</sup> (SiglecH étant une lectine de type C)<sup>16</sup>, et elles se trouvent essentiellement au niveau de la zone marginale et les zones T de la rate<sup>41</sup>.

Ces cellules sont connues pour sécréter de fortes quantités d'interféron de type I (IFN- $\alpha/\beta$ ), cytokine antivirale par excellence. Cette production est la conséquence de la détection de motifs viraux, grâce à l'expression de récepteurs de type Toll (TLRs) endosomaux (TLR7 et TLR9). Après stimulation via ces TLRs, les pDC ont aussi la capacité de sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), et sont également capables de présenter l'antigène<sup>42</sup>.

Les pDC se distinguent facilement des cDC par leur morphologie à l'état quiescent. En effet, elles ont un aspect plasmacytoïde (comme leur nom l'indique), c'est à dire qu'elles ont une forme arrondie avec un développement important de réticulum endoplasmique rappelant la morphologie des cellules sécrétrices d'anticorps, ou plasmocytes. Elles perdent ensuite leur morphologie plasmacytoïde après activation et développent alors des dendrites, comme les cDC<sup>43</sup>.

Finalement, les pDC ont aussi des propriétés de présentation de l'antigène : à l'état activé, elles peuvent activer des lymphocytes T (discuté dans le chapitre 3.3.3.3 p.76)<sup>42,44</sup>.

### **1.2.3 Les cellules dendritiques chez l'Homme**

Les études actuelles chez la souris permettent d'avoir une vue globale sur le rôle des différents acteurs du système immunitaire dans de nombreuses pathologies. Ces études enrichissent considérablement notre compréhension du système immunitaire qui, par homologie, peut être transposée chez l'Homme afin de lutter contre de nombreuses maladies. Ainsi, bien que mon travail de thèse n'ait pas porté sur les différents sous types de DC humaines, j'ai souhaité faire une brève comparaison des DC humaines par rapport aux sous-types murins discutés préalablement (Tableau 1 p.17).

Trouver l'équivalent des DC humaines n'a pas été une tâche facile en raison du manque de marqueurs en commun avec les DC murines, de leur rareté et de la difficulté d'obtenir du sang ou des échantillons de tissus. Dans les années 2000, trois sous populations de DC ont été trouvées dans le sang et les tissus lymphoïdes, celles exprimant le marqueur BDCA-1



(Blood DC Antigen 1) ou DC CD1c<sup>+</sup>, celles le marqueur BDCA-3 ou DC CD141<sup>+</sup> et celles le marqueur BDCA-2 ou pDC<sup>45,46,47,48</sup>. Dans un premier temps et par des analyses du transcriptome, les DC BDCA-3<sup>+</sup> ont été montrées comme étant l'équivalent des DC CD8α<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> et les DC BDCA-1<sup>+</sup> l'équivalent des DC CD8α<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup><sup>46,49</sup>. Depuis, plusieurs laboratoires ont soutenu l'idée que les DC BDCA-3<sup>+</sup> sont bien les équivalentes des DC CD8α<sup>+</sup> de la souris à travers des études fonctionnelles montrant leur supériorité à réaliser la présentation croisée (après stimulation par du poly I :C, un ligand du TLR3). Cette question est cependant encore discutée aujourd'hui. Ils ont également identifié différents marqueurs cellulaires, dont DNGR-1 (ou Clec9A) et XCR1 (XC chemokine receptor 1) qui sont exclusivement exprimés par les DC BDCA-3<sup>+</sup> humaines et les DC CD8α<sup>+</sup> murines<sup>50,51,52,53,54</sup>.

### 1.3 Le rôle central des cellules dendritiques dans le système immunitaire

Le système immunitaire défend l'organisme contre toutes sortes de pathogènes. Il existe deux composantes du système immunitaire qui jouent chacune un rôle très important : l'immunité innée et l'immunité adaptative. La première correspond à une reconnaissance non spécifique des pathogènes alors que la seconde correspond à une reconnaissance spécifique des pathogènes, qui ne peut se mettre en place sans l'immunité innée.

Parce que les DC jouent un rôle dans l'immunité innée et font le lien entre cette dernière et l'immunité adaptative, elles ont un rôle central de chef d'orchestre de la réponse immune, dont nous allons discuter dans les deux prochains paragraphes.

#### ***1.3.1 Le rôle des cellules dendritiques dans l'immunité innée***

Une fois la première barrière de défense franchie que constituent la peau et les épithéliums des muqueuses, les pathogènes font face au premier système de défense de l'organisme : l'immunité innée. Celle-ci est constituée de différentes cellules dont les polynucléaires neutrophiles (cellules phagocytaires qui sont recrutées en premier sur le site de l'infection), les macrophages, les cellules tueuses naturelles ou NK (Natural Killer) et les DC. Je ne me focaliserai dans cette partie que sur le rôle joué par les DC dans l'immunité innée.

Les DC sont capables de reconnaître des motifs conservés exprimés spécifiquement par les pathogènes, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), via des récepteurs appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors)<sup>55</sup>. Ces molécules seront décrites dans les parties 2.1.2 p.38 et 2.1.3 p.42.

Suite à leur activation, les DC sécrètent des peptides antimicrobiens, comme les défensines. Ces peptides agissent de différentes façons. En effet, ils peuvent agir directement en déstabilisant les membranes bactériennes, ou indirectement dans les cellules infectées en inhibant la synthèse d'ADN, d'ARN, ou de protéines, et en activant des enzymes antimicrobiennes qui lysent les composants du microbe. Ces peptides agissent également sur les virus en ciblant les lipoprotéines d'enveloppe de certains virus enveloppés, comme le virus de la grippe et certains herpès virus<sup>56</sup>. En plus de ces peptides antimicrobiens, les DC peuvent générer des radicaux oxygénés (ROS pour Reactive Oxygen Species), qui vont principalement endommager l'ADN des microbes ; et de l'oxyde nitrique, qui va à la fois inhiber la chaîne respiratoire et interférer au niveau de la réplication de l'ADN<sup>57</sup>.

Certaines DC peuvent sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, le TNF $\alpha$  ou encore l'IL-6 qui influencent l'immunité adaptative, activent les neutrophiles et induisent la production de protéines de la phase aiguë. Un exemple caractéristique de l'action des DC est celui des pDC en réponse à un virus. En effet, comme nous l'avons vu, ces cellules sont capables de produire de grandes quantités d'IFN de type I, cytokine antivirale, qui induit, dans les cellules infectées par des virus et dans les cellules voisines, un état incompatible avec la réplication virale<sup>42,58</sup>. De plus, ces IFN agissent sur les cellules de l'immunité innée en activant la capacité lytique des NK et la production d'oxyde nitrique par les macrophages.

Finalement, les DC favorisent la communication entre les autres cellules de l'immunité innée. Par exemple, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires permet un recrutement plus important de cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles) au site de l'infection<sup>59</sup>. Par ailleurs, les DC matures activent la cytotoxicité, la prolifération et la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK et l'activité bactéricide des macrophages grâce aux IFN de type I, l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-15. Réciproquement, les NK favorisent la maturation des DC, notamment par la sécrétion d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ , via un contact cellulaire par NKp30<sup>60</sup>.

### **1.3.2 Le rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative**

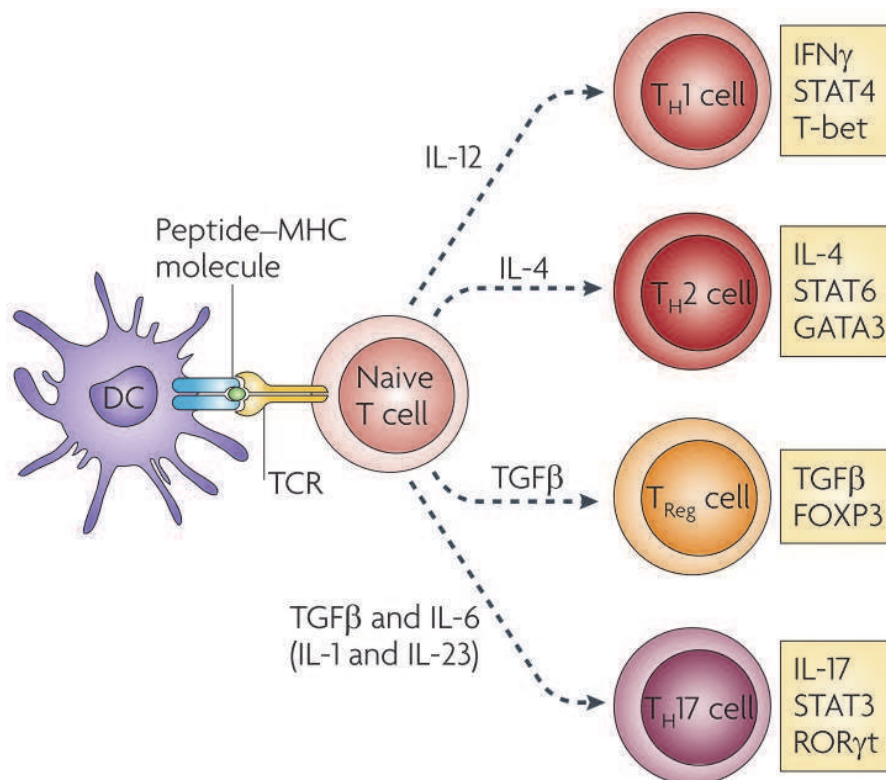
Après avoir capturé un pathogène, les DC ont la capacité de présenter ses antigènes aux lymphocytes T et ainsi de mettre en place une réponse immunitaire adaptative adéquate et spécifique de ce pathogène. Selon l'environnement dans lequel les réponses innées ont été établies, la réponse T va se polariser vers un profil effecteur ou régulateur particulier<sup>61</sup>. Cette polarisation influence ensuite la réponse des lymphocytes B, qui vont se différencier en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de l'antigène.

Les DC interagissent aussi bien avec les lymphocytes T qu'avec les lymphocytes B. En effet, les DC sont capables via la sécrétion d'IL-12, d'activer directement la production d'anticorps et la prolifération des lymphocytes B qui ont été stimulés par la molécule CD40L exprimée par les lymphocytes T activés. Les DC agissent également sur la commutation isotypique des lymphocytes B : selon les cytokines sécrétées par les DC, les lymphocytes B produiront des immunoglobulines de différents isotypes. De plus, dans les follicules B, les DC folliculaires (ou FDC) soutiennent directement la viabilité, la croissance et la différenciation des lymphocytes B activés. Ces FDC sont présentes au niveau des centres germinatifs (correspondant à la zone B stimulés par un antigène), où les lymphocytes B qui prolifèrent subissent la mutation somatique (afin d'augmenter l'affinité des anticorps produits)<sup>61</sup>.

L'activation des lymphocytes T naïfs par les DC requiert trois signaux : la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR (T Cell Receptor), l'interaction des molécules de costimulation présentes à la surface des DC matures et des lymphocytes et enfin, l'environnement cytokinique. Ces trois signaux apportés par les DC vont ainsi initier la réponse immunitaire adaptative, en polarisant la réponse T. En effet, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, ou Th0 (T helper 0), ont la capacité de s'engager dans diverses voies de différenciation. En présence de pathogènes intracellulaires (virus ou bactéries), les DC vont produire de l'IL-12 qui favorise l'induction de cellules Th1. Ces cellules produisent de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2 et du TNF $\alpha$  et favorisent les réponses immunitaires à médiation cellulaire. En présence de pathogènes extracellulaires, les DC vont produire essentiellement de l'IL-4 qui favorise la polarisation en Th2. Ces cellules sont incapables de produire de l'IFN $\gamma$ , mais sont caractérisées par leur production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 et favorisent la réponse humorale en aidant à la production d'anticorps par les lymphocytes B. En présence d'IL-6 et de TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), les lymphocytes T naïfs se différencient en Th17. Ces cellules produisent de l'IL-17A, IL-17F et IL-22, et leur prolifération est régulée par l'IL-21 et leur survie par l'IL-23<sup>62</sup>. Enfin, il existe deux populations régulatrices majeures dérivant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> : les Tregs d'origine thymique (appelées naturelles, nTregs) et les Tregs induits à partir de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (iTregs) en présence de TGF $\beta$ . Chacun de ces

lignages de lymphocytes effecteurs est associé à des facteurs de transcriptions spécifiques. Ainsi, les facteurs de transcription T-bet/STAT-4, GATA-3 /STAT-6, Foxp3 et ROR $\gamma$ t/STAT-3 ont, respectivement, un rôle majeur dans la différenciation et l'homéostasie des cellules Th1, Th2, Tregs et Th17 (Figure 2).

En plus de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, certains sous types de DC ont aussi la capacité d'activer directement les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, chargés de tuer les cellules infectées. Cette activation nécessite la présentation croisée de l'antigène, détaillée dans le chapitre 3.3 p.64.



**Figure 2 : Voies de différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs.** A partir d'un même précurseur de lymphocyte T CD4<sup>+</sup>, différents types de lymphocytes T auxiliaires peuvent être générés selon le contexte cytokinique dominant. L'IL-12 induit des lymphocytes Th1 qui favorisent l'activité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. L'IL-4 induit des Th2 qui favorisent l'activité des lymphocytes B. L'IL-6 combinée au TGF $\beta$  induit des Th17. Le TGF $\beta$  seul induit des Tregs capables d'inhiber l'activité des lymphocytes T effecteurs. D'après Zou W, Restifo NP, *Nature Reviews Immunology* 2010.

## 1.4 Maturation des cellules dendritiques

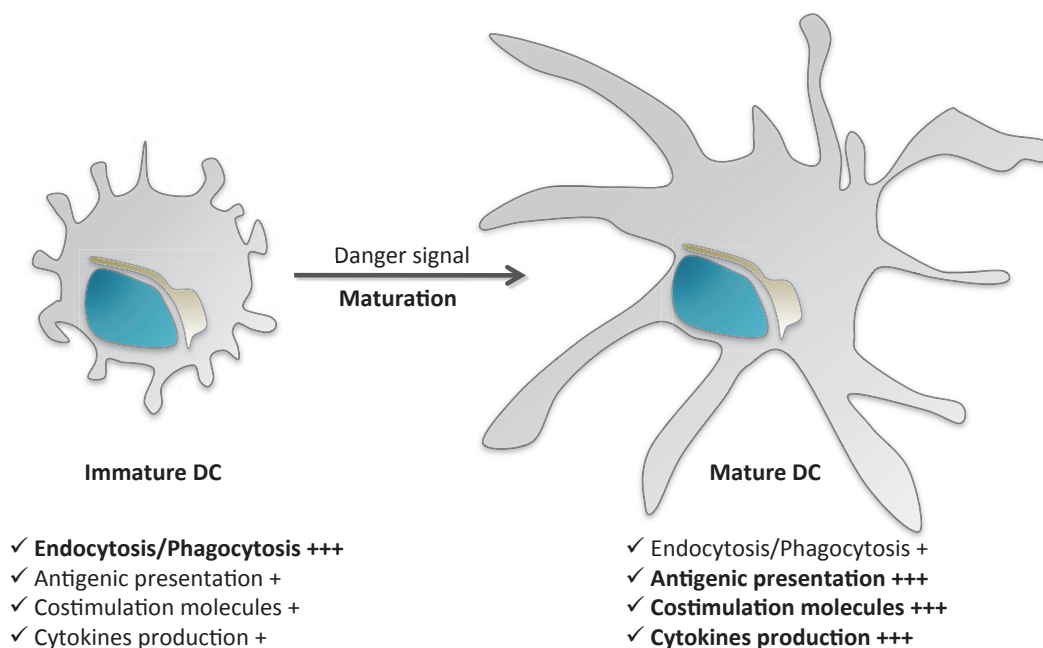
L'idée que les DC se trouvent dans deux états, immature ou mature, dont seules les DC matures sont capables d'activer des réponses immunes, vient du « paradigme des cellules de Langerhans ». Celui-ci implique que les DC sont présentes dans les tissus périphériques dans un état immature, spécialisées pour échantillonner l'environnement en utilisant une variété de mécanismes d'endocytose. Cet état est cependant caractérisé par un niveau faible d'expression des molécules du CMH et de costimulation mais une forte capacité d'endocytose<sup>27,63</sup>.

Les DC sont équipées d'un grand nombre de récepteurs, tels que les PRRs (décrits dans le chapitre 2.1.3 p.42), les récepteurs aux cytokines et aux chimiokines, leur permettant de reconnaître/sentir les PAMPs et les signaux inflammatoires. La signalisation par ces récepteurs amorce la migration des DC jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires<sup>18</sup>. Cette migration dépend d'une augmentation de l'expression de CCR7 permettant aux DC de quitter le tissu périphérique et de rejoindre le ganglion drainant<sup>64,65</sup>. Pendant cette migration, les DC évoluent vers un état mature caractérisé par la perte de leur capacité de capture d'antigènes, la réorganisation du cytosquelette d'actine, l'augmentation de leur niveau d'expression des molécules du CMH-II et de costimulation (comme CD80, CD83, CD86 et CD40), et la capacité de présenter les antigènes capturés en périphérie aux lymphocytes T naïfs<sup>66</sup>. La maturation est ainsi définie par une série de changements phénotypiques mais aussi morphologiques qui permettent aux DC d'initier la réponse immune.

Le terme de maturation faisait originellement référence à la capacité des DC à induire des réponses immunogènes, alors restreintes à la simple capacité à faire proliférer les lymphocytes T naïfs. En effet, les cellules de Langerhans devaient être mises en culture pour devenir matures, et ceci s'accompagnait d'une diminution de la capacité de phagocytose, d'une augmentation de l'expression des molécules du CMH-II et de costimulation, et enfin l'impossibilité de présenter de nouveaux antigènes<sup>67</sup>. L'augmentation du niveau d'expression des molécules du CMH-II et de la molécule CD86 a alors été considérée comme la marque de la maturation des DC qui conduisait à une réponse immunogène. La découverte que les DC pouvaient induire de la tolérance a ainsi été une fonction attribuée aux DC immatures<sup>68</sup>. Cependant, des études plus récentes ont montré que des DC matures (phénotypiquement) étaient également capables d'induire une réponse tolérogène<sup>69</sup>.

L'utilisation du terme « mature » dans l'induction d'une réponse immunogène a donc considérablement évolué. Notamment, Caetano Reis e Sousa a écrit une très belle revue<sup>70</sup> dans laquelle il explique qu'il est aujourd'hui erroné de faire une dichotomie entre l'état

immature et mature basée sur l'unique critère de la génération respective de réponse tolérogène ou immunogène. En effet, les DC immatures ont de faibles niveaux de molécules du CMH et de costimulation, sont peu motiles et ne forment pas de conjugués avec les lymphocytes T aussi efficacement que les DC matures, bien qu'elles soient capables d'induire de la tolérance. Il propose donc que la maturation se réfère non pas au devenir de la réponse immunitaire (qui peut être tolérogène, immunogène, ou régulatrice), mais plutôt aux changements morphologiques et phénotypiques que subissent les DC (Figure 3).



**Figure 3 : Maturation des cellules dendritiques.** Le processus de maturation des DC est initié suite à leur rencontre avec des pathogènes, des signaux de danger, des cytokines, etc... Les DC immatures, alors sentinelles de l'organisme, subissent des changements morphologiques et fonctionnels. Elles augmentent l'expression de leurs molécules du CMH, qui se relocalisent du cytoplasme à la membrane plasmique en grande majorité. Les DC matures deviennent alors spécialisées dans la présentation antigénique.

## 2 La reconnaissance et la capture des antigènes par les cellules dendritiques

Pour que les DC puissent induire une réponse immune efficace, elles doivent tout d'abord reconnaître le danger en périphérie. Ce danger peut provenir de l'entrée d'un pathogène (bactéries, virus, parasites) ou bien de cellules qui sont en état de stress pré-apoptotique ou en apoptose précoce. Les DC doivent pouvoir reconnaître ainsi les signaux de danger exprimés par ces éléments, développés dans le premier chapitre de cette partie. En parallèle, les DC doivent capturer les antigènes de ces pathogènes ou de ces cellules endommagées. Ceci se fait par différents mécanismes discutés dans le deuxième chapitre de cette partie.

### 2.1 Reconnaissance des sources d'antigènes par les cellules dendritiques

Une partie de ma thèse s'est intéressée aux signaux « eat-me », « don't eat-me » et à leur impact sur la capture d'antigènes provenant de cellules vivantes. En effet, ces signaux jouent un rôle important dans la reconnaissance de cellules apoptotiques par les phagocytes du système immunitaire. Je discuterai ainsi dans une première partie de l'importance de ces signaux dans le système immunitaire. Les DC reconnaissent le danger via différentes molécules : les PAMPs et les DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) correspondant à des signaux de danger d'origine microbienne ou non, respectivement. Ces molécules seront discutées dans la deuxième partie de ce chapitre. Enfin, les récepteurs sur les DC permettant la reconnaissance de ces signaux de danger, ou PRRs, seront développés dans la troisième et dernière partie de ce chapitre.

#### **2.1.1 Les signaux « find-me », « eat-me », « dont eat-me »**

De manière très remarquable, notre corps recycle à peu près un million de cellules par seconde<sup>71</sup>. Ceci inclut l'excès de cellules constamment générées dans les tissus, les cellules âgées en fin de vie mais aussi les cellules endommagées par des maladies ou infections. L'élimination de ces cellules mourantes se fait soit par les cellules voisines (fibroblastes ou cellules endothéliales), soit par les cellules phagocytaires professionnelles (macrophages et

DC immatures). L'élimination rapide et efficace de ces cellules est importante pour « faire de la place » aux cellules vivantes et maintenir la fonction du tissu, mais également pour éviter d'aboutir à une nécrose secondaire capable de générer une inflammation<sup>72,73</sup>. *In vivo*, et dans des conditions normales, la suppression des cellules apoptotiques semble être très rapide, de telle sorte que la détection de ces cellules dans les tissus pourrait provenir d'un désordre dans les mécanismes d'élimination, ou d'une quantité très importante de cellules apoptotiques<sup>74</sup>. Le processus de capture des cellules apoptotiques peut se découper en trois étapes majeures : 1. l'implication de signaux « find-me » relargués par les cellules apoptotiques pour attirer les phagocytes au site ; 2. l'exposition de signaux « eat-me » à la surface des cellules apoptotiques permettant la reconnaissance par les phagocytes et l'internalisation de ces dernières. Nous verrons que cette étape est finement régulée par une balance avec les signaux « don't eat-me », normalement exprimés sur les cellules vivantes ; et 3. La digestion et la dégradation des corps apoptotiques dans les phagocytes<sup>75,76</sup>.

**Les signaux « find-me » :** Ces signaux chimiotactiques sont relargués par les cellules en apoptose pour recruter les cellules phagocytaires. Durant ces dernières années, quatre principaux signaux « find-me » ont été décrits : la lysophosphatidylcholine (LPC), la sphingosine-1-phosphate (S1P), la fractalkine/CX3CL1, et les nucléotides ATP et UTP<sup>77,78,79,80</sup>. Bien que ces molécules soient de différents types, elles sont toutes liées au recrutement des monocytes, macrophages et des DC immatures auprès des cellules apoptotiques<sup>81</sup>.

Le premier signal « find-me » a été identifié *in vitro* avec des lignées cellulaires humaines, par le laboratoire de S. Wesselborg en 2003<sup>79</sup>. En effet, par des expériences de transwell, ce laboratoire a montré que les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) rendues apoptotiques, par irradiations U.V., sécrétaient dans le surnageant de la LPC permettant d'attirer la lignée monocyttaire THP1. Les auteurs ont également montré que l'activation de la phospholipase A2 calcium-indépendant (iPLA2) par la caspase 3 dans les cellules apoptotiques était liée à la conversion de la phosphatidylcholine (PC) en LPC et à sa sécrétion. Quelques années plus tard, ils ont montré que la liaison de la LPC à G2A (G2 accumulation protein ou G protein-coupled receptor 132) permettait l'activation et l'attraction des macrophages<sup>82</sup>.

Le laboratoire de S. Spiegel a montré que l'induction de l'apoptose dans des cellules Jurkat ou U937 (cellules de leucémie), aussi bien par des inhibiteurs de la sphingosine kinase que par des agents chimiques, augmentait l'expression de la sphingosine 1 kinase<sup>78</sup>. Son activité permettait la sécrétion de la S1P qui, à son tour, semblait avoir un fort pouvoir



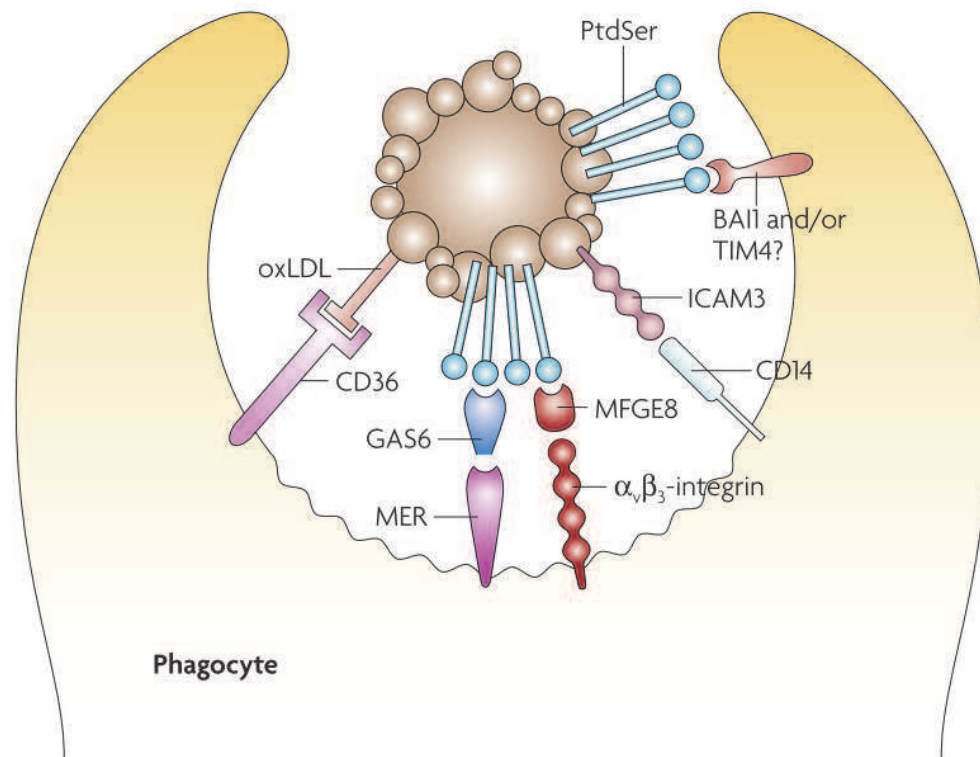
attracteur sur les monocytes et macrophages. Des expériences *in vivo* manquent pour mieux comprendre la relevance physiologique de ce lipide en tant que signal « find-me ».

La même année, une autre étude a mis en évidence le rôle de la fractalkine/CX3CL1 comme signal « find-me » *in vivo*<sup>80</sup>. En effet, elle a montré qu'un fragment soluble de la chimiokine, normalement localisée au niveau de la membrane plasmique et servant de molécule d'adhésion, est relargué lors de l'apoptose des cellules du lymphome de Burkitt (cellules malignes des centres germinatifs B) et agit comme un agent chimiotactique. Cette sécrétion est dépendante des caspases et de Bcl-2 et attire les macrophages (exprimant le récepteur CX3CR1). Bien que les auteurs soulignent le caractère spécifique de la fractalkine dans le cadre du lymphome de Burkitt et des centres germinatifs B, cette étude *in vivo* utilisant des souris CX3CR1<sup>-/-</sup>, suggère l'authenticité de cette molécule comme signal « find-me ».

Le dernier signal « find-me » a été mis en évidence aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* par le laboratoire de Ravichandran en 2009<sup>77</sup>. En effet, ils ont montré que la sécrétion de nucléotides triphosphate tels que l'ATP et l'UTP, par les cellules en apoptose précoce, pouvait fortement attirer les monocytes. La sécrétion de ces nucléotides a été montrée dans différents types cellulaires : les cellules Jurkat, les thymocytes primaires, les cellules MCF-7, et les cellules épithéliales de poumons après apoptose (via Fas, traitement U.V., etc.). De plus, cette sécrétion semble dépendante de l'activité des caspases. Par contre, l'utilisation de souris déficiente pour P2Y<sub>2</sub> (récepteur couplé à la protéine G présent sur les monocytes et macrophages), diminue fortement l'attraction des cellules phagocytaires, impliquant ce récepteur comme le senseur de l'ATP et de l'UTP relargués par les cellules apoptotiques.

Une des questions intéressantes derrière le principe des signaux « find-me » est qu'ils doivent, pour attirer les phagocytes, créer un gradient chimiotactique assez large. Or, ces molécules créent un gradient de faible portée et, concernant les nucléotides, peuvent parfois être dégradées rapidement. De plus, la concentration dans le sang de la LPC et de la S1P est très élevée par rapport à leur concentration sécrétée par les cellules apoptotiques. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre comment ces signaux agissent sur les phagocytes, car il est probable que la sécrétion de plusieurs de ces molécules en même temps puisse jouer de concert pour attirer les phagocytes localement et hors de la circulation sanguine. De plus, ces signaux pourraient avoir d'autres fonctions comme augmenter la capacité de capture des phagocytes en leur permettant de sur-exprimer les récepteurs adéquats<sup>76</sup>.

**Les signaux « eat-me » :** Bien que les signaux « find-me » attirent les phagocytes auprès des cellules apoptotiques, ils doivent pouvoir ensuite les distinguer des cellules voisines. Ceci se fait par l'expression de molécules dites « eat-me » sur les cellules en apoptose, et par leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques sur les cellules phagocytaires (Figure 4).



**Figure 4 : les signaux « eat-me » et leurs récepteurs sur les cellules phagocytaires.** Les cellules apoptotiques expriment des signaux « eat-me » à leur surface qui sont reconnus par des récepteurs à la surface des phagocytes (macrophages, DC). La PS (ici PtdSer) est un signal clé et semble être exprimée en patches sur les cellules apoptotiques. Elle peut être reconnue par des opsonines comme MFG-E8 et Gas6 (ou encore  $\beta$ 2-GPI et la protéine S du sérum, non montré ici) qui sont ensuite reconnues par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et MER, respectivement. Elle peut aussi être reconnue directement par BAI1 et Tim4 exprimées sur les phagocytes. D'autres motifs comme ICAM3 modifiée, reconnue par le CD14, et les lipides oxydés, reconnus par CD36, permettent la phagocytose. La CRT et son ligand LRP/CD91 ne sont pas représentés sur ce schéma. *Adapté de Ravichandran KS, Lorenz U, Nature Reviews Immunology 2007.*

L'expression de ces signaux est due à des changements dans la composition de la membrane plasmique des cellules apoptotiques, permettant ainsi l'expression de molécules normalement « cachées » dans les cellules vivantes. Le premier signal « eat-me », mis en évidence par le laboratoire de P.M. Henson en 1992, est l'exposition de la

phosphatidylsérine (PS)<sup>83</sup>. Cette molécule est normalement située au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique et se retrouve au niveau du feuillet externe suite à la perte de l'asymétrie membranaire qui a lieu lors de l'apoptose. Cette exposition est due à l'inhibition de l'aminophospholipide translocase qui permet normalement de retourner la PS vers le feuillet interne et de l'y confiner : il y a alors un flip-flop bidirectionnel de la PS non spécifique qui est dépendant de la présence de calcium dans le milieu extracellulaire<sup>84</sup>. L'expression de la PS est nécessaire pour la reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes et jouerait un rôle critique dans la capture de ces dernières. En effet, lorsque des cellules sont traitées avec du DFMO (ornithine decarboxylase inhibitor difluoromethylornithine) puis rendues apoptotiques par irradiation U.V., elles n'exposent pas la PS et le flip-flop des phospholipides membranaire est altéré, ce qui empêche les macrophages et autres phagocytes de reconnaître et capturer ces cellules apoptotiques. Au contraire, lorsque la PS est ajoutée aux cellules apoptotiques traitées avec du DFMO ou aux cellules vivantes, à l'aide de liposomes contenant de la PS, les macrophages sont bien capables de les capturer<sup>85</sup>.

La PS peut interagir directement avec des récepteurs sur les cellules phagocytaires ou indirectement via des opsonines (qui font le lien entre les cellules apoptotiques et les cellules phagocytaires) (Figure 4). En 2007, plusieurs laboratoires ont identifié deux récepteurs pouvant se lier directement à la PS : Tim4 et Tim1 (T cell immunoglobulin mucin proteins) et BAI1 (Brain Angiogenesis Inhibitor 1)<sup>86,87,88</sup>. Le laboratoire de S. Nagata a établi une banque d'anticorps monoclonaux de hamster dirigés contre les macrophages péritonéaux murins. Ils ont alors trouvé qu'un de ces anticorps inhibait fortement la capture de cellules apoptotiques médiée par la PS. L'antigène reconnu par cet anticorps a été identifié par clonage comme étant Tim4, qui reconnaissait la PS via son domaine immunoglobuline (Ig). Ils ont ensuite validé *in vivo* l'importance de ce récepteur en administrant l'anticorps anti-Tim4 à des souris et en observant une diminution de la capture des cellules apoptotiques par les macrophages<sup>87</sup>. La transfection de fibroblastes 3T3 avec Tim4 et Tim1, leur permet de phagocyter des cellules apoptotiques. Finalement, Tim4 est exprimé aussi bien sur les macrophages péritonéaux que sur les DC CD8 $\alpha^+$  et CD8 $\alpha$ <sup>-86</sup>. La même année, les travaux du laboratoire de K. Ravichandran ont montré que BAI1 permettait d'augmenter la capture de thymocytes apoptotiques (mais non nécrotiques ou vivantes) après transfection de macrophages J774 ou de fibroblastes LR73 par cette molécule<sup>88</sup>. Récemment, l'équipe d'A. Freitas a identifié TLT2 ((TREM)-like protein 2) comme étant un troisième récepteur de la PS et qu'*in vivo* il permettait la phagocytose des cellules apoptotiques<sup>89</sup>.

Plusieurs opsonines se liant à la PS ont été identifiées ces dernières années : la glycoprotéine MFG-E8 (Milk Fat Globule EGF factor 8), sécrétée par les macrophages (récupérés après injection de thioglycolate) et par les DC immatures, est reconnue par les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  grâce à son motif RGD<sup>90,91</sup> ; Gas6 (Growth arrest-specific 6) reconnu par les récepteurs de tyrosine kinases de la famille Axl, Sky et Mer<sup>92</sup> ;  $\beta_2$ -GPI ( $\beta_2$ -glycoprotein I) et la protéine S du sérum<sup>93</sup>.

Depuis la découverte de la PS comme signal « eat-me », beaucoup d'études se sont intéressées à d'autres changements membranaires qui pouvaient avoir lieu lors de l'apoptose. Par exemple, l'annexine I endogène est recrutée du cytosol et exportée au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, lors de la perte de l'asymétrie des phospholipides, où elle colocalise avec la PS en patches. Le blocage de l'annexine I par siRNA ou par des anticorps bloquants est corrélé avec une diminution de l'attachement et de l'internalisation par les cellules endothéliales. De plus, bien que l'annexine I ne soit pas nécessaire à l'exposition de la PS, elle semble nécessaire pour le regroupement des récepteurs de la PS autour des cellules apoptotiques<sup>94</sup>. D'autres changements membranaires beaucoup moins documentés, correspondent à l'altération de certains phospholipides de surface par oxydation des chaînes glycosylées. Ces modifications génèrent des sites ressemblant à des particules de lipoprotéines oxydées (oxLDL ou oxydized low-density lipoprotein) pouvant être reconnus par des récepteurs scavenger (SR) ; des sites de liaison à la thrombospondine (TSP) pouvant être reconnus par un complexe intégrine  $\alpha_v\beta_3$ / SR CD36 sur le phagocyte ; des sites de liaison aux lectines, à certains facteurs du complément (C1q ou C3b/bi), et à différentes collectines comme le MBL (Mannose Binding Lectin) ou les protéines du surfactant du poumon A et D (SP-A et SP-D)<sup>93,95</sup>. L'altération de la molécule d'adhésion ICAM-3 (reconnue par CD14) à la surface des cellules apoptotiques est également considérée comme un signal « eat-me », puisqu'elle permet l'attraction et l'attachement des macrophages<sup>96</sup>.

En 2005, le laboratoire de P.M. Henson a mis en évidence l'importance de la calréticuline (CRT) comme signal « eat-me »<sup>97</sup>. Cette protéine est normalement exprimée dans le réticulum endoplasmique (RE) et était connue pour ses propriétés de chaperonne. Cette équipe a montré que l'expression de la CRT est augmentée lors de l'apoptose induite par irradiation U.V. sur de nombreux types cellulaires, comme les cellules Jurkat, les neutrophiles ou encore les fibroblastes. Cette augmentation est accompagnée d'une redistribution de la CRT en patches qui semble colocaliser avec la PS. De plus, en utilisant des anticorps anti-CRT ou des MEF (mouse embryonic fibroblast) déficients pour la CRT, la phagocytose par la lignée de macrophages J774 était fortement diminuée. Cependant, en ajoutant de la CRT sur les MEF CRT<sup>-/-</sup> ou sur les neutrophiles vivants, l'ingestion de ces

cellules par les macrophages (récupérés par injection de thioglycolate ou dérivés de monocytes humain, ou par les macrophages J774 respectivement) est restaurée, montrant ainsi l'importance de la CRT pour la phagocytose des cellules apoptotiques. Finalement, en traitant les macrophages J774 avec RAP (receptor associated protein), un inhibiteur de LRP/CD91 (LDL receptor-related protein), ou avec un anticorps anti-LRP, la phagocytose des MEF CRT<sup>-/-</sup> reconstitués avec de la CRT était fortement inhibée, suggérant que LRP est le récepteur sur les phagocytes qui se lie directement à la CRT, exprimée sur les cellules apoptotiques<sup>97</sup>.

En 2007, les laboratoires de G. Kroemer et de L. Zitvogel ont montré qu'en réponse à certains agents/stimuli utilisés dans des traitements anticancéreux induisant la mort cellulaire (agents chimiques tels que les anthracyclines, l'oxaliplatine ou et les irradiations ionisantes), les cellules tumorales CT26 (cellules cancéreuses du colon chez la souris) apoptotiques exposaient la CRT au niveau de la membrane plasmique, générant un signal « eat-me », reconnu par les DC pour ensuite induire une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. Ils ont montré une corrélation entre le niveau d'expression de la CRT et le niveau de phagocytose de ces cellules tumorales par les DC. Ils ont ainsi souligné le caractère immunogénique de l'exposition de la CRT sur les cellules tumorales apoptotiques, qui semble apparaître (dans le cas d'une mort immunogénique) bien avant l'exposition de la PS. De plus, l'ajout d'anticorps anti-CRT neutralisants, ou bien la déplétion de la CRT par un ARN interférent, diminuait la phagocytose médiée par les DC et l'immunogénicité qui en découle. Au contraire, des cellules rendues apoptotiques par des agents non immunogéniques (comme la mitomycin C, la cisplatine ou l'etoposide, induisant une exposition plus tardive de la CRT), deviennent immunogéniques lorsque de la protéine CRT recombinante est ajoutée à la surface des cellules ou lorsque l'exposition de la CRT est renforcée par la déplétion ou l'inhibition pharmacologique de PP1/GADD34 (protein phosphatase 1/growth arrest and DNA damage 34), un complexe enzymatique intervenant dans le stress du RE<sup>98</sup>.

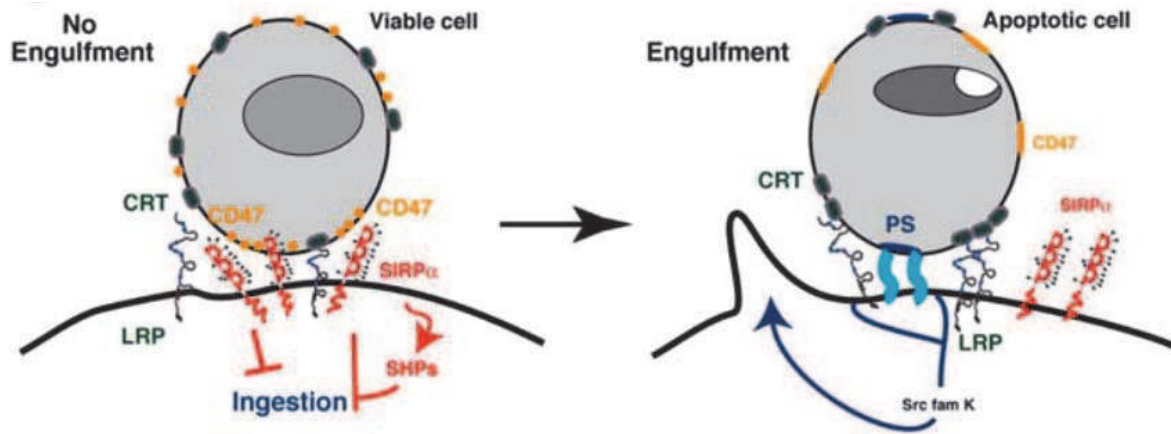
Il n'est pas nécessaire que tous les signaux « eat-me » et les récepteurs correspondant sur les cellules phagocytaires soient engagés pour la bonne élimination des cellules apoptotiques. La reconnaissance des cellules apoptotiques dépend de la nature de ces dernières, des récepteurs exprimés par le phagocyte et du statut d'activation de cette cellule<sup>71</sup>. La génération d'une sorte de « synapse apoptotique », qui s'apparente à la synapse immunologique, permet cependant de regrouper ces signaux pour faciliter la capture des cellules apoptotiques (Figure 4 p.32).

**Les signaux « don't eat-me » :** Ces signaux sont présents sur les cellules vivantes pour éviter leur capture par les cellules phagocytaires. Actuellement, deux signaux majoritaires ont été décrits : la molécule CD47 (ou IAP pour integrin-associated protein)<sup>74,97</sup> et la molécule d'adhésion CD31<sup>99</sup>.

La molécule CD31 est la première protéine à avoir été décrite par l'équipe de J. Savill en 2002 chez l'Homme<sup>99</sup>. Cette molécule fait partie de la superfamille des immunoglobulines d'adhésion et de signalisation, et est exprimée par les leucocytes et macrophages. Dans cette étude, ils montrent que l'interaction homophile des molécules CD31 exprimées par un neutrophile vivant et un macrophage entraînait leur répulsion, empêchant ainsi l'ingestion du neutrophile par le macrophage. Lors de l'apoptose, un défaut dans la signalisation du CD31 annule cet effet répulsif en retardant la repolarisation membranaire du phagocyte<sup>100</sup>, ce qui permet l'attachement et la capture des neutrophiles apoptotiques par les macrophages.

La molécule CD47 est une protéine largement exprimée sur les cellules et se lie à la molécule SIRP $\alpha$  (signal regulatory protein  $\alpha$ ), protéine inhibitrice transmembranaire glycosylée. La liaison du domaine extracellulaire de SIRP $\alpha$  par CD47, sur les cellules vivantes, conduit à la phosphorylation de kinases et l'activation subséquente de tyrosine phosphatases inhibitrices, comme SHP-1 (Src homology-containing tyrosine phosphatase-1)<sup>74</sup>. Il a d'abord été montré que la liaison de CD47 induisait une mort cellulaire indépendante des caspases dans des clones de leucémies lymphoïdes chroniques<sup>101</sup>. Une étude a montré que des érythrocytes provenant de souris déficientes pour le CD47 et injectés dans des souris sauvages étaient reconnus et rapidement éliminés par les macrophages de la pulpe rouge de la rate<sup>102</sup>. Le potentiel de CD47 en tant que signal « don't eat-me » a depuis fait l'objet d'une attention particulière. En 2005, le laboratoire de P.M. Henson a ainsi montré que des cellules vivantes et déficientes pour le CD47 pouvaient être ingérées par la lignée de macrophages J774. De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant le CD47 sur des neutrophiles vivants, ou l'utilisation d'un anti-SIRP $\alpha$  sur les macrophages J774, augmentait fortement la phagocytose des neutrophiles par ces macrophages, suggérant donc que l'expression de CD47 par les cellules vivantes pouvait être considérée comme un important signal « don't eat-me ». La phagocytose qu'ils observent dans leurs expériences semble dépendante de la CRT puisque des érythrocytes déficients pour CD47 ne sont pas ingérés par les macrophages prétraités avec un anticorps anti-LRP. Ils ont également remarqué que le CD47 diminuait à la surface de nombreuses cellules lors de l'apoptose et se répartissait en patches à l'écart de la CRT. Ces observations ont conduit à l'établissement d'un modèle par les auteurs dans lequel la répartition du CD47 sur une cellule vivante est telle que le signal inhibiteur l'emporte et que la cellule n'est pas ingérée par les phagocytes.

Au contraire, lors de l'apoptose, la répartition en patches de la CRT et de la PS, qui augmente à la surface des cellules, et la diminution de l'expression de CD47 et son exclusion, favorisent l'ingestion des cellules<sup>97</sup> (Figure 5).



**Figure 5 : Changements d'expression des molécules impliquées dans les signaux « eat-me » et « don't eat-me » lors de l'apoptose d'une cellule.** Bien que sur les cellules vivantes la CRT puisse engager son récepteur LRP sur la cellule phagocytaire, la signalisation par CD47/ SIRP $\alpha$  inhibe la capture. En revanche, lors de l'apoptose, l'expression de la CRT est augmentée et forme des patches qui colocalisent avec la PS : la signalisation par CD47/ SIRP $\alpha$  est mise en retrait et la capture par les phagocytes est alors possible. *Adapté de Gardai SJ et al, Cell 2005.*

Supportant l'idée que la capture de cellules par des phagocytes était fortement dépendante de l'équilibre entre l'expression de la CRT et de CD47, le laboratoire de I.L. Weissman a montré que de nombreuses cellules tumorales humaines expriment de fort niveaux de CRT, et que l'expression de la CRT est corrélée avec un niveau élevé de CD47<sup>103</sup>. L'augmentation de l'expression de CD47 sur les cellules tumorales permettrait de protéger ces cellules de la phagocytose médiée par la CRT et, ainsi, de contrebalancer son effet. En effet, la phagocytose de cellules tumorales déficientes pour CD47 (cellules MOLM13) par des macrophages prétraités avec un peptide bloquant la CRT est fortement diminuée. De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant CD47 sur des cellules tumorales augmente leur phagocytose par les macrophages mais est à nouveau diminuée si l'on ajoute un peptide bloquant la CRT. Ces travaux impliquent l'expression de la CRT comme le signal « eat-me » dominant sur les cellules tumorales humaines, qui peut être contrebalancé par l'expression de CD47. L'utilisation d'anticorps ciblant CD47 comme outils thérapeutiques dans différents types de cancers fait actuellement l'objet d'études précliniques principalement impulsées par l'équipe de I.L. Weissman<sup>104,105,106</sup>.

### **2.1.2 Les PAMPs et les DAMPs**

Les PAMPs et DAMPs sont des molécules dites de « danger » que peuvent reconnaître les DC grâce à l'expression de leurs PRRs.

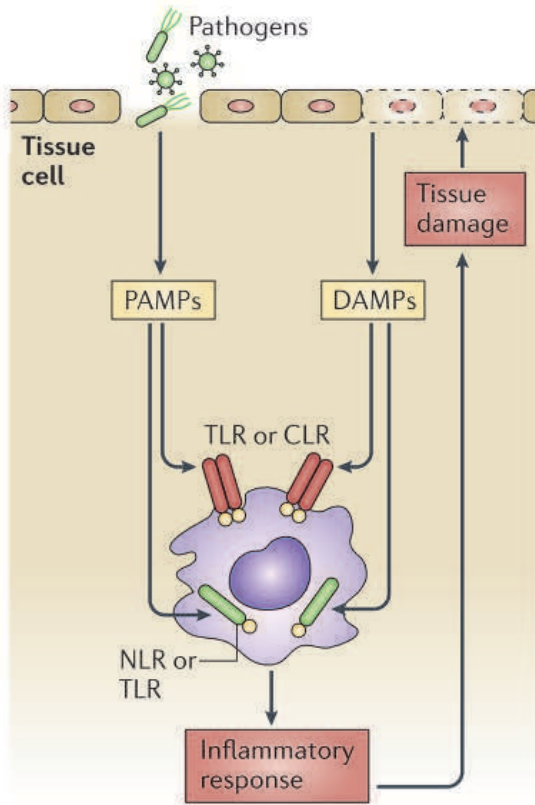
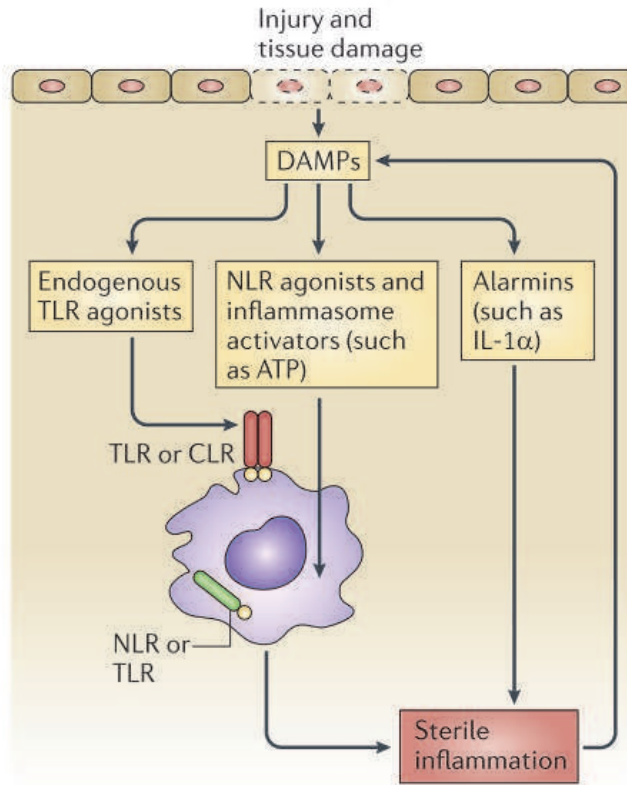
En 1989, Charles Janeway proposa que le système immunitaire ait évolué pour protéger l'organisme contre des microorganismes pathogènes. Pour lui, la reconnaissance des molécules infectieuses, non infectieuses et du « non soi », et l'activation des lymphocytes T, était déterminée par l'expression de récepteurs capables de reconnaître des motifs particuliers spécifiques des pathogènes par les APC. C'est ainsi que le terme de PAMPs est apparu<sup>107</sup>, désignant des motifs moléculaires exprimés uniquement par les pathogènes (bactéries, virus, parasites). Ils sont très conservés et indispensables à la survie des pathogènes. Ils correspondent par exemple au zymosan des champignons, au lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram-négatives, à la flagelline (composant structural principal du flagelle bactérien), au peptidoglycane ou encore aux acides nucléiques. Toutes ces molécules sont reconnues par les TLRs et autres PRRs, qui reconnaissent chacun un type de motif particulier. La correspondance entre les PAMPs et les PRRs sera précisée dans la section suivante, 2.1.3 p.42. La reconnaissance de ces motifs moléculaires par les cellules de l'immunité innée (neutrophiles, macrophages, DC), conduit généralement à une réponse inflammatoire et à l'activation du système immunitaire adaptatif<sup>108</sup>.

Au contraire, les DAMPs sont des motifs moléculaires provenant de cellules de mammifères et sont relargués après un stress cellulaire, un dommage cellulaire, une mort non physiologique (nécrose) ou encore une apoptose non contrôlée qui subit une nécrose secondaire. L'idée que le système immunitaire puisse également reconnaître des motifs exprimés par les cellules de l'organisme est née de « l'hypothèse du danger » proposée par Polly Matzinger en 1994<sup>109</sup>. Ceci permet d'expliquer comment le système immunitaire adaptatif peut être stimulé par des tumeurs, des tissus transplantés, ou encore par toutes situations engendrant de la nécrose. Tout comme les PAMPs, les DAMPs sont capables d'activer les APC, déclenchant ainsi une réponse inflammatoire et une réponse immunitaire adaptative<sup>110</sup>. Il existe deux types de DAMPs : les DAMPs d'origine intracellulaire qui sont relargués lors de la nécrose et agissent directement sur les cellules du système immunitaire ; et les DAMPs issus de la modification de composants extracellulaires par des composants relargués par les cellules nécrotiques (tels que les hydrolases et les protéases). Les DAMPs d'origine intracellulaire sont par exemple l'ATP ; les HSPs (heat-shock proteins) ; l'acide urique (dont la forme active est l'urate de monosodium ou MSU, formé lors du relargage de l'acide urique dans le milieu extracellulaire riche en sodium) ; la protéine HMGB1 (high-mobility group box 1 protein), qui se lie à l'ADN pour stabiliser les nucléosomes et régule la



transcription ; l'ADN double brin ou encore les peptides antimicrobiens. Les DAMPs d'origine extracellulaire sont par exemple l'acide hyaluronique, des peptides dérivés du collagène ou encore le sulfate d'héparane<sup>110,111,112</sup>. Certaines de ces molécules ainsi que leurs fonctions sont répertoriées dans le Tableau 2 p.41.

Les PAMPs et les DAMPs agissent sur les mêmes récepteurs pour beaucoup d'entre eux et peuvent donc agir de concert (Figure 6). Ceci dépend en effet du contexte dans lequel l'inflammation a lieu. On peut ainsi imaginer que la réponse inflammatoire déclenchée par un pathogène soit la conséquence de la reconnaissance de PAMPs mais également de DAMPs. En effet, en plus de l'expression des PAMPs spécifiques de ce pathogène, celui-ci peut également causer des dommages (directement ou indirectement par l'inflammation qu'il induit) provoquant le relargage des DAMPs capables d'amplifier la réponse inflammatoire. Dans ce contexte, les cellules qui n'ont pas encore été en contact avec le pathogène peuvent se retrouver dans un état de stress et ainsi exprimer des signaux « eat-me ». Elles sont alors capables d'alerter les cellules du système immunitaire inné et de les recruter pour résoudre l'inflammation induite. En revanche, dans le contexte d'une inflammation stérile, c'est à dire qui a lieu en l'absence de pathogènes, seuls les DAMPs ont un effet sur les cellules du système immunitaire inné qui déclenchent une réponse inflammatoire. Cependant, les microbes commensaux présents dans l'environnement peuvent tout de même contribuer à cette réponse inflammatoire. Savoir si les DAMPs peuvent à eux seuls induire une réponse inflammatoire reste toujours à ce jour une question à élucider<sup>112</sup>.

**a Infection (PAMPs)****b Tissue damage (DAMPs)**

**Figure 6 : L'activation du système immunitaire induite par les PAMPs et DAMPs.** L'activation optimale de réponses inflammatoires par les cellules du système immunitaire inné (DC, macrophages), exigerait deux signaux dérivant soit de molécules présentes sur les pathogènes ou soit de molécules endogènes des cellules de l'hôte. En présence d'un pathogène, les PAMPs qu'il exprime sont capables d'activer les cellules du système immunitaire inné via leurs PRRs, engendrant ainsi une réponse inflammatoire. Cette réponse provoque des dommages tissulaires générant ainsi le relargage de DAMPs qui, en synergie avec les PAMPs, renforcent la réponse inflammatoire. En l'absence de pathogène, les dommages tissulaires (comme lors d'une transplantation par exemple) peuvent être la source de DAMPs capable d'activer les cellules du système immunitaire inné via leurs PRRs, déclenchant ainsi une réponse inflammatoire stérile. Dans ces deux cas de figure, ne sont pas représentés les signaux « eat-me » présents sur des cellules voisines stressées ou en pré-apoptose, qui peuvent jouer un rôle dans le recrutement de cellules phagocytaires. *Adapté de Mills K, Nature Reviews Immunology 2011.*

DAMPs	Récepteurs	Fonctions
HMGB1	TLR2, TLR4, RAGE, TIM3	Attire différentes cellules immunes; permet la maturation des DC; effet immunostimulateur peut être inactivé lors de l'apoptose
Acide urique	NLRP3	Maturation des DC et attraction des neutrophiles
ADN/ARN	TLR3-7-8 (ARN) / TLR9 et AIM2 (ADN)	Puissante activité pro-inflammatoire; interagissent avec de nombreuses cellules immunes
HSPs	TLR2, TLR4, CD14, CD24, CD91	Attirent monocytes et neutrophiles; active les NL et la maturation des DC, HSP-90 peut médier l'immunothérapie anti-tumorale basée sur les T
HMGN1	TLR4	Maturation des DC; recrute les APC et réponses immunitaires spécifiques de l'antigène
ATP	P2X <sub>7</sub>	Agit comme un signal "find-me" et permet la production d'IL-1 $\beta$ par les DC
IL-1 $\alpha$	IL-1R	Forte activité pro-inflammatoire
IL-33	ST2	Déclenche la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de type Th2; peut être inactivée lors de l'apoptose
Protéines S100	RAGE	Attirent neutrophiles et monocytes
Peptides N-formyl	FPR1	Attirent les plaquettes, neutrophiles et monocytes
Acide hyaluronique	TLR2, TLR4, CD44	Peut induire la maturation des DC
Sulphate d'héparane	TLR4	Peut induire la maturation des DC
Défensines	TRL4, CCR6	Agent chimiotactique et antimicrobien; maturation des DC
Peptides dérivés du collagène	CXCR2	Peut induire la maturation des DC et le recrutement des neutrophiles
Calréticuline	CD91	Puissant signal "eat-me" et médiateur de l'immunogénicité tumorale
Actine filamenteuse	DNGR1 (Clec9a)	Reconnaissance cellules nécrotiques par DC CD8 $\alpha^+$ et la présentation croisée des antigènes de ces cellules

**Tableau 2 : les DAMPs, leurs récepteurs et leurs fonctions.** Ce tableau résume une partie des DAMPs connus ainsi que leurs récepteurs et certaines de leurs fonctions.

### 2.1.3 Les PRRs

Les DC sont capables de reconnaître le danger et de capturer les pathogènes et les cellules endommagées ou mortes à l'aide de différents types de récepteurs, dont certains sont également exprimés par d'autres cellules du système immunitaire inné ainsi que par les cellules endothéliales. Ces récepteurs, ou PRRs, peuvent être solubles, membranaires ou intracellulaires et n'ont pas tous les mêmes fonctions. Néanmoins, la plupart sont capables d'augmenter l'expression de gènes codant pour des cytokines proinflammatoires, l'IFN de type I, des chimiokines et des protéines antimicrobiennes, etc...<sup>113</sup>.

Il existe trois familles de PRRs qui peuvent être classés selon leurs fonctions<sup>114</sup> :

- **Les PRRs d'endocytose**, exprimés à la membrane, permettant la reconnaissance et l'internalisation de pathogènes ou de matériels provenant, par exemple, de cellules apoptotiques (via la reconnaissance de motifs tels que le LPS ou les LDL oxydés (OxLDL)). Les plus connus sont la molécule CD14, les récepteurs de type scavenger (SR) et les lectines de type C (CLR).
- **Les PRRs de signalisation**, membranaires ou intracellulaires, impliqués dans l'activation cellulaire à la suite de la rencontre avec un pathogène (ils répondent aux glycanes, aux lipoprotéines ou encore aux acides nucléiques). Parmi ces récepteurs, on retrouve les TLRs, les NLR (nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors) et les RLH (retinoic acid inducible gene I (RIG)-1-like helicases).
- **Les PRRs solubles**, ou opsonines, qui facilitent la reconnaissance et la phagocytose de leurs ligands par les cellules phagocytaires. Certaines de ces opsonines sont également capables d'activer le système du complément. Parmi ces molécules, on retrouve les collectines, les ficolines et les pentraxines (PTX).

**Les PRRs d'endocytose :** Ces récepteurs sont aussi bien capables de reconnaître des motifs microbiens que des motifs présents à la surface des cellules apoptotiques. Je ne me focaliserai, assez brièvement, que sur les lectines de type C et les SR.

Le terme « lectines de type C » a été introduit pour distinguer les lectines calcium-dépendantes et calcium-indépendantes qui se lient aux carbohydrates. Les CLR partagent au moins un domaine de reconnaissance des carbohydrates, correspondant à une structure compacte contenant des motifs conservés, et qui confère la spécificité des CLR aux carbohydrates. Cette famille regroupe aujourd'hui des protéines qui possèdent un ou plusieurs domaines homologues au domaine de reconnaissance des carbohydrates, mais ne

lient pas tous les carbohydrates<sup>115</sup>. Il existe dix-sept groupes de CLR et seuls les groupes II, V et VI sont exprimés sur les cellules myéloïdes. Parmi ceux-ci, on retrouve des CLR de la famille des récepteurs du mannose (MR), comme le CD206 (=MR) et le DEC-205 ; et des CLR de la famille des asialoglycoprotéines, comme DC-SIGN (CD209), la langérine (CD207), la dectin1 (Clec7) ou encore DNGR-1 (Clec9a). Ces CLR interagissent avec la plupart des pathogènes humains par la reconnaissance du mannose (virus, champignons, mycobactéries), du fucose (bactéries et helminthes) et du glucane (mycobactéries et champignons)<sup>115</sup>. Ils sont capables d'endocyter les pathogènes exprimant les motifs qu'ils reconnaissent grâce à leur domaine cytoplasmique qui contient des motifs d'internalisation (comme des triades d'acides aminés, des motifs dileucine ou encore des motifs tyrosine). Ces motifs vont diriger les CLR et leurs ligands vers différents compartiments cellulaires (endosomes précoces ou lysosomes), ce qui va aboutir à leur dégradation et à la présentation antigénique<sup>116</sup>. En plus des pathogènes, les CLR peuvent reconnaître des motifs du soi. C'est l'exemple de Clec9a identifié par l'équipe de Caetano Reis e Sousa en 2009. Il permet aux DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> de reconnaître sur les cellules nécrotiques l'exposition de l'actine filamenteuse et d'induire la présentation croisée d'antigènes provenant de ces cellules (ce point sera détaillé dans le chapitre 3.3 p.64<sup>117,118,119</sup>).

Le terme de « récepteurs scavenger » permet de décrire des glycoprotéines membranaires qui reconnaissent des LDL (low density lipoproteins) modifiées par oxydation (OxLDL) ou acétylation (AcLDL), mais non des LDL natives. Ils sont aussi capables de reconnaître des ligands polyanioniques, des composants du soi (comme les molécules de la matrice extracellulaire), du soi altéré (retrouvés au niveau des cellules apoptotiques et nécrotiques), ou du non soi (chez les microorganismes). Aujourd'hui, huit classes (de A à H) de SR ont été identifiées<sup>120</sup>, dont trois qui jouent un rôle important dans la capture des cellules apoptotiques:

- **Les SR de classe A** (SR-A et MARCO), reconnaissent des ligands polyanioniques tels que les OxLDL et les AcLDL, des composants bactériens, le polyG mais également le LPS et les cellules apoptotiques (reconnues surtout par le récepteur MARCO, ou macrophage receptor with collagenous structure)<sup>120,121</sup>. Ils sont exprimés à la surface des macrophages et des DC et permettent la présentation de leurs ligands aux lymphocytes.
- **Les SR de classe B** (SR-B1 et CD36), reconnaissent divers ligands comme le collagène, les acides gras, les phospholipides anioniques, la thrombospondine, les OxLDL, les HDL et les cellules apoptotiques. Le CD36, associé aux radeaux lipidiques, est impliqué dans la liaison des OxLDL (exprimés notamment sur des cellules apoptotiques) et est présent sur les macrophages et DC. Il est impliqué dans un

complexe avec la thrombospondine 1 (opsonine) et  $\alpha_v\beta_3$  (sur les macrophages) ou  $\alpha_v\beta_5$  (sur les DC immatures) dans la liaison avec les cellules apoptotiques<sup>114,122</sup>.

- **Le SR de classe E**, ou LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1), reconnaît une grande variété de ligands comme les OxLDL, les HDL modifiés, les plaquettes activées, les bactéries, AGE (advanced glycation end products) et les cellules âgées/apoptotiques (par la reconnaissance de la PS)<sup>120,123</sup>.

La redondance des ligands par ces différents SR suggère qu'un pathogène peut être pris en charge par une multitude de récepteurs, permettant ainsi une meilleure reconnaissance et élimination de ce dernier.

**Les PRRs de signalisation :** la reconnaissance par ces récepteurs permet la maturation des DC (entre autres) et déclenche une voie de signalisation aboutissant à la sécrétion de cytokines et à l'activation subséquente des lymphocytes T.

La famille des TLRs est une des mieux caractérisées parmi les PRRs et est responsable de la détection de pathogènes extracellulaires ou intracellulaires. Ce sont des glycoprotéines membranaires intégrales de type I caractérisées par leur domaine extracellulaire, contenant un nombre variable de motifs riches en leucine (LRR pour leucine-rich-repeat), et leur domaine intracellulaire de signalisation homologue à celui du récepteur de l'IL-1 : Toll/IL-1R ou TIR. Dix TLRs ont été identifiés chez l'Homme et douze chez la souris qui reconnaissent des PAMPs différents selon la spécificité de leur domaine LRR<sup>113</sup>. Les TLRs sont exprimés sur de nombreuses cellules comme les macrophages, les DC, les lymphocytes B, et sur certaines cellules non immunes (fibroblastes et cellules endothéliales). L'expression des TLRs peut être extra ou intracellulaire et est modulée rapidement en réponse à un pathogène, à une variété de cytokines, ou encore à un stress environnant (Tableau 3)<sup>124</sup>.

TLR	Localisation	Ligands
TLR1 et TLR2	Membrane plasmique	Peptidoglycane, lipoprotéines, LTA (bactéries); zymozan (champignons)
TLR2 et TLR6	Membrane plasmique	Lipoprotéines (bactéries)
TLR3	Endolysosome	ARN double brin (virus)
TLR4	Membrane plasmique	LPS (bactéries); protéine de fusion RSV (virus); mannane (levures)
TLR5	Membrane plasmique	Flagelline (bactéries)
TLR7 (et TLR8)	Endolysosome	ARN simple brin (bactéries, virus)
TLR9	Endolysosome	ADN CpG (bactéries, virus, protozoaires)
TLR10	Endolysosome	Inconnu
TLR11	Membrane plasmique	Molécule de type profiline (Protozoaires)

**Tableau 3 : les TLRs et leurs ligands.** Ce tableau représente les ligands principaux des TLRs connus. LTA = acide lipotéichoïque et RSV = virus respiratoire syncytial.

La famille des NLR constitue une famille de protéines solubles et cytoplasmiques qui détectent les pathogènes intracellulaires. Ces protéines possèdent trois domaines : un domaine LRR permettant la reconnaissance des ligands, un domaine NOD, et un domaine de signalisation CARD (caspase recruitment domains), PYRIN ou BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat). Les NLR ayant un motif PYRIN ou BIR ne sont pas impliqués dans la transcription de médiateurs inflammatoires, mais sont des composants de l'inflammasome qui régule l'activation de la caspase 1 qui catalyse la production de cytokines matures (IL-1 $\beta$  et IL-18). Les protéines NOD1 et NOD2 possèdent un domaine CARD à leur extrémité N-terminale et sont impliquées dans la transcription des gènes codant pour des cytokines proinflammatoires. NOD1 reconnaît l'iE-DAP (acide  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimélique) et NOD2 reconnaît le MDP (muramyl dipeptide), structures retrouvées sur les peptidoglycanes des bactéries<sup>113,125</sup>.

La famille des RLH est composée des protéines RIG-I, MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) et LGP2. Elles sont composées de deux CARD (à l'exception de LGP2) en N-terminal, d'un domaine central DEAD box helicase/ATPase et d'un domaine régulateur en C-terminal. Elles sont localisées dans le cytoplasme et reconnaissent l'ARN double brin. Elles induisent ainsi l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et les membres de la famille des IRF essentiels à la synthèse d'IFN de type I. L'expression des RLH est fortement augmentée en réponse à une stimulation par l'IFN de type I ou à une infection virale. LGP2

est, quand à lui, un régulateur positif de la production d'IFN de type I en réponse à l'ARN viral reconnu par RIG-I et MDA5<sup>113,126</sup>.

**Les PRRs solubles :** ces récepteurs permettent de faire le lien entre le ligand et la cellule phagocytaire. Ils seront décrits très brièvement.

Les collectines et les ficolines sont impliquées dans l'opsonisation de particules étrangères par la reconnaissance de certains glucides. Huit collectines ont été décrites, dont les plus caractérisées sont le MBL (mannose-binding lectin), SP-A et SP-D (surfactant protein A et D). Elles partagent quatre régions communes : un domaine N-terminal riche en cystéine, une région de type collagène, un domaine en hélice  $\alpha$  et un domaine en C-terminal de reconnaissance des carbohydrates<sup>127</sup>. Le MBL est également capable de se lier aux cellules en apoptose tardive ou en nécrose (mais pas aux cellules en apoptose précoce, ni aux cellules vivantes). C1q, molécule du complément, fait aussi partie de la famille des collectines et se lie aussi aux cellules apoptotiques, par compétition avec le MBL, sur des structures similaires<sup>128</sup>. Toutes ces collectines semblent se lier au complexe CRT/CD91 présent à la surface des macrophages activés. Peu d'études se sont focalisées sur les ficolines. Il semble cependant qu'elles puissent se fixer sur les cellules en apoptose tardive et nécrotiques<sup>114</sup>.

La famille des pentraxines (PTX) est constituée de deux PTX courtes, la SAP (protéine amyloïde du sérum) et la CRP (protéine C réactive), et d'une PTX longue ou PTX3. Les PTX courtes sont produites par le foie et peuvent reconnaître le polysaccharide-C de certains pathogènes, et PTX3 est produite par les macrophages, les DC et des cellules non immunes (fibroblastes et cellules endothéliales) en réponse à des signaux inflammatoires (stimulation des TLRs, production de cytokines proinflammatoires)<sup>129</sup>. Toutes ces molécules peuvent également reconnaître les cellules en apoptose tardive, mais alors que la CRP et la SAP favorisent la capture par les cellules phagocytaires après liaison, la PTX3 semble au contraire empêcher cette capture. Finalement, ces opsonines peuvent activer le complément et induire l'élimination des cellules apoptotiques via les récepteurs du complément<sup>114</sup>.

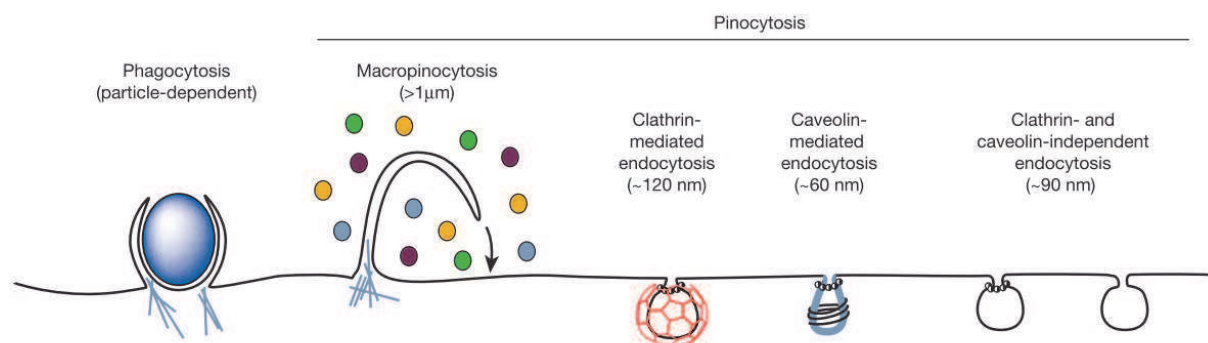


## 2.2 Mécanismes de capture et de transfert des antigènes par les cellules dendritiques

Grâce à l'expression des différents PRRs cités plus haut, les DC peuvent ingérer les pathogènes et leurs antigènes correspondants grâce à différents mécanismes d'endocytose essentiellement. Cependant, les DC peuvent également récupérer du matériel antigénique par d'autres moyens, comme par l'intermédiaire des jonctions gap, des exosomes, du nibbling ou encore du cross-dressing, que nous allons voir dans cette partie.

### 2.2.1 L'endocytose

Les DC immatures ont une grande capacité à internaliser les antigènes. Selon qu'ils soient sous forme particulaire ou soluble, les antigènes emprunteront différentes voies d'endocytose. Il existe deux grandes catégories d'endocytose : la phagocytose (capture de larges particules) et la pinocytose (capture de fluides et d'antigènes solubles). La phagocytose est restreinte à certains types de cellules alors que la pinocytose existe dans toutes les cellules et est basée sur quatre mécanismes différents : la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine (CME), l'endocytose dépendante des cavéoles, et l'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles<sup>130</sup> (Figure 7).



**Figure 7 : les différents mécanismes d'endocytose des antigènes.** Les antigènes de taille supérieure à 1µm sont capturés par phagocytose. Les antigènes solubles peuvent être capturés par macropinocytose. L'internalisation des complexes récepteurs/ligands est réalisée par la formation de vésicules de clathrine ou de cavéoline. Ces différents mécanismes empruntent la voie endocyttaire où les antigènes sont d'abord conduits dans des endosomes précoces, puis tardifs et enfin dans des lysosomes où le pH s'acidifie de plus en plus afin de permettre la dégradation totale dans les lysosomes. *Adapté de Conner SD et Schmid SL, Nature Review 2003.*

**La phagocytose :** Elle est effectuée par les cellules phagocytaires comme les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les DC. Certaines cellules « non-professionnelles », comme les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales peuvent avoir une activité phagocytaire mais dans une moindre mesure<sup>131</sup>. La phagocytose est le mécanisme clé pour endocyter des grosses particules de plus de 1µm, et est donc importante dans l'élimination des pathogènes, des débris cellulaires, et des cellules apoptotiques. C'est un processus actif et très régulé qui nécessite la présence de récepteurs (PRRs d'endocytose ou même solubles pour l'opsonisation) et d'une cascade de signalisation dépendante des GTPases de la famille Rho. Ces protéines permettent la réorganisation de l'actine qui déforme la membrane plasmique pour émettre des pseudopodes et englober les particules. Les vésicules d'endocytose formées par ce mécanisme sont nommées les phagosomes<sup>66,130</sup>.

**La macropinocytose :** Elle représente un mécanisme de capture non spécifique permettant aux DC d'internaliser de petites molécules. Tout comme la phagocytose, elle induit une cascade de signalisation qui implique les GTPases de la famille Rho, qui permet un remodelage de l'actine pour former des protrusions membranaires permettant la capture d'une grande quantité de phase fluide. Ces protrusions fusionnent ensuite avec la membrane plasmique pour former des macropinosomes<sup>130</sup>. Il existerait peu de contextes *in vivo* où les DC peuvent internaliser de la phase fluide. En effet, elles sont généralement au sein de tissus dans lesquels le fluide extracellulaire est peu abondant. De plus, il y a peu d'antigènes solubles car ils sont souvent associés à la membrane des pathogènes, à leur paroi ou bien à des compartiments cytoplasmiques<sup>6</sup>.

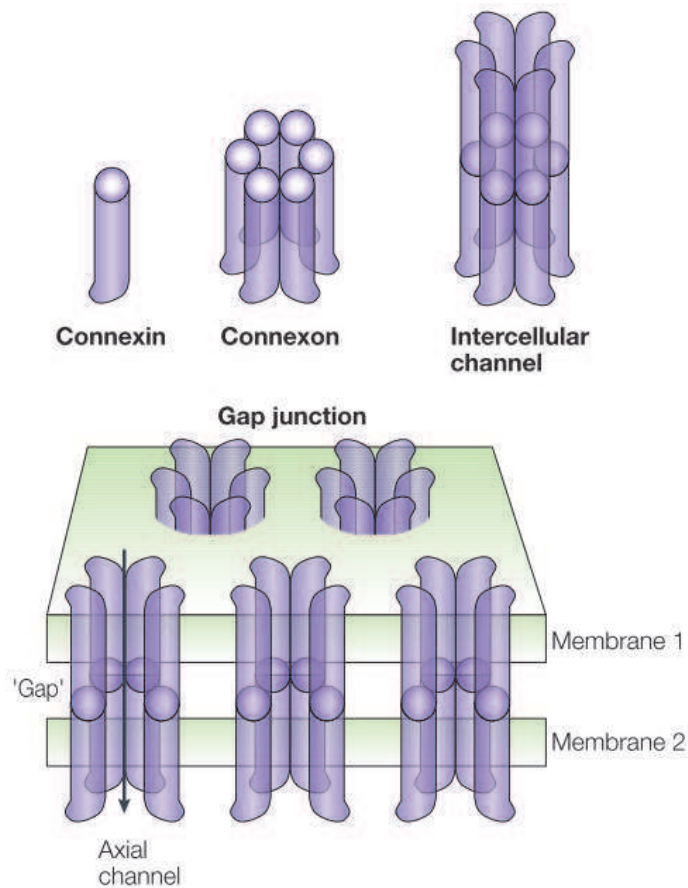
**L'endocytose dépendante de la clathrine (CME):** Elle est constitutive dans toutes les cellules de mammifères et est responsable de la capture de nutriments essentiels comme le cholestérol LDL via le récepteur du LDL, et le fer porté par la transferrine (Tfn) via le récepteur à la Tfn. Ces protéines sont d'ailleurs des marqueurs usuels de cette endocytose<sup>130</sup>. La CME est généralement associée à un récepteur et implique la concentration de ces derniers et de leurs ligands dans des puits recouverts de clathrine. La formation de ces vésicules nécessite également l'intervention de protéines d'assemblage (AP) telles que AP180 et AP2 qui permettent d'initier le manteau de clathrine. La dynamine est une autre protéine nécessaire à la fission de la vésicule en formant un anneau au niveau du col de la vésicule en bourgeonnement. La CME est également dépendante de l'actine qui jouerait un rôle dans la motilité des vésicules une fois détachées<sup>131</sup>.

**L'endocytose dépendante des cavéoles :** Les cavéoles s'apparentent à des radeaux lipidiques, correspondant à des régions de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingolipides dans lesquelles sont concentrées diverses molécules de signalisation. La forme et la structure des cavéoles sont attribuées à la présence de la cavéoline-1 (protéine membranaire en forme d'épingle à cheveux). La cavéoline-1 est absolument requise pour la genèse des cavéoles (bien que d'autres isoformes puissent intervenir comme la cavéoline-2 ou la cavéoline-3). Dans certains cas, l'endocytose médiée par les cavéoles peut éviter la fusion avec les lysosomes et peut ainsi être utilisée par certains pathogènes pour éviter leur destruction. Ce point reste à ce jour encore peu étudié<sup>130,131</sup>.

**L'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles :** Ce mécanisme d'endocytose, encore peu étudié, a été mis en évidence par la possibilité pour certaines particules d'entrer dans des cellules dépourvues de clathrine et de cavéoline-1. Dans ces cellules, les vésicules formées semblent contenir différents chargements comme la phase fluide, le virus SV40, les protéines liées à la GPI (glycosylphosphatidylinositol), l'IL-2 ou encore des hormones de croissance. Il existe différents types d'endocytoses indépendantes de la clathrine et de la cavéoline-1, mais elles semblent toutes dépendre du cholestérol et nécessitent une composition lipidique spécifique<sup>131</sup>.

### ***2.2.2 Les jonctions gap***

Les jonctions de type gap sont des canaux permettant de connecter les cytoplasmes de deux cellules adjacentes. Un canal fonctionnel est formé par l'assemblage des connexons (formés de six molécules dites « connexines ») des deux cellules voisines<sup>132</sup> (Figure 8). Ces canaux peuvent faire passer des petites molécules comme des ions, des métabolites, des seconds messagers mais aussi des peptides jusqu'à 1,8 kDa<sup>133</sup>. Chez les vertébrés, il existe plus de 20 isoformes de connexines classées selon leur poids moléculaire qui varie de 25 à 62 kDa. Généralement, lorsque deux cellules entrent en contact, elles forment plusieurs canaux qui sont regroupés au point d'attachement : c'est ce qu'on appelle la plaque de jonction de type gap. Des interactions homotypiques sont formées lorsque les deux cellules expriment les mêmes connexons, et hétérotypiques lorsque des connexons différents sont connectés<sup>134</sup>.



**Figure 8 : Connexines, connexons, canaux intercellulaires et jonctions gap.** Lorsque des monomères de connexine s’assemblent en hexamère, elles forment un canal que l’on appelle le connexon. Lorsque deux cellules entrent en contact, elles peuvent former des canaux intercellulaires composés de deux connexons, chacun appartenant à l’une des deux cellules. Lorsque ces canaux se regroupent au point de contact, il y a alors formation d’une jonction gap. Les cytoplasmes des deux cellules sont alors connectés et le passage de molécules de petite taille peut avoir lieu. *Adapté de Goodenough DA, Paul DL, Nature Reviews Molecular Cell Biology 2003.*

Dans le système immunitaire, la principale connexine exprimée de façon assez ubiquitaire est la connexine 43 (ou Cx43) et beaucoup plus rarement la Cx40 (au niveau des lymphocytes T et B), la Cx37 (macrophages et monocytes), la Cx32 (mastocytes) et la Cx30.3 (thymocytes). Les immunologistes ont commencé assez récemment à s’intéresser à ces jonctions gap et plus particulièrement à l’implication de la Cx43, puisqu’elle est présente dans toutes les cellules immunes. Ainsi, les jonctions gap sont impliquées dans le transfert de peptides antigéniques à partir de cellules vivantes ou apoptotiques aux DC<sup>133,135</sup>.

Les membres du laboratoire de J. Neefjes ont utilisé des lignées de carcinome squameux humaines (A431) dans lesquelles ils ont transfecté la Cx43 (puisque ces cellules tumorales ne l'expriment pas normalement). Ils ont ensuite micro injecté ces cellules avec du peptide couplé à la fluorescéine et du dextran-TexasRed (de poids moléculaire plus élevé) et ainsi montré que seul le peptide pouvait être transféré aux cellules voisines, à condition que la Cx43 soit présente. Finalement, ils ont infecté ces cellules avec le virus de la grippe et après culture avec des monocytes HLA-A2<sup>+</sup>, ils ont montré que des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'épitope FluM<sub>57-65</sub> pouvaient être activés, impliquant un transfert d'antigène entre la cellule donneuse et l'APC par les jonctions gap, conduisant à une présentation croisée efficace<sup>133</sup>. Il s'agit du premier papier montrant le rôle des jonctions gap dans la présentation croisée. Dans l'étude suivante, les mêmes cellules A431/Cx43 ont été rendues apoptotiques. Tant que ces cellules ne forment pas de corps apoptotiques et gardent leur intégrité membranaire, elles peuvent transmettre des peptides clivés par les caspases via les jonctions gap aux DC. Ces peptides peuvent emprunter la voie de présentation croisée qui permet l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques<sup>135</sup>.

De plus, il a été montré dans un modèle murin, que les DC sont capables de former des jonctions gap entre elles après stimulation par LPS et IFN $\gamma$ , et qu'elles régulent positivement l'expression de molécules de maturation (CD40, CMH-II) et de costimulation (CD80, CD86). Cependant, l'utilisation d'un peptide inhibant spécifiquement les jonctions gap, le GAP27, diminue la maturation de ces DC<sup>136</sup>. Elgueta *et al* ont également montré un transfert de colorant fluorescent (Lucifer Yellow) d'une DC à un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> adjacent. Ce transfert semble sensible aux inhibiteurs des jonctions gap, comme l'oléamide ou le peptide 1848. De plus lorsque ces inhibiteurs sont appliqués, l'activation des lymphocytes T diminue drastiquement (diminution de la prolifération, de l'expression de CD69 et de la production d'IL-2)<sup>137</sup>.

Différentes équipes ont démontré l'importance des jonctions gap dans l'immunité anti-tumorale, essentiellement dans le mélanome. En effet, les travaux de Mendoza-Naranjo *et al* ont montré que les DC stimulées avec du lysat de cellules de mélanome humain et du TNF $\alpha$  étaient capables de se transférer des antigènes tumoraux via leurs jonctions gap, augmentant ainsi le niveau de présentation croisée de ces antigènes et la réponse T spécifique anti-mélanome<sup>138</sup>. En utilisant un clone de lymphocyte T cytotoxique (CTL), des cellules tumorales autologues de mélanome, et des cellules endothéliales dérivées de la même tumeur dans une matrice tridimensionnelle de collagène, le laboratoire de S. Chouaib a montré que la lyse spécifique des cellules endothéliales par les CTL nécessite la formation de jonctions gap entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales<sup>139</sup>. Sans formation de ces jonctions gap, le transfert d'antigènes ne peut se faire et les cellules endothéliales ne

peuvent donc plus être reconnues et lysées. Cette même équipe a confirmé très récemment, en histologie sur des biopsies de mélanome, la formation de jonctions gap *in vivo* entre les cellules tumorales et endothéliales et entre les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les cellules cibles<sup>140</sup>. De plus, le laboratoire de M. Rescigno a montré que l'infection de cellules de mélanome humain ou murin par la bactérie *Salmonella* induisait une augmentation d'expression de la Cx43<sup>141</sup>. Ces cellules peuvent ainsi former des jonctions gap avec les DC adjacentes et leur transférer des peptides antigéniques préprocessés. La réponse anti-tumorale dans ce système semble spécifique de la Cx43 puisque l'infection *in vivo* par la bactérie dans des tumeurs dépourvues de Cx43, ne génère pas de réponse anti-tumorale.

Toutes ces études montrent l'importance des jonctions gap dans le transfert de peptides. C'est donc un moyen que peuvent utiliser les DC pour acquérir des peptides antigéniques et les présenter aux lymphocytes T.

### **2.2.3 Les exosomes**

Les exosomes sont de petites vésicules membranaires (de 30 à 100 nm) qui sont sécrétées à partir de compartiments multivésiculaires (MVB pour multivesicular bodies) par la plupart des cellules vivantes<sup>142</sup>.

Les exosomes sont composés de protéines ubiquitaires et de protéines spécifiques de la cellule qui les a sécrétés. On y retrouve des composants du cytosquelette (tubuline, actine, cofiline, profiline), des protéines impliquées dans le trafic des vésicules intracellulaires (annexines et protéines Rab) et des protéines impliquées dans la signalisation (comme les protéines kinases ou les protéines G hétérotrimériques). Les exosomes contiennent également des HSPs (heat shock proteins) comme les HSP70 et HSP90 qui sont impliqués dans la présentation antigénique, des molécules du CMH de classe I et des tétraspanines (comme CD81 ou CD82) qui interagissent avec de nombreux partenaires comme les intégrines et les molécules du CMH. Les exosomes sont aussi composés de protéines impliquées dans des fonctions spécifiques de la cellule dont ils sont issus. Ainsi, les exosomes dérivés des APC sont riches en molécules du CMH de classe II, ceux dérivés des lymphocytes T contiennent des molécules du TCR et ceux dérivés des lymphocytes B contiennent des molécules du BCR, etc<sup>143</sup>.

Les exosomes peuvent aussi contenir des antigènes des cellules dont ils sont originaires. Ces antigènes, une fois les exosomes capturés par les DC (ou autres APCs), peuvent être dégradés en peptides et associés aux molécules du CMH pour une éventuelle présentation

aux lymphocytes T<sup>144</sup>. Par exemple, des exosomes sécrétés par des cellules infectées par des pathogènes, comme des macrophages infectés par *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium bovis*<sup>145</sup>, ou des cellules endothéliales infectées par *cytomégalo virus*<sup>146</sup>, contiennent des antigènes du pathogène et permettent l'induction de réponses T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> spécifiques. Les exosomes sécrétés par les cellules tumorales représentent aussi une source d'antigènes tumoraux pour les DC. L'étude du laboratoire de L. Zitvogel a montré que les exosomes produits par les cellules de mélanome contiennent des antigènes tumoraux comme melan-A/MART1, que peuvent internaliser les DC pour une présentation aux lymphocytes T (voir chapitre 3.3.1 p.64)<sup>147</sup>. De plus, sécrétés par des cellules tumorales stressées par un traitement à forte température<sup>148</sup> ou transfectées avec un gène de cytokine proinflammatoire<sup>149</sup>, les exosomes dérivés des tumeurs peuvent induire une réponse anti-tumorale efficace lorsqu'ils sont injectés dans la souris, et ils ont été testés dans des essais cliniques.

Ces études montrent que les exosomes ont pour rôle de 1) propager les antigènes ou les complexes CMH-peptide dans le but d'augmenter le nombre de DC pouvant les présenter et 2) interagir directement avec des lymphocytes T mémoires. Bien sûr, leur effet sur la réponse immunitaire dépend à la fois de l'état des DC qui les capturent et de leur composition moléculaire<sup>144</sup>.

#### **2.2.4 La trogocytose et le nibbling**

La trogocytose, nom donné par Etienne Joly et Denis Hudrisier, désigne initialement le transfert de fragments de membrane plasmique d'une APC vers un lymphocyte T lors de la formation d'une synapse immunologique<sup>150</sup>. Des échanges de fragments membranaires ont aussi été observés entre un lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxique et sa cellule cible. Dans tous les cas, ce mécanisme est actif et dépend de la signalisation déclenchée par le TCR<sup>151,152</sup>. Il apparaît très rapidement après la formation du conjugué entre deux cellules vivantes et n'est pas apparenté à de la phagocytose ou à de l'échange de corps apoptotiques. Par exemple, lors d'une synapse entre une DC et un lymphocyte T, le fragment membranaire reconnu et internalisé par le TCR est typiquement le complexe CMH-peptide<sup>153</sup>. Durant ce processus, les lymphocytes vont acquérir diverses molécules qui peuvent influencer directement ou indirectement leur phénotype et leur fonction<sup>150</sup>.

Le nibbling ou « grignotage » est un terme qui a été utilisé par le laboratoire de Barratt-Boyes, pour le différencier de la trogocytose. En effet, dans leurs travaux utilisant des cellules de primates non humaines, ils remarquent que les DC peuvent internaliser du

matériel membranaire et cytoplasmique provenant d'une autre DC. Les DC immatures semblent les plus efficaces pour ce processus et sont capables d'internaliser du matériel membranaire et cytoplasmique de macrophages, de lymphocytes B et de lymphocytes T activés. Ces auteurs décrivent ainsi un second mécanisme d'échange entre deux cellules vivantes hématopoïétiques dont la conséquence est la présentation croisée (voir chapitre 3.3.1 p.64)<sup>154</sup>.

### **2.2.5 Le cross-dressing**

Le cross-dressing correspond au transfert direct du complexe CMH-peptide (processé par la cellule) provenant de cellules apoptotiques<sup>155</sup>, de cellules tumorales<sup>156</sup>, ou bien de cellules infectées<sup>157</sup> aux DC. La DC peut ensuite activer efficacement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> naïfs sans avoir à processor elle-même l'antigène et à le charger sur ses molécules du CMH de classe II ou de classe I respectivement. Le laboratoire de M.J. Bevan montre que le cross-dressing aurait plutôt un rôle prédominant dans l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoire, après une infection virale (ici par le VSV, ou virus de la stomatite vésiculeuse)<sup>157</sup>.

## **3 La présentation antigénique**

Les DC ont des propriétés uniques de présentation de l'antigène. Il existe aujourd'hui trois voies de présentation : les voies de présentation classiques : la présentation de molécules associées aux molécules du CMH-II ou du CMH-I et la présentation croisée. Ces trois voies seront décrites dans cette partie.

### **3.1 Présentation des antigènes associés aux molécules du CMH de classe II**

Cette présentation permet l'association de peptides antigéniques de taille très variable (entre 12 et 26 acides aminés)<sup>158</sup> aux molécules du CMH-II, et leur présentation aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ces peptides proviennent majoritairement d'antigènes exogènes (présents sur les microorganismes commensaux, les pathogènes, ou encore les cellules



mourantes) et sont présentés par la voie endo-lysosomale (ou canonique) principalement. Cette voie nécessite 1) la génération de peptides dans des compartiments endo-lysosomaux, contenant les molécules du CMH-II et 2) le chargement de ces peptides sur les molécules du CMH-II et leur externalisation à la membrane plasmique (Figure 9 p.58). Il existe également des voies alternatives pour la présentation de classe II dont je ne parlerai pas.

### **3.1.1 Sources d'antigènes pour la présentation par les molécules du CMH de classe II**

Généralement, les antigènes présentés par les molécules du CMH-II proviennent de protéines exogènes internalisées par les APC. Cependant, à l'état basal (sans apport d'antigènes exogènes), les études d'analyse en spectrométrie de masse des peptides chargés sur les molécules du CMH-II ont révélé qu'il s'agissait essentiellement de peptides issus de protéines d'origine endogène<sup>159,160,161</sup>. La plupart correspondent à des protéines membranaires, des protéines intervenant dans la voie endocytaire, plus particulièrement des protéines reliées aux molécules du CMH.

En 2001, le laboratoire de A. Rudensky a montré qu'une grande proportion de protéines cytosoliques pouvait s'associer au CMH-II (dans des lymphocytes B activés et des macrophages). Par des expériences fonctionnelles *ex vivo*, ils ont montré que les DC de la rate et du thymus pouvaient présenter ces peptides dérivés de protéines cytosoliques via leurs molécules du CMH-II<sup>162</sup>. De plus, très récemment, l'équipe de Bozzacco *et al* a montré également la présence de peptides provenant de protéines endogènes associés aux molécules du CMH-II dans des DC murines de la rate fraîchement isolées. Ces protéines peuvent être membranaires, cytosoliques, endo-lysosomales, nucléaires, et seulement 25% de ces protéines semblent provenir de compartiments extracellulaires<sup>163</sup>.

Certaines études ont montré que les antigènes endogènes cytosoliques ou nucléaires chargés sur les molécules du CMH-II étaient générés par autophagie<sup>164,165</sup>. En effet, l'induction de l'autophagie par déprivation en facteurs de croissance augmente considérablement le nombre de peptides antigéniques cytosoliques présentés sur les molécules du CMH-II<sup>164</sup>.

### 3.1.2 Génération des peptides se liant aux molécules du CMH de classe II

L'assemblage des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules du CMH-II se fait dans le réticulum endoplasmique (RE) à l'aide d'une molécule accessoire : la chaîne invariante Ii<sup>166</sup>. L'association efficace de la chaîne Ii avec les dimères  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules du CMH-II permet l'export de ces molécules du RE vers des compartiments endosomaux tardifs, les MIIC (MHC class II compartment)<sup>167,168</sup>. La chaîne invariante Ii contient une région CLIP (Class II-associated Ii-derived peptide) au niveau du sillon peptidique bloquant ainsi la liaison d'autres peptides dans le RE<sup>169</sup>. En effet, l'utilisation d'une souris déficiente pour la chaîne Ii indique qu'il y a un nombre plus important d'antigènes endogènes présentés par les molécules du CMH-II, bien que ce processus ne soit pas très efficace<sup>170</sup> puisque les molécules du CMH-II ne sont pas stables en l'absence de la chaîne Ii<sup>171</sup>. La partie intracytoplasmique de la chaîne Ii contient un motif dileucine qui permet de diriger les molécules du CMH-II vers les MIIC. Ces motifs sont reconnus par des protéines adaptatrices AP1 (adaptateur du réseau trans-Golgi) et AP2 (adaptateur de la membrane plasmique)<sup>172</sup>. Ainsi, la chaîne Ii peut adresser les molécules du CMH-II directement par l'appareil de Golgi (processus dominant dans les DC matures) ou par endocytose à partir de la membrane plasmique (processus important dans les DC immatures) vers les MIIC<sup>167</sup>.

Pour être efficacement dégradées et permettre la génération de peptides antigéniques, les protéines doivent être dénaturées. La protéine endosomale GILT (gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase), active à faible pH, est capable de réduire les ponts disulfures présents dans la plupart des protéines<sup>173</sup>. Elle est présente constitutivement dans les APC et peut être induite par l'IFN $\gamma$  dans d'autres cellules. Le pH acide et l'action de chaperonnes peuvent aussi participer à la dénaturation des protéines avant leur complète dégradation par les protéases résidentes<sup>174</sup>.

Les compartiments MIIC ont un pH acide et contiennent de nombreuses protéases, dont l'action dépend de l'acidification des MIIC<sup>175</sup>. Elles sont capables de cliver les protéines en oligopeptides de longueur adéquate pour le chargement sur les molécules du CMH-II. Une première famille de protéases impliquées est la famille des cathepsines : protéases à cystéine en majorité (sauf certaines qui sont des protéases à aspartate ou à sérine)<sup>176</sup>. Il semble que les cathepsines S et L jouent un rôle majeur dans la génération de peptides antigéniques<sup>177</sup>. En effet, l'utilisation de souris déficientes pour ces cathepsines montre une diminution de la présentation antigénique de classe II<sup>176</sup>. Une seconde protéase présente dans les MIIC joue également un rôle dans le processing des antigènes. Il s'agit de l'asparagine endopeptidase (AEP), qui permet un clivage des protéines par leurs résidus asparagine<sup>178</sup>.

Ces enzymes sont régulées par le pH, lui-même régulé par la présence de cytokines pro ou anti-inflammatoires et des PAMPs. Lors de la maturation des DC, la pompe à proton V-ATPase s'active et les lysosomes s'acidifient, ce qui permet une protéolyse plus intense et la formation d'un plus grand nombre de complexes CMH-II/peptide<sup>179</sup>.

### **3.1.3 Chargement des peptides sur les molécules du CMH de classe II**

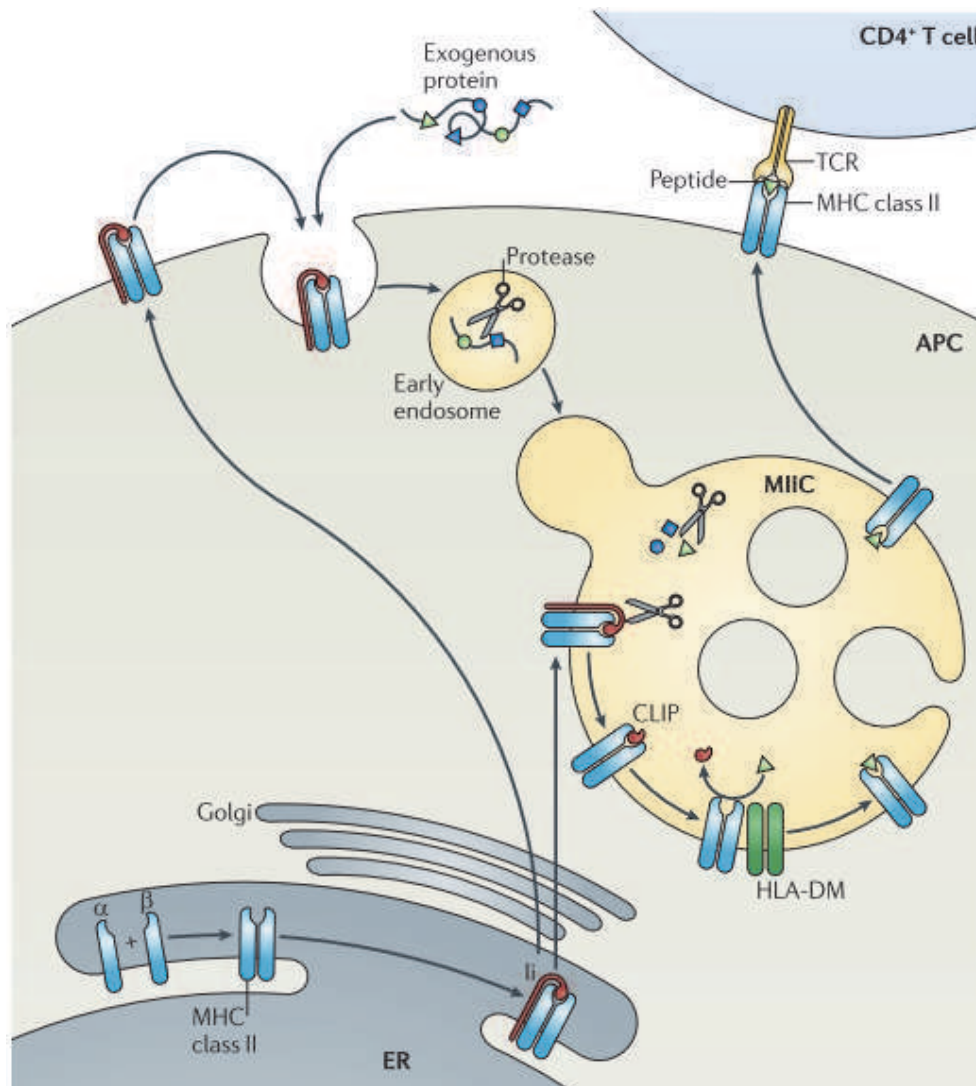
Une fois que les complexes molécules du CMH-II/chaîne li ont atteint les MIIC, les protéases telles que AEP et les cathepsines S et L se chargent du clivage de la chaîne li de façon à laisser uniquement le fragment CLIP au niveau du sillon peptidique<sup>180</sup>.

La molécule HLA-DM (ou H2-M chez la souris) est un hétérodimère (HLA-DM A et B) de la famille des molécules du CMH-II non classiques qui colocalise avec les molécules du CMH-II dans les MIIC<sup>181</sup>. Cette molécule est une chaperonne qui facilite l'échange du fragment CLIP avec des peptides de plus haute affinité. En effet, en s'associant avec le complexe CMH-II/CLIP, la molécule HLA-DM catalyse la libération de CLIP laissant ainsi le sillon peptidique de la molécule du CMH-II libre afin de permettre l'intégration d'un peptide antigénique<sup>182,183,184</sup>. Cette chaperonne permet également de stabiliser les molécules du CMH-II avec ou sans CLIP, empêchant ainsi leur agrégation ou leur dégradation avant le chargement de peptides de haute affinité. Elle a ainsi un rôle d'éditeur en sélectionnant les peptides de bonne taille et de bonne affinité, susceptibles de se lier aux molécules du CMH-II<sup>185</sup>.

La molécule HLA-DO (ou H2-O chez la souris) appartient à la famille des molécules du CMH-II non classiques, principalement retrouvée dans les lymphocytes B, et dans certains sous types de DC. Elle servirait de co-chaperonne de HLA-DM en formant un complexe. Les études sur la fonction de HLA-DO sont assez contradictoires mais suggèrent qu'elle inhibe le chargement de peptides sur les molécules du CMH-II, aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Cette fonction pourrait aussi dépendre du pH : HLA-DO inhiberait l'activité de HLA-DM dans les compartiments endocytaires précoces (où le pH est supérieur à 5.5), alors qu'elle permettrait le chargement efficace des peptides dans les compartiments tardifs et lysosomaux (où le pH est inférieur à 5). Récemment, une étude a montré que HLA-DO agit comme un analogue de substrat et inhibe HLA-DM par un mécanisme de compétition<sup>186</sup>.

Après chargement des peptides sur les molécules du CMH-II, ces complexes sont dirigés vers la membrane plasmique. La libération des molécules contenues dans les MIIC est contrôlée par différents facteurs tels que le cholestérol, le pH cytosolique, les protéines kinases et GTPases<sup>167</sup>. Le transport rapide des MIIC est régulé par des moteurs associés aux microtubules : les dynéines pour un transport rétrograde et les kinésines pour un transport

antérograde. Les DC possèdent des propriétés uniques dans le transport des vésicules provenant des MIIC puisqu'il peut être régulé par des signaux de maturation. Par exemple, le LPS déclenche la formation de tubules qui sont issus des MIIC, générant un réseau complexe de vésicules mobiles et de tubules qui fusionnent avec la membrane plasmique<sup>167</sup>.



**Figure 9 : La présentation par les molécules du CMH-II.** Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules du CMH-II s'assemblent dans le RE et forment un complexe avec la chaîne invariante Ii. L'hétérotrimère CMH-II/Ii est transporté par le Golgi vers les MIIC, soit directement, soit via la membrane plasmique. Les protéines endocytées et la chaîne Ii sont dégradées par les protéases des MIIC (AEP, cathepsine S et L). Le fragment CLIP (class II associated Ii peptide) reste au niveau du sillon peptidique des molécules du CMH-II et son échange avec un peptide antigénique de haute affinité se fait à l'aide de la molécule chaperonne HLA-DM (ou H2-M chez la souris). Les molécules du CMH-II sont alors transportées vers la membrane plasmique pour présenter les antigènes peptidiques aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. *Adapté de Neeffjes J, Jongmsma ML, Paul P, Bakke O, Nature Reviews Immunology 2011.*

## 3.2 Présentation des antigènes associés aux molécules du CMH de classe I

Cette présentation permet l'association de peptides antigéniques de taille restreinte à 8-9 acides aminés<sup>167</sup> aux molécules du CMH-I, et leur présentation aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Contrairement aux molécules du CMH-II, les molécules du CMH-I sont présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme et permettent de présenter des peptides endogènes de différentes sources. Nous verrons dans ce chapitre 1) de quelles origines proviennent ces antigènes, 2) comment ces antigènes sont dégradés en peptides et enfin 3) comment sont-ils chargés sur les molécules du CMH-I (Figure 10 p.60).

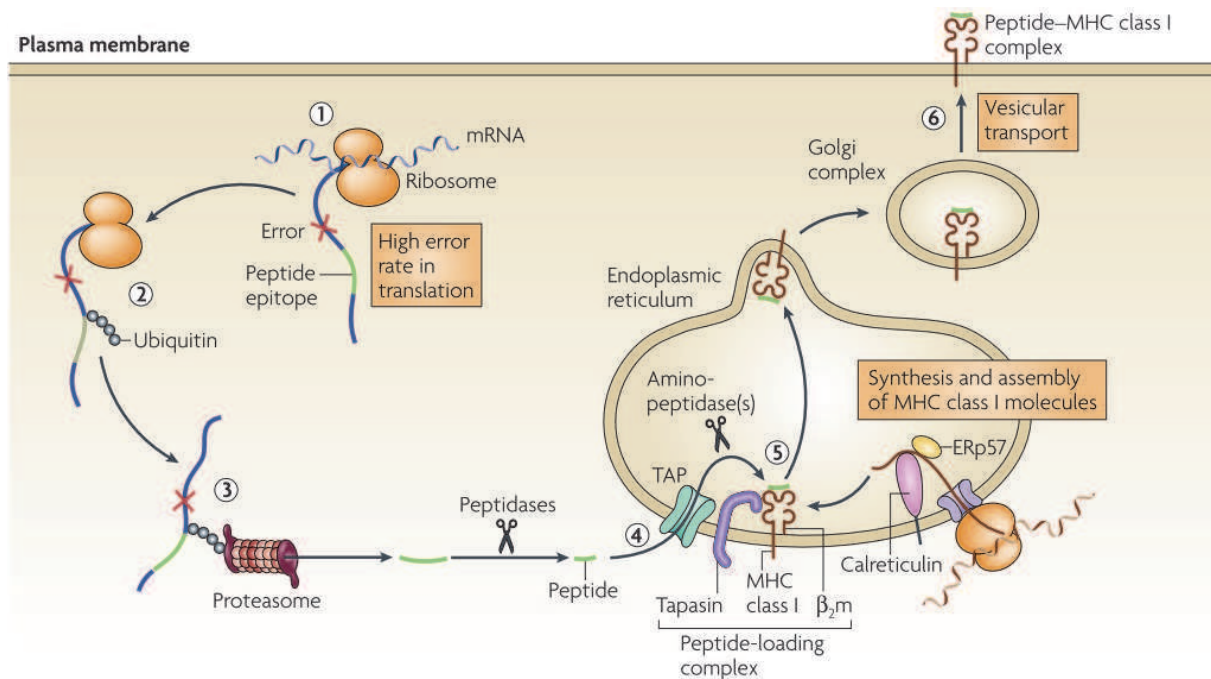
### ***3.2.1 Sources d'antigènes pour la présentation par les molécules du CMH de classe I***

Les protéines endogènes de la cellule constituent la première source d'antigènes décrite pour la présentation par les molécules du CMH-I. Ceci permet la présentation constante des constituants du soi mais aussi de révéler la présence de microorganismes intracellulaires ou encore l'expression d'oncogènes. Les antigènes présentés sur les molécules du CMH-I proviennent des protéines dégradées en fin de vie (on les appelle alors les protéines « retraitées »), suite à leur renouvellement continu (que l'on appelle le « turn-over »), ou des produits défectueux de la synthèse ribosomale ou DRiPs (defective ribosomal products)<sup>187</sup>.

En 1996, l'équipe de J. Yewdell a émis l'hypothèse que de nombreux peptides endogènes provenaient des DRiPs, définis comme des polypeptides issus d'un arrêt précoce de la synthèse protéique ou mal repliés. Il faisait référence à des produits défectueux causés par une erreur de traduction ou une erreur post-traductionnelle respectivement<sup>187</sup>. Aujourd'hui, ces DRiPs sont aussi le résultat d'une erreur de transcription, d'une mauvaise incorporation d'acides aminés, d'une délétion, ou encore d'erreurs post-traductionnelles comme un mauvais repliement, un mauvais assemblage oligomérique ou un mauvais adressage<sup>167</sup>. Ils correspondent à 30%, voire d'avantage des protéines de la cellule<sup>188</sup>, et sont immédiatement dégradés après ubiquitination, pour empêcher la formation d'agrégats de protéines qui pourraient affecter la viabilité de la cellule.

Les DRiPs permettraient d'expliquer, dans le contexte d'une infection virale, 1) l'antigénicité de gènes viraux tronqués ou mal ciblés et 2) la génération très précoce (en une

heure) de peptides à partir de protéines virales très stables<sup>189</sup>. Ils pourraient ainsi constituer une source majoritaire de peptides antigéniques et permettraient d'expliquer la présentation rapide de peptides directement synthétisés, évitant ainsi la présentation de protéines « retraitées » dont le turn-over naturel peut prendre plusieurs heures. L'immunosurveillance par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> serait alors plus rapide et donc plus efficace.



**Figure 10 : La présentation par les molécules du CMH-I.** Les protéines endogènes « retraitées » et les DRiPs sont pris en charge par des chaperonnes qui les ubiquitinent. Ces produits alors ubiquitinylés sont reconnus par le protéasome (ou immunoprotéasome dans le cadre d'un stress cellulaire ou d'une production d'IFN $\gamma$ ) et dégradés en peptides. Dans le cytosol, ces peptides peuvent être dégradés par des aminopeptidases comme TPPII ou la nardilysine avant d'entrer dans le RE à l'aide de TAP. Une fois dans le RE, ces peptides sont une dernière fois dégradés par ERAAP/ERAP1 qui permet de fournir des peptides de bonne taille. Les peptides sont ensuite chargés sur les molécules du CMH-I grâce au PLC (peptide loading complex). Les peptides qui n'ont pas réussi à se lier aux molécules du CMH-I sont éliminés via la voie ERAD pour un retour dans le cytosol (non représenté sur cette figure). Une fois le complexe CMH-I/peptide formé, il se dirige vers la membrane plasmique via l'appareil de Golgi. *Adapté de Vyas JM et al, Nature Reviews Immunology 2008*<sup>190</sup>.

### **3.2.2 Génération des peptides se liant aux molécules du CMH de classe I**

Les peptides qui peuvent se lier aux molécules du CMH-I sont plus petits que ceux s'associant aux molécules du CMH-II : leurs extrémités C-terminale et N-terminale interagissent avec le sillon et sont donc importantes pour une bonne liaison. Les protéines endogènes sont dégradées par le protéasome puis par d'autres aminopeptidases, dont nous allons voir le rôle<sup>191</sup>.

Avant d'être dégradées entièrement en peptides capables de se lier sur les molécules du CMH-I, les protéines cytosoliques (récemment synthétisées ou les DRiPs) s'associent à la molécule chaperonne Hsp90 $\alpha$ , puis sont ubiquitinylées par CHIP (Carboxylterminus of Hsc70-interacting protein)<sup>192</sup>. Les protéines ubiquitinylées sont reconnues par le protéasome puis dégradées et les fragments tronqués s'associent ensuite à une autre molécule chaperonne TRiC (TCP-1 ring complex)<sup>193</sup>, avant d'être à nouveau recoupés par d'autres peptidases<sup>191</sup>.

Le protéasome 26S est composé d'une sous unité 20S et de deux sous-unités 19S. La sous unité 20S correspond au cœur du complexe. Elle a une forme cylindrique et possède une activité protéase. Les deux sous unités régulatrices 19S se lient à chaque extrémité du cœur catalytique et lient les protéines ubiquitinylées<sup>194</sup>. Le protéasome se situe dans le noyau ou dans le cytoplasme et génère des peptides avec une extrémité C-terminale adéquate pour leur liaison aux molécules du CMH-I<sup>167,195</sup>. Le répertoire des peptides produits par le protéasome varie selon les sous-unités qui le composent (variant selon les tissus) et l'expression de cofacteurs modulateurs (en réponse à un environnement inflammatoire notamment). Par exemple, les cellules du système immunitaire et particulièrement les APC, remplacent certaines sous unités du protéasome par les sous unités MECL-1, LAMP2 et LAMP7, sous l'influence de l'IFN $\gamma$  : on le nomme alors l'immunoprotéasome<sup>196</sup>. Il est généralement considéré qu'il favorise la présentation d'antigènes sur les molécules du CMH-I en générant des peptides immunogéniques. De plus, il est plus actif que le protéasome 26S constitutif, ce qui lui permet de se charger de plus de substrats et donc générer plus de peptides pour les molécules du CMH-I<sup>167</sup>. Finalement, en plus de ces propriétés catalytiques, le protéasome serait capable d'induire un épissage des protéines : les peptides générés par le protéasome possèdent parfois des séquences ne se trouvant pas dans la séquence d'origine<sup>197</sup>. Le potentiel de génération de peptides se liant aux molécules du CMH-I est donc très large.

Après digestion par le protéasome, les peptides sont digérés par des aminopeptidases cytoplasmiques et du RE afin d'obtenir la taille adéquate. Il existe un nombre important

d'aminopeptidases. Par exemple, TPPII (Tripeptidyl peptidase II) et la nardilysine, peuvent cliver des fragments peptidiques de longue taille<sup>198,199</sup>. Les peptides de plus petite taille (de 8 à 15 acides aminés) peuvent eux être pris en charge par TOP (thimet oligopeptidase), et les peptides encore plus petits sont pris en charge par différentes peptidases cytosoliques<sup>200</sup>. Ces peptidases semblent essentielles à la génération de peptides particuliers mais n'ont pas un rôle obligatoire dans la génération de l'ensemble des peptides se liant aux molécules du CMH-I. En effet, les souris déficientes pour TPPII ne présentent pas d'altération importante de la présentation antigénique<sup>201</sup>.

Lorsque les peptides rejoignent le RE, d'autres enzymes de dégradation interviennent. Il s'agit de ERAAP (amino peptidase resident in the ER) chez la souris, et de ERAP1 et ERAP2 chez l'Homme<sup>202,203</sup>. Elles achèvent la dégradation peptidique car des acides aminés résiduels en N-terminal empêchent leur association avec les molécules du CMH-I. Cette dernière digestion permet finalement d'obtenir des peptides de 8-9 acides aminés, taille adaptée pour leur liaison aux molécules du CMH-I.

### ***3.2.3 Chargement des peptides sur les molécules du CMH de classe I***

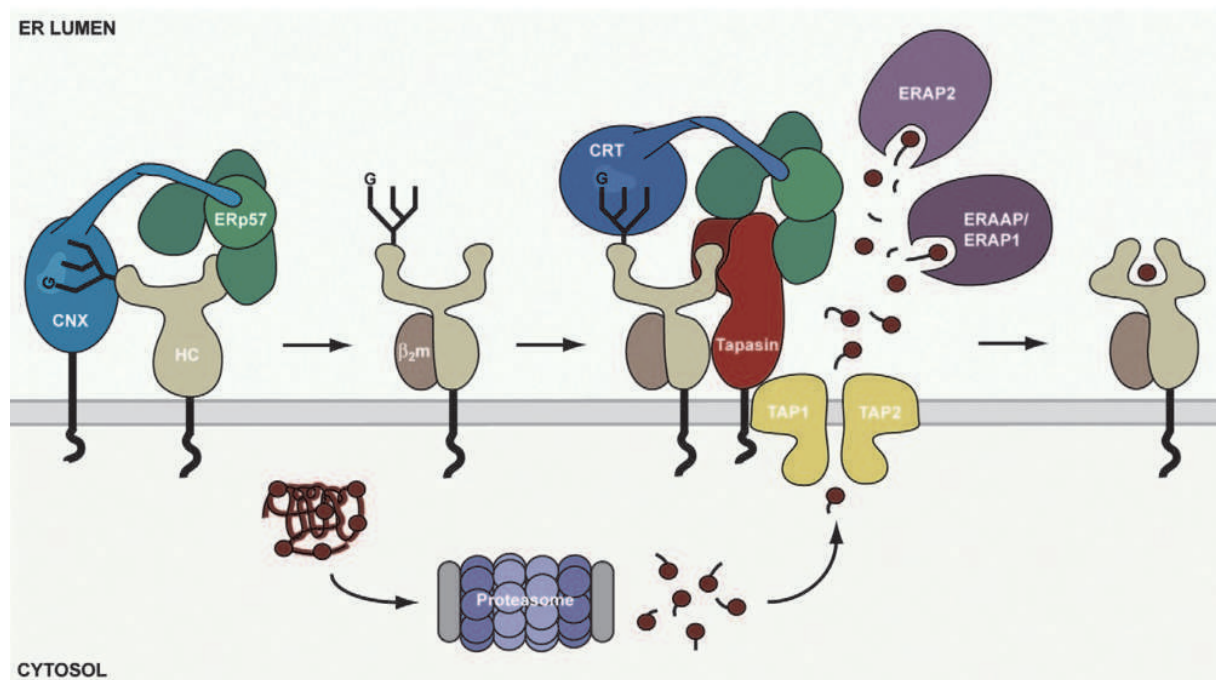
Une fois les peptides générés, ils doivent avoir accès aux molécules du CMH-I localisées dans le RE. Ce transport peut avoir lieu grâce au transporteur de peptides TAP (transporter associated with antigen processing). TAP appartient à la famille de protéines de transport appelée ABC (ATP-binding cassette transporter) et est un hétérodimère composé de deux protéines : TAP1 et TAP2. Le transport des peptides est couplé à l'hydrolyse de l'ATP et dépend de la taille des peptides et de leur séquence<sup>204,205</sup>. En plus de son activité de transporteur, TAP agit aussi comme une plateforme pour le repliement des molécules du CMH-I en se liant à sa chaperonne : la tapasine<sup>206</sup>.

Le complexe formé de TAP, de la tapasine, des molécules du CMH-I, de Erp57 et de la calréticuline est nommé le PLC (peptide loading complex) (Figure 11). L'assemblage de ce dernier et le chargement des peptides sur les molécules du CMH-I se fait de manière séquentielle. Tout d'abord, la calnexine et Erp57 favorisent le repliement correct de la chaîne lourde seule. Ensuite, la calréticuline et Erp57 prennent en charge la chaîne lourde associée à la chaîne  $\beta 2$  microglobuline ( $\beta 2m$ ). Finalement, la tapasine permet de rapprocher les molécules du CMH-I à TAP pour favoriser le chargement peptidique<sup>207</sup>. Le PLC permet le chargement efficace des peptides sur les molécules du CMH-I. Après liaison d'un peptide de bonne affinité, le complexe CMH-I/peptide est libéré de ses chaperonnes et dirigé vers les



voies de sécrétion en transitant via l'appareil de Golgi pour y être glycosylé et adressé à la membrane.

Lorsque les peptides ne parviennent pas à se lier aux molécules du CMH-I, ils sont éliminés par la voie ERAD et ont accès de nouveau au cytosol pour une destruction ou un nouvel essai auprès de TAP pour leur translocation dans le RE où ils pourront être reconsidérés pour leur liaison aux molécules du CMH-I<sup>167</sup>.



**Figure 11 : Assemblage et chargement des molécules du CMH-I.** Le bon repliement de la chaîne lourde se fait grâce à la calnexine et à ERp57. La chaîne lourde s'associe ensuite avec la  $\beta$ -2-microglobuline ( $\beta$ 2m) pour générer un hétérodimère vide et fortement instable. Celui-ci est ensuite stabilisé par la liaison de la tapasine, de ERp57, de la calréticuline et de TAP formant alors le PLC, attendant la liaison d'un peptide. TAP permet le transport de peptides cytosoliques dans le RE où ils sont de nouveaux dégradés par ERAAP (chez la souris) ou ERAP1 (chez l'homme). Lorsque des peptides de haute affinité et de bonne taille sont générés, ils sont chargés sur les molécules du CMH-I vide à l'aide du PLC. Le complexe CMH-I/peptide se dissocie alors du PLC et est adressé à la membrane plasmique. *Adapté de Wearsch PA, Cresswell P, Current Opinion in Cell Biology 2008.*

### 3.3 Présentation croisée des antigènes sur les molécules du CMH de classe I

La présentation d'antigènes sur les molécules du CMH-I permet l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Puisque toutes les cellules nucléées de l'organisme possèdent des molécules du CMH-I, elles sont toutes capables de présenter des antigènes endogènes (du soi, après infection ou transformation tumorale) et ainsi d'activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Ceci est vrai mais uniquement dans le cas où les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ont déjà été activés une première fois par les DC. En effet, l'activation des lymphocytes T naïfs nécessite la présentation d'antigènes par les DC, phénomène appelé « *priming* ». Or, comment expliquer le *priming* de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de microorganismes qui n'infectent pas directement les DC, ou d'antigènes provenant de cellules tumorales ? Ceci n'est possible que parce que les DC sont capables de récupérer ces antigènes de façon exogène et de les présenter sur leurs molécules du CMH-I : ce phénomène s'appelle la présentation croisée.

La présentation croisée est donc essentielle à la présentation d'antigènes qui ne sont pas synthétisés directement dans les DC et donc à l'établissement de réponses T CD8<sup>+</sup> anti-infectieuses ou anti-tumorales. Elle est aussi importante dans l'induction de la tolérance : en fonction de l'environnement, la présentation croisée peut induire une délétion clonale, une inactivation fonctionnelle (anergie) ou bien la programmation d'un phénotype T régulateur<sup>15,208,209</sup>. Son étude est aujourd'hui primordiale pour la vaccination et pour l'immunothérapie mettant en jeu une présentation par les DC.

La présentation croisée a été mise en évidence en 1976 par le laboratoire de Michael J. Bevan. Ils ont montré que lors de l'injection de splénocytes de souris homozygotes H-2<sup>b</sup> ou H-2<sup>d</sup> à des souris H-2<sup>b/d</sup> ou d'haplotype différent, une proportion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> réactifs du receveur était restreinte aux molécules du CMH-I du receveur. Ces lymphocytes T CD8<sup>+</sup> avaient été activés par un peptide dérivant d'antigènes mineurs d'histocompatibilité du donneur, acquis par les APC du receveur et présenté par les molécules du CMH-I de ce dernier<sup>210,211</sup>.

#### **3.3.1 Sources d'antigènes pour la présentation croisée**

La recherche des sources d'antigènes induisant une présentation croisée efficace est essentielle, notamment dans les protocoles d'immunothérapie ciblant les DC afin d'induire une réponse T CD8<sup>+</sup> optimale (chapitre 4 p.78). Des sources exogènes d'ADN et d'ARN sont

parfois utilisées par les DC pour la présentation croisée, mais dans la majorité des cas, elles internalisent des protéines sous différentes formes.

### 3.3.1.1 Les antigènes solubles

Les antigènes solubles correspondent à l'une des sources les plus utilisées pour réaliser des expériences fonctionnelles de présentation croisée *in vitro*. Cependant, *in vivo*, l'immunisation de souris avec des antigènes solubles sans chaperonnes ou sans adjuvant induit une faible stimulation des CTL<sup>212</sup>. Ces antigènes solubles correspondent à des protéines ou des peptides.

Le laboratoire de P.K. Srivastava a montré que les molécules chaperonnes HSPs isolées de tumeurs étaient immunogéniques et stimulaient l'immunité anti-tumorale T CD8<sup>+</sup> spécifique. Une plus grande caractérisation a finalement montré que le caractère immunogénique provenait de petits peptides associés aux HSPs<sup>213,214</sup>. Différentes HSPs (comme HSP70 et HSP90), et gp96 ont été montrées comme étant capables de lier ces peptides. Sans les HSPs, les peptides perdraient leur potentiel immunogène<sup>215</sup>, indiquant que ce complexe représente une source efficace pour la présentation croisée *in vivo*<sup>212</sup>.

De plus, il a été montré que les récepteurs scavenger sont les principales molécules reconnaissant les HSPs. LOX-1 a notamment été identifié comme l'un de ces récepteurs sur les DC myéloïdes humaines et certaines APC murines<sup>216</sup>. En effet, l'utilisation d'un anticorps neutralisant dirigé contre LOX-1 empêche la fixation de HSP70 sur les DC et diminue la présentation croisée. De plus, cibler LOX-1 *in vivo* par le couplage de l'OVA à un anti-LOX-1, permet d'induire une réponse anti-tumorale (tumeur induite par injection de cellules EG7 en sous cutané)<sup>216</sup>.

### 3.3.1.2 Les complexes immuns

Un complexe immunitaire correspond à tout complexe formé d'un antigène et d'un anticorps. Les complexes immunitaires se forment naturellement lorsque les anticorps produits par les plasmocytes reconnaissent un épitope particulier sur l'antigène cible. Les complexes immunitaires peuvent être entre autres reconnus par les cellules phagocytaires qui possèdent à leur surface des récepteurs des immunoglobulines (ou FcγR).

D'abord considérés comme une source d'antigènes pour la présentation par les molécules du CMH-II, il a été montré que l'internalisation des complexes immuns par les FcγR sur les DC immatures conduisait à la présentation croisée de l'antigène associé<sup>217,218</sup>. De plus, la transfection de cellules épithéliales (APC non professionnelles) avec un vecteur codant pour le récepteur FcγRIIa permet à ces cellules de réaliser la présentation croisée d'un antigène délivré sous forme de complexe immun<sup>219</sup>. Une étude *in vivo* a également confirmé la présentation croisée des complexes immuns par les DC CD8α<sup>+</sup> et CD8α<sup>-</sup> démontrant donc leur pertinence en tant que source d'antigènes efficace pour la présentation croisée<sup>220</sup>.

Il semble que les DC soient très efficaces au transfert d'antigènes sous forme de complexes immuns dans leur cytosol, alors que les macrophages contiennent ces complexes dans des vésicules exprimant un niveau élevé de protéases et de cathepsine D, susceptibles de dégrader les antigènes et ainsi empêcher leur présentation aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup><sup>221</sup>.

### 3.3.1.3 Les antigènes particuliers

Les antigènes particuliers correspondent à différentes sources d'antigènes : ils comprennent les antigènes complexés à des billes de petite taille (1μm ou 3μm étant les plus utilisées pour des expériences *in vitro* et *in vivo*)<sup>222,223</sup>, les antigènes associés aux microorganismes tels que les levures ou les bactéries ainsi que les agrégats de protéines<sup>212</sup>. Ils sont capables, à l'inverse des antigènes solubles, d'induire de fortes réponses T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques<sup>224</sup>.

J'inclus également dans cette catégorie les exosomes. Même s'ils proviennent de cellules vivantes, ils sont considérés comme une source à part entière. Ceci dit, en vue de leur petite taille et de leur efficacité à induire de bonnes réponses T CD8<sup>+</sup>, j'estime qu'ils peuvent être considérés comme des antigènes particuliers.

Dans une première étude en 2001, le laboratoire de L. Zitvogel a montré que des exosomes étaient sécrétés à partir de cellules tumorales vivantes de mélanome. Ces exosomes mis en culture avec des DC pouvaient leur transférer des antigènes tumoraux, ce qui permettait ensuite aux DC d'induire une réponse T CD8<sup>+</sup> anti-tumorale *in vivo* contre une tumeur établie, après présentation croisée des antigènes contenus dans ces exosomes<sup>147</sup>. Les DC sont également capables de sécréter des exosomes qui peuvent être récupérés par d'autres DC pour induire une activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. D'ailleurs, *in*

*vivo*, les exosomes seuls ne peuvent induire l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du mélanome et sécréteurs d'IFN $\gamma$ , mais ont besoin d'un adjuvant, dans ce cas les DC matures<sup>225</sup>.

#### 3.3.1.4 Les antigènes cellulaires

En 2004, Lianjun Shen et Kenneth L. Rock ont réalisé une étude comparative afin d'évaluer la source la plus efficace pour la présentation croisée<sup>226</sup>. Ils ont utilisé des fibroblastes transfectés avec différentes formes de l'ovalbumine : une forme cytosolique, membranaire ou sécrétée. Bien que ces cellules génèrent le même nombre de peptides SIINFEKL (peptide antigénique de l'OVA), leur capacité à induire de la présentation croisée est différente. Cette capacité dépend du niveau de la protéine et/ou de sa localisation cellulaire mais pas des produits peptidiques générés par dégradation (et associés aux HSP). Ainsi, lorsque l'antigène est sous forme cytosolique, seule la fraction cytosolique est capable d'induire de la présentation croisée, et non la fraction membranaire, et inversement. Depuis, les antigènes cellulaires sont considérés comme la source induisant la présentation croisée la plus efficace. Ces antigènes cellulaires peuvent provenir aussi bien de cellules apoptotiques que de cellules vivantes, comme nous allons le voir.

**Les cellules apoptotiques :** Il est généralement admis que les cellules apoptotiques constituent la principale source d'antigènes cellulaires. En effet, elles présentent à leur surface des molécules « eat-me », comme la PS ou la calréticuline, permettant leur reconnaissance par les DC (chapitre 2.1.1 p.29).

Une étude pionnière réalisée par M. Albert *et al* en 1998, a montré que les DC étaient capables de capturer des cellules rendues apoptotiques (monocytes infectés par le virus de la grippe) et de présenter les antigènes internalisés sur les molécules du CMH-I<sup>227</sup>. La phagocytose des cellules apoptotiques serait restreinte aux DC immatures et impliquerait la présence de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  et du SR CD36 sur ces dernières<sup>122</sup>. Dans la majorité des cas, les cellules apoptotiques sont rapidement internalisées et ne perdent pas leur intégrité membranaire. Cette observation suggérait que les DC pouvaient phagocyter des cellules apoptotiques entières, ayant ainsi accès au répertoire antigénique entier de la cellule<sup>228</sup>. Cependant, M. Albert a ensuite montré *in vitro* et *in vivo* que les cellules apoptotiques fournissaient des antigènes pré-dégradés (supposés être protégés par des chaperonnes HSP) aux DC. Ce processus serait dominant en condition de stress (comme une infection virale) et

permettrait aux cellules apoptotiques de présélectionner les antigènes immunogéniques importants pour induire une présentation croisée efficace<sup>229</sup>.

La présentation croisée à partir de cellules apoptotiques implique souvent l'induction de la tolérance, phénomène alors appelé la « cross-tolérance ». Les DC capturent des antigènes à partir de différents tissus de l'organisme, les présentent aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, induisant dans un premier temps leur prolifération puis leur élimination<sup>230</sup>. Les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> seraient responsables de ce phénomène<sup>231</sup>. En effet, l'injection de cellules apoptotiques conduit à leur capture par ces DC<sup>232</sup> et à une réponse de type tolérogène<sup>233</sup>. L'induction d'une bonne réponse T CD8<sup>+</sup> immunogène nécessite l'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires, phénomène couramment appelé « help ». Ainsi, l'induction de la « cross-tolérance » par les cellules apoptotiques pourrait s'expliquer par le fait que les DC ayant capturé des cellules apoptotiques présentent les antigènes uniquement aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, sans le support du « help ». La nécrose, quand à elle, permettrait la présentation des antigènes à la fois aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, ce qui rendrait la réponse immunogène<sup>234</sup>.

Contrairement à la nécrose, l'apoptose a souvent été considérée comme un événement sans conséquence vis-à-vis du système immunitaire, car elle n'aurait pour but que la dégradation d'une cellule par un phagocyte<sup>228</sup>. En réalité, l'établissement d'une réponse déclenchée par une cellule apoptotique et la nature de cette réponse, tolérogène ou immunogène, va dépendre du type d'apoptose. En effet, la plupart des apoptoses induites en l'absence de signaux de danger, d'inflammation ou d'infection, aboutissent à des réponses de type tolérogène. Cependant, lorsque les cellules sont rendues apoptotiques par un traitement avec des anthracyclines (par exemple), elles expriment à leur surface la calréticuline, ce qui les rend immunogènes. Au contraire, le traitement de ces cellules avec la mitomycine C ou l'étoposide, n'induisent pas d'expression de la calréticuline, les rendant tolérogènes<sup>98</sup>. De plus, certaines apoptoses induisent le relargage de DAMPs (ATP, acide urique, HMGB1) (chapitre 2.1.2 p.38) comme le font les cellules nécrotiques, après une inflammation ou une infection, ou lorsque les cellules commencent à perdre leur intégrité membranaire lors d'un défaut de clearance.

Par ailleurs, certaines bactéries peuvent rendre les cellules apoptotiques immunogènes. C'est le cas de *Mycobacterium tuberculosis* qui survit dans le phagosome des macrophages, inhibant la maturation de ce dernier au stade phagolysosome. Cette bactérie ne pouvant lyser la membrane du phagosome, elle ne peut atteindre le cytoplasme pour rejoindre la voie de présentation par les molécules du CMH-I. Cependant, elle induit l'apoptose de ces macrophages qui vont ensuite former des corps apoptotiques contenant des antigènes de la

bactérie, qui peuvent ensuite être capturés par des DC capables de réaliser la présentation croisée d'antigènes de la bactérie<sup>235</sup>.

Le type d'apoptose induit, l'environnement où a lieu l'apoptose et le type de cellules qui prennent en charge les cellules apoptotiques jouent tous un rôle dans le type de réponses tolérogènes (« cross tolérance ») ou immunogènes (« cross priming ») induites.

**Les cellules vivantes :** Bien que les cellules apoptotiques soient une excellente source d'antigènes pour la présentation croisée, quelques équipes ont montré depuis ces dix dernières années, que les cellules vivantes peuvent aussi être une source efficace pour la présentation croisée par les DC.

Une première étude réalisée par l'équipe de S.M. Barrat-Boyes en 2001, a montré que des DC immatures, issues de monocytes de primate, pouvaient capturer du matériel membranaire et intracellulaire provenant de cellules vivantes *in vitro*. Les DC, et non les macrophages, étaient ainsi capables d'internaliser différents types de cellules hématopoïétiques comme des DC (immatures et matures), des macrophages, des lymphocytes B et des lymphocytes T activés. Après capture par les DC, les cellules donneuses d'antigènes restaient vivantes et pouvaient toujours interagir avec d'autres cellules. Les auteurs de cette étude ont finalement montré que les DC pouvaient récupérer un antigène du mélanome (gp100) endogène et exprimé par des DC vivantes, et que celui-ci pouvait efficacement activer des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques par présentation croisée<sup>154</sup>. Ils dénomment ce mécanisme de transfert « nibbling » et démontrent qu'il dépend des récepteurs scavenger de type A<sup>236</sup>.

Dans un modèle d'antigènes du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), notre laboratoire a montré en 2004 que les DC humaines sont capables de capturer des antigènes à partir de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés vivants et que la présentation croisée était aussi efficace que celle obtenue à partir d'antigènes provenant de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés apoptotiques<sup>237</sup>. La pertinence physiologique de cette étude a été validée quelques années plus tard par notre laboratoire dans un modèle murin *in vitro* et *in vivo*<sup>238</sup>. Nous avons ainsi pu montrer que des DC dérivant de moelle osseuse de souris capturaient des quantités comparables de matériel cellulaire (membranaire et cytosolique) à partir de fibroblastes vivants ou apoptotiques. La viabilité cellulaire a été scrupuleusement vérifiée tout au long des expériences, à l'aide de substrats d'enzyme fluorescents, ce qui a permis d'exclure que des cellules apoptotiques contaminantes soient responsables du phénomène observé. De plus, nous avons montré que cette capture avait bien lieu également *in vivo*, puisqu'après

injection intra-veineuse de cellules vivantes marquées, nous étions capables de retrouver leur marqueur dans les DC endogènes spléniques. Aussi, des expériences de microscopie en temps réel sur coupe de rate ont permis d'observer ce transfert *in vivo*. Cette capture permet l'induction d'une réponse fonctionnelle *in vitro* et *in vivo*, et ceci même en l'absence de DC endogènes fonctionnelles. Finalement, après un challenge tumoral par des cellules B16, la présentation croisée de cellules tumorales vivantes de mélanome B16 par les DC permet une protection plus efficace que lorsque les DC capturaient des cellules tumorales apoptotiques.

Dans une équipe chez l'Homme<sup>239</sup>, il a été montré qu'en utilisant deux types de pDC (des cellules primaires et une lignée de pDC) à l'état immature, elles ne sont pas capables de capturer des lymphocytes morts (par apoptose ou nécrose), opsonisés ou vivants. Seul l'infection de ces cellules par le virus de la grippe inactivé permet la reconnaissance et la présentation croisée d'antigènes viraux par les pDC aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Ces lymphocytes B infectés, non apoptotiques, expriment à leur surface l'hémagglutinine du virus de la grippe, ce qui permet leur reconnaissance par ces pDC. Cette étude indique que dans un cas de stress cellulaire (représenté par l'infection virale), des cellules alors non capturées peuvent devenir donneuses d'antigènes en exprimant des molécules particulières à leur surface (ici l'hémagglutinine).

Ces expériences *in vitro* et *in vivo* supportent bien l'idée que les cellules vivantes sont une source efficace pour la présentation croisée par les DC et devraient être également prises en compte pour l'induction d'une tolérance ou d'une immunogénicité contre le soi, les tumeurs, les greffes ou encore les pathogènes.

### **3.3.2 Les voies impliquées dans la présentation croisée**

Il existe principalement 2 voies de présentation croisée : la voie cytosolique, dans laquelle la dégradation des antigènes en peptides a lieu dans le cytosol ; et la voie vacuolaire, dans laquelle les antigènes sont dégradés au sein d'endosomes. Ces voies sont représentées dans la Figure 12 p.72.



### 3.3.2.1 La voie cytosolique

Cette voie de présentation est sensible aux inhibiteurs du protéasome<sup>240</sup>, suggérant que les antigènes exogènes internalisés par endocytose doivent gagner le cytosol pour y être dégradés par le protéasome. Les peptides ainsi générés peuvent rejoindre la voie classique de présentation par les molécules du CMH-I, ce qui implique le transport des peptides dans le RE par les molécules TAP1 et TAP2 pour leur chargement sur les molécules du CMH-I nouvellement formées. Cependant, il n'y a pas à l'heure actuelle de preuve directe que le chargement des peptides sur les molécules du CMH-I ait lieu dans le RE<sup>15</sup>. Le recrutement de TAP et du complexe de chargement peptidique (PLC) au niveau des phagosomes et endosomes suggère que ce chargement pourrait aussi avoir lieu dans des compartiments endocytaires<sup>241,242,243</sup>. Il a également été montré que la peptidase associée au RE (ERAP1)<sup>244</sup> et que l'aminopeptidase endosomale IRAP (insulin-regulated aminopeptidase)<sup>245</sup> sont impliquées dans la présentation croisée d'antigènes exogènes.

La présence dans les phagosomes et les endosomes de protéines qui sont normalement localisées dans le RE a été rapportée par plusieurs groupes, en utilisant des méthodes biochimiques, de la microscopie optique et électronique et des approches fonctionnelles. Récemment, Cebrian *et al* ont identifié la molécule Sec22b comme acteur clé dans la machinerie impliquée dans les interactions RE-phagosome<sup>246</sup>. En effet, ils ont montré que Sec22b, une SNARE (soluble NSF attachment protein receptor, famille de protéines impliquées dans la fusion de vésicules) résidente du RE (plus particulièrement dans les compartiments intermédiaire RE-Golgi, soit ERGIC), était nécessaire au recrutement de protéines du RE vers les phagosomes via son interaction avec la syntaxine 4. L'extinction de l'expression de Sec22b diminue la présentation croisée mais pas la présentation classique par les molécules du CMH-I et CMH-II. Les DC déficientes pour Sec22b exhibent une inhibition du transfert des antigènes du phagosome vers le cytosol et ces derniers sont dégradés plus rapidement dans les phagosomes. Ce résultat explique en partie comment des protéines du RE sont recrutées au niveau des phagosomes.

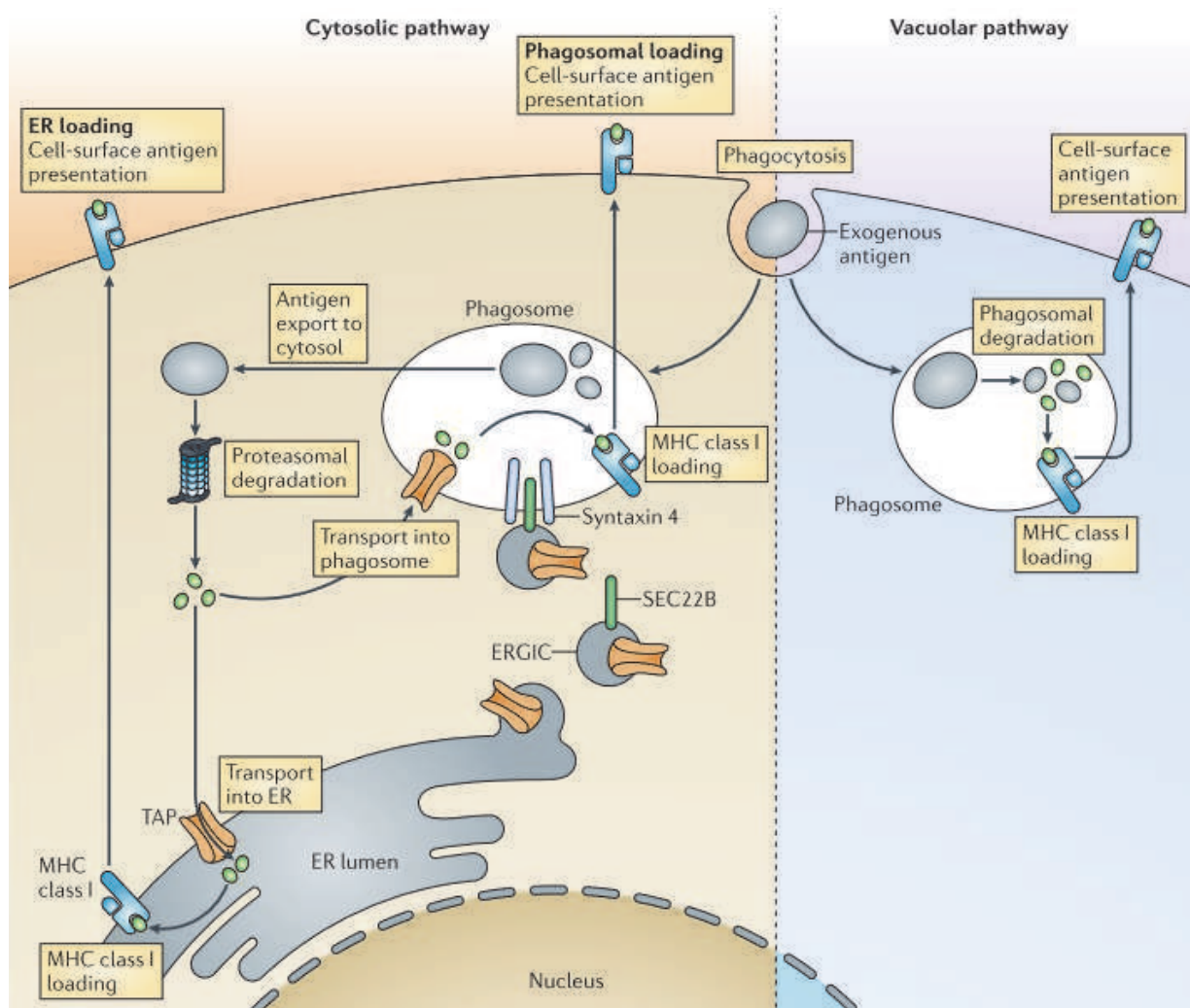
Dans cette voie de présentation croisée, les antigènes doivent être exportés des compartiments endocytaires vers le cytosol. Plusieurs études, dont une étude récente de l'équipe de Lin *et al* qui utilise l'apoptose induite par le cytochrome *c* comme cadre de lecture<sup>247</sup>, ont validé ce transfert. En effet, après l'internalisation du cytochrome *c* exogène par les DC, seules les DC capables de faire de la présentation croisée peuvent transférer le cytochrome *c* dans le cytosol, induisant ainsi l'apoptose de ces dernières. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'export des antigènes du phagosome vers le cytosol sont assez peu compris. Il est généralement admis que la machinerie de rétrotranslocation des

protéines mal formées du RE vers le cytosol (la machinerie ERAD), pourrait être utilisée pour l'export des antigènes dans le cytosol, après recrutement de composants du RE dans les compartiments endocytaires<sup>15</sup>. Finalement, une étude récente a montré que des souris déficientes pour HSP90, molécule chaperonne s'associant au complexe ERAD du côté cytosolique du RE, présentaient une diminution de l'export des antigènes internalisés dans le cytosol. De plus, ils ont montré que l'apoptose des DC CD8 $\alpha^+$  après la phagocytose du cytochrome c était diminuée dans les souris déficientes pour HSP90<sup>248</sup>.

Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans la translocation des antigènes vers le cytosol restent encore peu compris, il est admis que les DC possèdent une voie endocytaire spécifique leur permettant de limiter la dégradation des antigènes et de recruter des composants du RE nécessaires à la redirection des protéines vers la voie classique de présentation par les molécules du CMH-I.

#### 3.3.2.1 La voie vacuolaire

Cette voie de présentation est résistante aux inhibiteurs du protéasome, généralement indépendante de TAP, et sensible aux inhibiteurs des protéases lysosomales, particulièrement aux inhibiteurs de la cathepsine S<sup>223</sup>. Ceci suggère que les antigènes exogènes sont apprêtés entièrement dans les compartiments endocytaires, sans transiter dans le cytosol<sup>15</sup>. Les peptides générés sont dégradés par l'aminopeptidase IRAP puis chargés directement sur les molécules du CMH-I recyclées, qui sont alors réexportées à la membrane plasmique.



**Figure 12 : les voies impliquées dans la présentation croisée.** Après phagocytose, les antigènes exogènes peuvent être transportés dans le cytosol, où ils sont apprêtés par le protéasome. Les antigènes ainsi apprêtés peuvent ensuite être chargés sur les molécules du CMH-I dans le RE (voie cytosolique avec chargement dans le RE), ou réimportés dans le phagosome pour être chargés sur les molécules du CMH-I (voie cytosolique avec chargement dans le phagosome). La protéine SNARE Sec22b, qui est localisée dans le compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC) et interagit avec la syntaxine 4 sur le phagosome, permet le recrutement de différents composants du RE, dont TAP, au niveau du phagosome. De façon alternative, les antigènes exogènes peuvent être dégradés en peptides dans le phagosome, sans sortir dans le cytosol, où ils sont chargés sur les molécules du CMH-I (voie vacuolaire). *Adapté de Joffre OP, Segura E et al, Nature Reviews Immunology 2012.*

### 3.3.3 Les cellules capables de faire la présentation croisée

Parmi les APC capables de faire de la présentation croisée, les DC sont les plus efficaces *in vivo*. En effet, en utilisant des souris transgéniques DTR (souris dont le récepteur à la toxine diphtérique est couplé au promoteur CD11c), Jung *et al* ont montré que l'ablation spécifique des DC empêchait l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes cellulaires exogènes. De plus cette déplétion empêchait également l'activation de lymphocytes cytotoxiques contre la bactérie intracellulaire *Listeria monocytogenes* et le parasite *plasmodium yoelii*<sup>249</sup>. Nous verrons dans cette partie quels sous types de DC, et autres types cellulaires, sont capables de faire de la présentation croisée.

#### 3.3.3.1 Les cellules dendritiques résidentes CD8α<sup>+</sup>

Parmi les DC résidentes des organes lymphoïdes, en condition basale, les DC CD8α<sup>+</sup> semblent bien plus efficaces pour effectuer la présentation croisée d'antigènes solubles et cellulaires *in vivo*<sup>35,250,251</sup>. Elles capturent également plus facilement les cellules apoptotiques, source majeure pour la présentation croisée<sup>232,252</sup>. Les antigènes associés aux cellules apoptotiques sont d'ailleurs efficacement apprêtés et présentés aux molécules du CMH-I.

L'expression spécifique de récepteurs impliqués dans la capture de cellules apoptotiques, tels que le CD36 et Clec9A, par les DC CD8α<sup>+</sup> permet d'expliquer en partie leur meilleure capacité à réaliser la présentation croisée d'antigène provenant de cellules mortes. Cependant, bien que le SR CD36 puisse être impliqué, il ne semble pas nécessaire à la présentation croisée de cellules apoptotiques par ces DC<sup>253,254</sup>. Au contraire, la lectine Clec9A, spécifiquement exprimée sur les DC CD8α<sup>+</sup>, semble indispensable à la présentation croisée des cellules mortes *in vitro* et *in vivo*<sup>117</sup>. Étonnamment, le blocage de ce récepteur ou l'utilisation de souris déficientes pour ce dernier n'affecte pas la capture de cellules mortes, mais inhibe fortement la présentation croisée. Son action dépend de l'activation d'une voie de signalisation dépendante de la tyrosine kinase Syk. Très récemment, il a été montré que Clec9A se lie à l'actine polymérisée exprimée à la surface des cellules mortes lorsqu'elles perdent leur intégrité membranaire (donc lors d'une apoptose secondaire ou lors de la nécrose)<sup>118,119</sup>.

La présentation croisée semble être une spécialité des DC CD8α<sup>+</sup> *in vivo*, puisque l'inactivation de Batf3, facteur de transcription impliqué dans le développement de ces DC, a

pour conséquence une forte diminution des réponses T CD8<sup>+</sup> anti-virales et anti-tumorales<sup>255</sup>. Cependant, des études récentes suggèrent que les DC CD8α<sup>+</sup> ne sont pas toutes capables de faire de la présentation croisée *in vivo*. En effet, l'élimination sélective des cellules capables de faire de la présentation croisée par injection de cytochrome c, n'élimine que la moitié des DC CD8α<sup>+</sup><sup>247</sup>. Dans une autre étude, seules les DC CD8α<sup>+</sup> exprimant le marqueur CD103, et localisées au niveau de la zone marginale, semblent capables de capturer des cellules apoptotiques et réaliser la présentation croisée<sup>256</sup>. Ces données suggèrent qu'il peut y avoir une différence de développement au sein des DC CD8α<sup>+</sup> ou des différences au niveau de l'accessibilité des antigènes<sup>257</sup>. Il serait ainsi intéressant d'éprouver l'idée qu'il puisse y avoir deux sous types de DC CD8α<sup>+</sup> avec des propriétés différentes, et d'en étudier leurs caractéristiques.

La différence d'efficacité à réaliser la présentation croisée entre les DC CD8α<sup>+</sup> et CD8α<sup>-</sup> ne s'explique pas par leur capacité à capturer de l'antigène puisque les deux types présentent des niveaux similaires d'endocytose de billes de latex, de microorganismes ou de protéines solubles. En effet, Schnorrer *et al* ont montré que parmi les DC sélectionnées après avoir internalisé la même quantité de billes recouvertes d'ovalbumine, les DC CD8α<sup>+</sup> présentaient mieux cet antigène<sup>258</sup>. Ces expériences indiquent également que bien que les deux types de DC peuvent présenter l'antigène aux molécules du CMH-II, les DC CD8α<sup>+</sup> semblaient moins efficaces, peut-être en raison d'un détournement de l'antigène au profit de la présentation croisée dans ces dernières. Ceci implique que lorsque les DC résidentes des tissus lymphoïdes appréhendent des antigènes exogènes, les DC CD8α<sup>+</sup> sont meilleures dans l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les DC CD8α<sup>-</sup> plus efficaces à activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> : situation observée *in vivo*<sup>36</sup>.

Les DC CD8α<sup>+</sup> auraient ainsi développé des capacités intrinsèques favorisant la présentation croisée. La plus importante d'entre elles sera discutée dans la partie 3.3.3.4 p.77.

### 3.3.3.2 Les cellules dendritiques migratoires CD103<sup>+</sup>

Les souris déficientes pour Batf3, montrent en plus du défaut en DC CD8α<sup>+</sup>, un défaut dans le développement des DC migratoires CD103<sup>+</sup> langerine<sup>+</sup><sup>255</sup>. Ces deux sous types de DC ont un grand nombre de caractéristiques phénotypiques en commun, qui ne sont pas retrouvées dans les autres DC : expression de CD24, de DEC205, de la langerine et un faible niveau d'expression du CD11b. De plus, certaines DC CD8α<sup>+</sup> expriment aussi le CD103<sup>257</sup>.

La rareté de ces cellules dans les ganglions rend l'étude de ces cellules difficile, mais il semble qu'elles partagent des caractéristiques fonctionnelles communes avec les DC CD8 $\alpha^+$ . Ceci expliquerait pourquoi les DC migratoires CD103 $^+$  sont également très efficaces dans la présentation croisée d'antigènes<sup>15</sup>. Peu d'études ont évalué leur capacité à faire de la présentation croisée et ces dernières se sont focalisées sur les DC migratoires de la peau et du poumon. Ces cellules sont en effet capables de capturer des antigènes solubles et cellulaires et de les présenter sur les molécules du CMH-I<sup>29,259,260</sup>. Elles sont également, avec les DC CD8 $\alpha^+$ , les principales DC qui présentent des antigènes viraux aux lymphocytes T CD8 $^+$  après une infection virale dans la peau ou les poumons<sup>29,261</sup>. Aussi, une étude récente a montré que les DC migratoires CD103 $^+$  des poumons capturent les antigènes associés aux cellules apoptotiques aux lymphocytes T CD8 $^+$ , en conditions basale et inflammatoire<sup>262</sup>.

### 3.3.3.3 Les autres cellules réalisant la présentation croisée

Bien que les DC résidentes CD8 $\alpha^+$  et migratoires CD103 $^+$  soient les meilleures en terme de présentation croisée, d'autres cellules en sont capables, dans certaines conditions.

Le rôle des **pDC** dans la présentation croisée est à l'heure actuelle assez controversé. En effet, une étude chez la souris a montré que les pDC pouvaient réaliser de la présentation croisée à partir d'antigènes solubles ou associés à des billes après stimulation par des ligands de TLR7 ou TLR9 *in vitro* et *in vivo*<sup>263</sup>. Chez l'Homme, trois études, dont une réalisée par notre laboratoire, ont montré que la capture de polipeptides, d'antigènes cellulaires, ou de particules virales par des pDC permet leur présentation croisée<sup>239,264,265</sup>. De plus, cette présentation est augmentée lorsque les pDC sont activées par le virus de la grippe<sup>265</sup>. Cependant, différentes études ont montrées que les pDC n'étaient pas capables de faire de la présentation croisée, dans différents modèles murins *in vivo*<sup>261,266,267,268</sup>. Il est aujourd'hui difficile d'expliquer ces différences entre les études humaines et murines. Les pDC ont peut-être besoin de capturer les antigènes via un ou plusieurs récepteur(s) qui leurs permettraient de faire la présentation croisée, ou bien peut-être doivent-elles être stimulées par des facteurs spécifiques ? De futures investigations permettront peut-être de répondre à cette question<sup>44</sup>.

Plusieurs études réalisées à partir de différents modèles, ont également montré que les **DC inflammatoires** étaient capables d'effectuer la présentation croisée *ex vivo* et *in vivo*. Ces DC recrutées sur des sites inflammatoires auraient ainsi la capacité de capturer des antigènes solubles et des particules virales pour activer les lymphocytes T CD8 $^{+269,270,271}$ . De

plus, une partie importante des travaux réalisés *in vitro* chez la souris pour étudier la présentation croisée utilisent des BMDC (DC générées *in vitro* à partir de moelle osseuse et de GM-CSF) qui peuvent être considérées comme un équivalent des DC inflammatoires.

Une étude récente dans laquelle des tumeurs rendues apoptotiques ont été injectées dans le flanc d'une souris, suggère que les **macrophages** CD11c<sup>+</sup>CD169<sup>+</sup> des ganglions sont les cellules présentant majoritairement les antigènes associés aux cellules tumorales. De plus, la déplétion des cellules CD169<sup>+</sup> altère la réjection de la tumeur après vaccination avec des cellules tumorales mortes<sup>272</sup>. Etant donné que les DC CD8α<sup>+</sup> expriment également le CD169, il est difficile de conclure que ce sont les macrophages et non les DC CD8α<sup>+</sup> qui sont responsables de la présentation croisée dans cette étude.

La capacité des polynucléaires **neutrophiles** à effectuer la présentation croisée a également été démontrée<sup>273</sup>. Les auteurs montrent que les neutrophiles murins et humains sont capables de réaliser de la présentation croisée à partir d'antigènes exogènes *in vitro*. Cette présentation croisée semble être dépendante de TAP et du protéasome. De plus, l'injection de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du peptide SIINFEKL de l'ovalbumine (cellules OT-I) et de neutrophiles chargés d'OVA dans des souris déficientes pour la β2-microglobuline, induit la différenciation des lymphocytes OT-I en cellules effectrices, sécrétrices d'IFNγ. Ces expériences impliquent pour la première fois les neutrophiles comme cellules capables de faire de la présentation croisée, même si cette capacité est moins élevée que chez les DC.

#### 3.3.3.4 Caractéristique intrinsèque pour la présentation croisée

Les cellules qui sont capables de faire de la présentation croisée semblent avoir des propriétés intrinsèques particulières, puisqu'elles capturent les antigènes de la même manière. Ceci est en tout cas valable pour les DC CD8α<sup>+</sup> et les DC CD103<sup>+</sup> qui peuvent faire de la présentation croisée en condition basale. Ces propriétés sont surtout étudiées pour les DC CD8α<sup>+</sup> et beaucoup moins pour les DC CD103<sup>+</sup> du fait de leur rareté. Je ne développerai ici qu'une des caractéristiques clé pour qu'une cellule puisse effectuer de la présentation croisée.

Pour éviter une dégradation trop rapide des antigènes qui empêcherait leur présentation par les molécules du CMH-I, les DC CD8α<sup>+</sup> sont capables de diminuer l'activité protéolytique des endosomes/phagosomes. Cette diminution est due à un niveau d'expression faible des

protéases lysosomales et à une réduction de leur activité. Cette réduction d'activité est la conséquence du maintien d'un pH alcalin (environ pH 7,5), qui résulte à la fois d'une faible activité de la V ATPase (car elle ne s'assemble plus correctement) et d'une augmentation de l'activité de l'oxydase NADPH 2 (NOX2) dans les compartiments endocytaires<sup>274,275</sup>. Cette action de NOX2 est due à son recrutement par la GTPase Rac2 au niveau des endosomes/phagosomes, qui aboutit à la production de ROS. A l'inverse, dans les DC CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, Rac1 dirige l'assemblage de NOX2 à la membrane plasmique, limitant ainsi la production de ROS dans les endosomes et les phagosomes, expliquant l'acidité plus importante de leurs compartiments<sup>276</sup>.

Finalement, les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et les DC CD103<sup>+</sup> en condition basale sont probablement les plus aptes à faire de la présentation croisée, mais il semble maintenant clair que lors d'une infection, d'un stress ou d'une situation inflammatoire, d'autres cellules puissent développer des capacités de présentation croisée, que ce soient des APC professionnelles ou non. Ce phénomène serait dans l'intérêt de l'organisme afin qu'il puisse lutter efficacement et rapidement contre les pathogènes et les tumeurs.

## **4 L'utilisation des cellules dendritiques en immunothérapie anti-tumorale**

Tout d'abord, avant de parler de l'immunothérapie anti-tumorale, il est nécessaire d'évoquer la façon dont se développe une cellule tumorale, quelles sont ses propriétés et quels liens peut-elle avoir avec son environnement. Les cellules tumorales évoluent, pour la majorité d'entre elles, en six étapes différentes, qui permettent également d'évaluer l'état de leur développement. Ces étapes se décomposent comme suit : 1) la cellule devient auto-suffisante pour les facteurs de croissance, 2) elle devient résistante aux signaux inhibiteurs de croissance, 3) elle devient résistante à l'apoptose, 4) elle obtient un potentiel illimité de croissance, 5) elle acquiert une grande capacité angiogénique et 6) elle acquiert un potentiel métastatique<sup>277</sup>.

Les traitements les plus utilisés actuellement pour lutter contre le cancer sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces traitements ont pour but d'éliminer les cellules tumorales, en introduisant par exemple des erreurs au niveau de leur ADN, induisant la mort de ces dernières. Ces traitements peuvent être combinés pour une meilleure efficacité. Cependant, lorsque la tumeur a atteint un stade critique (tumeur difficile à



enlever, ou tumeur qui métastase), ces traitements deviennent moins efficaces et permettent la survie du patient, plutôt que sa guérison. De plus, ces traitements sont très lourds pour les patients car ils provoquent de nombreux effets secondaires pénibles. Il est donc nécessaire aujourd'hui de développer d'autres traitements pour éradiquer le cancer.

Le système immunitaire est en étroite relation avec les cellules tumorales. En effet, les cellules du système immunitaire sont capables de reconnaître les tumeurs et de les éliminer lorsqu'elles s'y prennent à temps. D'ailleurs, il est fort probable que nous développons des tumeurs tous les jours, qui sont contrôlées efficacement par le système immunitaire. Ce processus s'appelle l'immunosurveillance et a été démontré dans plusieurs modèles expérimentaux murins<sup>278</sup> et chez l'Homme (le risque de cancer chez les immunodéprimés, après transplantation par exemple, est bien plus élevé). Cependant, les individus immunocompétents développent aussi des tumeurs. Leur système immunitaire deviendrait alors défaillant dans l'éradication des cellules tumorales après que sa pression de sélection ait favorisé la croissance de cellules non immunogènes. Cette notion d'immunoédition (immunoediting) met l'accent sur la dualité du système immunitaire dans le contrôle tumoral. En effet, il peut permettre l'élimination (immunosurveillance) des cellules tumorales, mais il permet aussi la sélection (immunosélection) de certaines cellules capables d'échapper au système immunitaire (immunosubversion)<sup>279</sup>.

Comprenant l'importance du système immunitaire dans le développement d'un cancer, de nouvelles approches ont fait surface, utilisant les outils du système immunitaire pour tenter de guérir les patients atteints d'un cancer : il s'agit de l'immunothérapie anti-tumorale. De nombreuses stratégies ont permis le développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. Voici quelques exemples de certains d'entre eux : 1) le rituximab (anti-CD20), très utilisé dans le traitement de la leucémie et des lymphomes ; 2) l'herceptine (anti-HER2), utilisé dans le cancer du sein<sup>279</sup> ; 3) l'ipilimumab (anti-CTLA-4), utilisé dans le mélanome à un stade avancé et qui a fait ses preuves dans un essai clinique de phase III<sup>280</sup> ; 4) le nivolumab (anti-PD1), utilisé en combinaison ou non avec l'ipilimumab dans le traitement du mélanome avancé<sup>281</sup> ; et 5) le panitumumab (anti-EGFR), utilisé dans le cancer colorectal<sup>282</sup>. Ces anticorps peuvent agir directement sur les cellules tumorales, sur le stroma tumoral, permettre l'activation de l'ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity), etc<sup>282</sup>. L'utilisation d'un anti-CD47 est actuellement en phase d'étude préclinique<sup>104,105,106</sup>.

Beaucoup d'anticorps monoclonaux sont en cours d'essais cliniques et peuvent être combinés pour de meilleurs résultats. Je ne me focaliserai dans cette partie que sur l'immunothérapie qui vise les DC, compte tenu de leur rôle central dans l'activation du système immunitaire et leur capacité à faire de la mémoire immunologique. Dans un

premier temps, nous verrons les thérapies ciblant les DC *in vivo*, et dans un second temps nous verrons les stratégies développées pour immuniser les patients avec des DC chargées *ex vivo*.

## 4.1 L'immunothérapie ciblant les cellules dendritiques

Dans cette catégorie, nous retrouvons 1) les vaccins basés sur des peptides, protéines ou acides nucléiques qui ne ciblent pas directement les DC, mais qui peuvent être facilement capturés par ces dernières *in vivo*; et 2) les vaccins qui couplent des antigènes à des anticorps ciblant directement les DC. Quelques exemples seront présentés ici.

**Les vaccins non spécifiques :** Les vaccins composés de peptides/protéines sont peu immunogènes sauf si l'on ajoute des adjuvants pour générer une forte réponse anti-tumorale<sup>283</sup>. D'ailleurs, de nombreux adjuvants sont actuellement à l'étude pour leur utilisation dans le cadre du cancer. Il peut s'agir d'agonistes de nombreux TLRs, comme le poly I:C (ligand de TLR3), le MPL (monophosphoryl lipid A, ligand de TLR4), la flagelline (ligand de TLR5), l'Imiquimod (ligand de TLR7), le Resiquimod (ligand des TLR7-8) et le CpG (ligand de TLR9)<sup>284</sup>. Les GVAX® sont des vaccins complexes basés sur les cellules tumorales : ces dernières sont génétiquement modifiées pour exprimer le GM-CSF qui attire et active les DC. Les vaccins GVAX® ont montré une certaine activité immune et clinique dans le cancer du pancréas<sup>285,286</sup> et d'autres types de tumeurs solides<sup>287</sup>. D'autres vaccins sont basés sur l'utilisation de bactéries, dans lesquelles est ajouté un antigène tumoral. C'est le cas, par exemple, de l'utilisation de *Listeria monocytogenes*, bactérie intracellulaire, qui cible les DC *in vivo* et utilise les voies de présentation par les molécules du CMH-I et CMH-II<sup>288</sup>. L'utilisation de vecteurs viraux qui pourraient délivrer l'antigène aux DC, directement par l'expression de gènes ou indirectement en lysant les cellules tumorales, est une stratégie attractive puisque cela permet de mimer une infection naturelle et la génération d'une immunité protectrice. Ces vecteurs sont actuellement développés dans le contexte de la vaccination pour le VIH<sup>283</sup>.

**Les vaccins ciblant les DC directement :** Des études pionnières de Ralph Steinman et Michel Nussenzweig ont démontré que le ciblage d'antigènes aux DC *in vivo*, via un couplage des antigènes à des anticorps spécifiques de récepteurs de surface sur les DC (comme DEC-205 ou DCIR), induit une forte immunité spécifique de l'antigène médiée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup><sup>289,290,291,292</sup>. Dans ces études, l'induction de la maturation des DC (par une administration d'un anti-CD40 par exemple) est essentielle pour qu'une réponse

immunogène se développe au lieu d'une réponse tolérogène. Actuellement, de nombreuses études chez l'Homme et la souris développent des vaccins suivant cette stratégie. Par exemple, le ciblage des antigènes aux DC par les lectines DCIR<sup>293,294</sup>, DC-SIGN<sup>295</sup>, dectine 1<sup>296</sup>, Clec9A<sup>297</sup>, et par la langerine<sup>298</sup> permet l'induction de réponses humorales et cellulaires, incluant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.

Comme précisé précédemment, la présence ou non d'adjuvants a un important impact sur le type de réponses immunitaires induites. En effet, en l'absence d'adjuvants, l'injection des antigènes couplés aux anticorps dirigés contre Clec9A induit une forte réponse humorale, liée à la génération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> folliculaire<sup>299</sup>. Ceci permet également d'activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs<sup>300</sup>, mais pas les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, malgré la capture et la présentation croisée des antigènes délivrés aux DC CD8α<sup>+</sup><sup>297</sup>. Au contraire, l'administration concomitante du poly I:C résulte en une robuste réponse T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> anti-tumorale<sup>297,300</sup>.

En plus du ciblage de la bonne population de DC, le ciblage des récepteurs au sein d'une même population est très important dans l'induction d'une réponse anti-tumorale. Par exemple, le ciblage des antigènes aux DC via ASGPR (asialoglycoprotein receptor) en l'absence d'adjuvant favorise la génération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques sécréteurs d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) ayant des propriétés de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs à la fois *in vitro* chez l'Homme, et *in vivo* chez les primates. Cependant, cibler la même population de DC avec des anticorps dirigés contre LOX-1 a pour conséquence la génération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques sécréteurs d'IFNγ<sup>301</sup>. Le ciblage de différents récepteurs sur les DC peut générer des réponses T qualitativement et quantitativement différentes *in vivo*<sup>36,292</sup>. Ceci est dû aux propriétés intrinsèques des DC (dont le type de compartiment endosomal dans lequel est internalisé le récepteur)<sup>283</sup>.

Finalement, un essai clinique de phase I ayant pour stratégie le ciblage des DC *in vivo* est actuellement en cours. Cette étude comprend des patients affectés par un large spectre de tumeurs solides exprimant l'antigène NY-ESO-1, et a pour but d'examiner la sécurité et l'efficacité d'un vaccin correspondant à l'antigène NY-ESO-1 fusionné à un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre DEC-205. Les données précliniques sont pour le moment assez encourageantes<sup>302</sup>.

## 4.2 L'immunisation avec des cellules dendritiques

Les DC peuvent être générées *ex vivo*, chargées avec différentes formes d'antigènes, activées puis injectées dans des patients atteints de cancer. Les études cliniques depuis quinze ans ont analysé 1) les différentes préparations de vaccins basés sur les DC ; 2) les différents activateurs des DC ; 3) les différentes formes d'antigènes utilisés (des petits peptides aux hybrides DC-cellules tumorales) ; et 4) les différentes voies d'injection des DC<sup>283</sup>. Je ne me focaliserai dans cette partie que sur les différentes préparations des vaccins, utilisant des DC *ex vivo* et des sources différentes d'antigènes.

**Les DC incubées avec des antigènes associés aux tumeurs (TAAs) :** Cette catégorie comprend aussi bien les petits peptides que les protéines entières. La notion que les DC *ex vivo* chargées avec des TAAs puissent induire des réponses anti-tumorales et protectrices *in vivo* a été montrée pour la première fois en 1995, par Michael Lotze<sup>303</sup> et Cornelius Melief<sup>304</sup>. Dans les années qui suivirent, le potentiel thérapeutique des DC chargées avec des antigènes a été confirmé dans différents modèles tumoraux, que ce soit avec un antigène d'origine protéique<sup>305,306</sup> ou peptidique<sup>307,308,309</sup>. Des études ont ensuite développé des stratégies pour augmenter l'immunogénicité de cette approche, en manipulant les DC afin qu'elles produisent d'avantage de signaux immunostimulateurs, prolifératifs ou encore chimiotactiques<sup>310</sup>.

Cette approche a été testée dans plusieurs essais cliniques de phases I et II comprenant des patients atteints d'une grande variété de cancer. Ces études ont montré que l'utilisation de DC chargées *ex vivo* avec des TAAs était sans risque et pouvait générer l'activation d'une immunité pour une grande proportion de patients, dont certains présentaient des réponses cliniques partielles ou totales. Cependant, ces études n'ont pas encore été testées dans les essais cliniques de phase III, à l'exception d'une étude. Dans cette étude les auteurs utilisent des DC chargées avec une protéine de fusion composée de la PAP (prostatic acid phosphatase) et du GM-CSF. Cette préparation, nommée *Sipuleucel-T*, a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement des patients atteints d'un cancer métastatique de la prostate (dont leur médiane de survie est augmentée de 4 mois)<sup>311</sup>.

**Les DC incubées avec des ARNm dérivés des tumeurs, ou génétiquement modifiées :** L'intérêt d'utiliser des ARN comme moyen de charger les DC pour le développement de vaccins contre le cancer a débuté dans les années 1990, par des études pionnières d'Elis Gilboa et ses collègues<sup>312,313,314</sup>. De nombreux laboratoires ont montré que des DC

transduites *ex vivo* avec des vecteurs viraux permettant l'expression de TAA's engendraient de meilleures réponses *in vivo*, comparé à l'électroporation de vaccins à ADN directement dans la peau<sup>310</sup>.

Durant ces dix dernières années, les DC chargées avec de l'ARN et les DC manipulées pour exprimer des TAA's endogènes ont été évaluées dans des essais cliniques de phases I et II. Par exemple, des DC exprimant stablement des TAA's (par une transduction avec un adenovirus dans la plupart des cas), ont été testées chez des patients avec un cancer avancé (du sein, du pancréas, exprimant la mucine 1)<sup>315</sup>, un cancer des poumons à petites cellules (exprimant la mucine p53)<sup>316</sup>, ou le mélanome (exprimant la tyrosinase, melan A et gp100)<sup>317</sup>. Ces études montrent que cette stratégie n'est pas dangereuse pour les patients et peut conduire (dans certains cas) à l'activation d'une réponse anti-tumorale.

**Les DC fusionnées avec des cellules tumorales :** Les hybrides de DC et de cellules tumorales, appelé « dendritomes », se forment spontanément lorsque les DC sont mises en culture avec des cellules tumorales vivantes ou apoptotiques<sup>318</sup>. Cette stratégie de vaccination permet d'induire des réponses anti-tumorales *in vivo*<sup>319</sup>, bien que le potentiel immunogénique des dendritomes soit plus faible que celui des DC chargées *ex vivo* avec des cellules tumorales apoptotiques. Ceci pourrait s'expliquer par un plus faible niveau d'expression des molécules de costimulation et/ ou de production d'IL-12<sup>320</sup>.

Des essais cliniques de phase I et II ont évalué la sécurité et l'efficacité de cette stratégie sur des patients atteints de gliome, cancer du sein, mélanome et ont démontré une activation du système immunitaire dans une large proportion des cas.

**Les DC incubées avec des lysats tumoraux ou des cellules apoptotiques :** Depuis la fin des années 1990 / début 2000, la capacité des DC *ex vivo* à entrer dans un processus de maturation en présence de lysats de cellules tumorales<sup>321,322,323,324</sup> ou de débris de cellules tumorales apoptotiques<sup>325,326,327</sup> dans le but de monter une réponse immunitaire anti-tumorale *in vivo* a été établie dans différents modèles. Il est généralement considéré que les DC chargées avec des cellules tumorales apoptotiques sont supérieures aux DC chargées avec des lysats tumoraux, fusionnées avec des cellules tumorales ou transduites avec de l'ARNm, dans l'induction d'une réponse immunitaire<sup>310</sup>. En effet les cellules apoptotiques sont une très bonne source d'antigènes pour la présentation croisée et, en fonction du type d'apoptose induite, sont capables d'induire la maturation des DC et de générer des réponses de type immunogène<sup>98,328</sup>.

Durant ces dernières années, une grande variété d'essais cliniques de phase I et II a été réalisée afin de tester la sécurité et l'efficacité de cette stratégie. Plusieurs types de cancer sont concernés par ces essais : lymphome B, gliome, mélanome, cancer colorectal, etc... Les résultats encourageants de ces études indiquent que 1) les DC chargées avec des lysats tumoraux ou des cellules tumorales apoptotiques peuvent être administrées aux patients sans toxicité apparente et que 2) cette approche conduit à l'activation de réponses immunitaires dans une large proportion de cas. Cependant, les réponses cliniques rapportées sont relativement limitées dans de nombreuses études<sup>310</sup>. Ceci peut s'expliquer par l'existence d'un microenvironnement tumoral très suppressor (présence de cellules suppressives comme les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives, de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10) empêchant les DC et les effecteurs de la réponse immunitaire d'entrer en contact avec la tumeur, et par le fait que toutes les morts par apoptose ne sont pas immunogènes.

La combinaison de plusieurs thérapies pourrait permettre d'augmenter l'efficacité des traitements en jouant à la fois sur les cellules immunosuppressives (en les inhibant) et sur les cellules cytotoxiques et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La génération et la qualité de ces dernières reposent en grande partie sur les DC et leur capacité à activer de manière efficace ces cellules. Des études permettant de comprendre les signaux et les sources d'antigènes à charger sur les DC *ex vivo*, nécessaires à une bonne induction d'une réponse immunitaire conduisant à la destruction de la tumeur, permettraient l'élaboration d'un cocktail efficace (avec la possibilité de coupler à d'autres thérapies) pour l'éradication du cancer.

## 5 Objectif des travaux de thèse

Comme j'ai taché de vous en convaincre durant mon introduction, la présentation croisée est essentielle puisqu'elle permet la présentation d'antigènes exogènes, non synthétisés directement dans les DC (antigènes du soi, de tumeurs, de microorganismes n'infectant pas les DC) aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Elle est donc primordiale dans l'établissement de réponses T CD8<sup>+</sup> anti-infectieuses ou anti-tumorales. Son étude est donc capitale pour la vaccination et pour l'immunothérapie mettant en jeu une présentation par les DC.

Nous avons vu que les cellules apoptotiques sont classiquement l'une des meilleures sources d'antigènes pour la présentation croisée par les cellules dendritiques. De fait, de

nombreux essais cliniques se sont focalisés sur l'utilisation de DC chargées *ex vivo* avec des cellules tumorales rendues apoptotiques et injectées aux patients pour induire des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Evidemment, dans ces protocoles, pour que la vaccination fonctionne au mieux, il est nécessaire d'induire une mort immunogène (avec l'utilisation d'agents chimiques). Cependant les résultats de ces études sont souvent peu bénéfiques du point de vue clinique. Ceci peut-être dû à différents paramètres discutés précédemment.

Dans ce contexte, notre laboratoire et d'autres ont montré que les cellules vivantes étaient une source d'antigènes efficaces pour la présentation croisée aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Ainsi, nous avons montré que l'utilisation de DC chargées avec des cellules tumorales de mélanome B16 vivantes permettait d'induire une très bonne protection anti-tumorale dans le cadre d'une vaccination de type prophylactique. Cette protection est due à l'induction de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques grâce à la présentation croisée des antigènes tumoraux par les DC.

Dans un premier temps, l'objectif de ma thèse a été d'évaluer si la présentation croisée à partir de cellules tumorales vivantes permettait de protéger efficacement contre une tumeur déjà installée, dans un modèle de type thérapeutique. Nous avons ainsi montré que la présentation croisée par les DC d'antigènes de cellules tumorales vivantes de mélanome B16 permet une protection efficace contre la tumeur dans un protocole de type thérapeutique. De plus, nous avons montré que cette protection était meilleure que celle obtenue avec des DC chargées avec des cellules tumorales apoptotiques, et que ceci était due à une meilleure conservation des antigènes tumoraux sous leur forme native au sein des cellules vivantes. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans PlosOne en 2011<sup>329</sup>. Dans un second temps, je me suis intéressée à élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la présentation croisée des DC à partir des cellules vivantes.

## Matériels et Méthodes



# 1 Souris

Les souris C57BL/6 (CD45.2) de six semaines ont été obtenues dans les laboratoires Harlan (Orléans, France). Les souris C57BL/6 OT-1 CD45.2 et C57BL/6 CD45.1 ont été obtenues dans les laboratoires Charles River (Saint-Aubin-Les-Elbeufs, France) et élevées dans notre animalerie EOPS. Les souris C57BL/6 OT-1 CD45.1/CD45.2 ont été obtenues par le croisement F1 d'une souris C57BL/6 CD45.1 avec une souris C57BL/6 OT-1 CD45.2 et élevées dans notre animalerie. Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec le « European Community Council Directive » du 24/11/1986, le règlement du Département Vétérinaire Français (permis N° 75-1321) et l'animalerie de l'Institut Cochin (N° d'accréditation A-75-14-02).

## 2 Anticorps, marquage cellulaire

Les anticorps monoclonaux sont couplés à différents fluorochromes et dirigés contre les molécules suivantes : CD8 $\alpha$ -APC-H7, CD11c-PE-Cy7, CD80-FITC, CD86-APC, IA<sup>b</sup>-PE, CD3-PE-Cy7, CD4-PerCP, IFN $\gamma$ -APC, CD11c-FITC, AnnexineV-PE (BD Biosciences), V $\alpha$ 2-APC, CD45.1-Biot, Sirp $\alpha$ -Biot, Streptavidine PacificBlue, CD47-APC (eBiosciences), calreticuline purifié (ThermoScience), ovalbumine purifié (Millipore), donkey anti-chicken 488, goat anti-rabbit 647 (Jackson).

Le marquage a été réalisé à 4°C, en utilisant un tampon PBS 1X contenant 5% SVF (Sérum de Veau Foetal) et 5mM d'EDTA. Les cellules ont d'abord été incubées avec de l'anticorps monoclonal anti-CD16/CD32 (2.4G2) pour bloquer les récepteurs Fc (BD) pendant 20 min. Elles ont ensuite été marquées avec les anticorps couplés pendant 20 min supplémentaires. Pour les anticorps biotinylés, la streptavidine a été ajoutée secondairement pendant 15 min.

Pour le marquage intracellulaire IFN $\gamma$ , les splénocytes ont été restimulés pendant 4h à 37°C à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules/ml en milieu complet avec 0,5 $\mu$ g/ml PMA et 0,5 $\mu$ g/ml ionomycine (Sigma-Aldrich) en présence de Golgi Plug (suivant les recommandations du fournisseur, BD), et marqués avec un anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, puis avec l'anti-IFN $\gamma$  en intracellulaire (kit de marquage intracellulaire, BD).

Pour le marquage du cytoplasme des cellules avec le CellTracker<sup>TM</sup> orange CMRA (calcéine, Invitrogen), les cellules ont été incubées pendant 20 min à 37°C, à 5 x10<sup>6</sup>/ml dans

du PBS contenant 2,5 $\mu$ M de calcéine, puis largement lavées avec du milieu complet. Pour évaluer l'apoptose, nous avons utilisé un kit AnnexineV (BD).

Pour le marquage des lipides membranaires, les cellules ont été incubées pendant 10 min à 37°C, à 10<sup>6</sup>/ml dans du PBS contenant 1 $\mu$ M de DiD (Invitrogen), puis largement lavées avec du milieu complet (l'excès de DiD est relargué lors du dernier lavage pendant 1h minimum à 37°C).

Pour évaluer la prolifération, les cellules OT-I (10 à 20 x10<sup>6</sup> cellules/ml) ont été marquées avec 2 $\mu$ M de CFSE (Invitrogen) dans du PBS 1X pendant 7 minutes à température ambiante, puis lavées avec du SVF froid et largement lavées avec du milieu complet.

Les cellules ont été analysées par cytométrie de flux en utilisant le FACS LSRII ou Fortessa (BD) puis les logiciels Diva (6.1.2, BD) et FlowJo (version 9.3.2 TreeStar, Ashland, Etats-Unis).

### 3 Culture cellulaire

Les cellules B3Z et les cellules tumorales de mélanome B16 F10 (B16) ont été cultivées en milieu complet (RPMI 1640 Glutamax, 10% SVF, 2mM L-glutamine, 100 unités de pénicilline, 100 $\mu$ g/ml de streptomycine, Invitrogen). Les cellules L-OVA sont des cellules L transfectées avec une forme d'OVA uniquement exprimée dans le cytoplasme : OVA-EGFP-L, et leur témoin EGFP-L ont généreusement été données par K. Rock (Université du Massachusetts Medical School, Boston, Etats-Unis)<sup>226</sup>. Les fibroblastes CCL-1 (ou L929, ATCC) sont les témoins des cellules CCL-1-OVA que nous avons transfectées avec le plasmide pcDNA-V5/His-OVA<sub>t</sub>-GFP (où l'OVA est tronquée de sa séquence leader, empêchant sa sécrétion), généreusement donné par Philippe Pierre (Centre d'Immunologie de Marseille Luminy). La transfection de ces cellules a été réalisée avec le kit Lipofectamine<sup>TM</sup> LTX and Plus<sup>TM</sup> Reagents (Invitrogen). Les cellules L-GFP-F sont des cellules L que nous avons transfectées avec un plasmide exprimant une forme farnésylée de la GFP (expression membranaire, pEGFP-F, Clontech), en utilisant le kit Trans-IT Transfection kit (Mirus). Les cellules L-OVA, CCL-1-OVA et L-GFP-F ont été cultivées en milieu complet en présence de 500  $\mu$ g/ml de G418 (Sigma-Aldrich). Les cellules B3Z, hybridomes de cellules T CD8<sup>+</sup> qui expriment la  $\beta$ -galactosidase, sous le promoteur du lacZ lorsque ce dernier est activé, par reconnaissance spécifique du complexe H-2K<sup>b</sup>-OVA<sub>257-2674</sub> (SIINFEKL)<sup>330</sup>, ont généreusement été données par C. Leclerc (Institut Pasteur, France).

Pour empêcher la mort cellulaire dépendante des caspases, les cellules ont été cultivées en présence de 10 $\mu$ M de z-VAD FMK (Sigma-Aldrich). Alternativement, l'apoptose a été induite par irradiation  $\gamma$  (100Gy pour les cellules L et B16) et suivie d'une incubation de 48h à 37°C en milieu complet, avant utilisation. La proportion des cellules apoptotiques Annexine V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> retrouvée était  $\geq$ 70%.

Pour la génération des BMDC, les cellules de la moëlle osseuse de souris C57BL/6 ont subi une lyse des globules rouge par un traitement de 0,84% de chlorure d'ammonium. Les cellules ont ensuite été mises en culture à 10<sup>6</sup>/ml en milieu complet dans des plaques 24 puits (1ml/puits) avec du GM-CSF recombinant à 20ng/ml (Peprotech). A J2 et J4, 90% et 75% du milieu a été remplacé par du milieu neuf, respectivement. Les BMDC immatures sont récupérées à J6, où l'on obtient 65% de cellules CD11c<sup>+</sup> en moyenne.

Pour le phénotypage des BMDC, ces dernières ont été incubées seules ou bien avec des cellules B16 vivantes ou apoptotiques, avec ou sans LPS (500ng/ml) et IFN $\gamma$  (20ng/ml ; Roche). Vingt-quatre heures après, les surnageants de cultures ont été récupérés et la production des cytokines IL-12p70 et IL-10 évaluée par ELISA (kit ELISA BD). Les BMDC ont été récupérées pour être phénotypées en termes d'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation.

Pour la préparation des exosomes, 100 x10<sup>6</sup> L-OVA ont été réparties dans des flasques pendant 5h (correspondant au temps de co-culture des expériences fonctionnelles), puis le surnageant récupéré est filtré avec un stéricup (0,22 $\mu$ m). Le surnageant a été conservé à 4°C sur la nuit puis ultracentrifugé à 100 000g (= 22 000rpm) pendant 70 min à 4°C. Ensuite, le culot sec a été récupéré. Pour une concentration de 120x, les exosomes ont été repris dans 830 $\mu$ l (pour 100ml de départ), et des dilutions successives nous ont permis d'obtenir des exosomes concentrés 120x, 60x, 20x et 2x.

Pour l'extinction de l'expression de la connexine 43 (Cx43) dans les cellules L et L-OVA, nous avons utilisé un shRNA Cx43 avec le kit Mission Lentiviral Transduction Particles (SHCLNV ID68473, Sigma-Aldrich). L'extinction de la Cx43 a été vérifiée par western blot et les cellules ont été ensuite cultivées en milieu complet en présence de 500 $\mu$ g/ml de G418 et de 3 $\mu$ g/ml de puromycine (Gibco).

## 4 Expériences de présentation croisée

Pour les expériences fonctionnelles de présentation croisée *in vitro*, les BMDC ont été cultivées 16h avec différentes quantités de cellules L-OVA vivantes ou apoptotiques (rapport L-OVA : DC 0,3 :1 ; 1 :1 ; 3 :1 ; 6 :1 ; 9 :1) en présence de LPS (de *E.Coli* 0111 :B4 ; 500ng/ml ; Sigma-Aldrich). Les DC ont ensuite été purifiées par un tri magnétique positif (billes CD11c, Miltenyi). Dix  $\times 10^3$  DC purifiées ont ensuite été mises en culture avec  $10^4$  cellules B3Z pendant 18h. Après ajout du substrat CPRG, la densité optique a été mesurée à 560nm par un lecteur ELISA (Berthold CB911). Pour les expériences avec les exosomes,  $0,5 \times 10^6$  BMDC (250 $\mu$ l) ont été mises en culture avec des exosomes concentré 2x (250 $\mu$ l) pendant 5h à 37°C. La suite des étapes est identique à celles expliquées précédemment.

Pour les expériences fonctionnelles de présentation croisée *in vivo*, les BMDC ont été cultivées 16h avec les cellules L-OVA ou L-OVA shRNA Cx43 vivantes ou apoptotiques (rapport cellules : DC = 3 :1) ou bien avec 10 $\mu$ g/ml de protéine OVA. Un million de DC purifiées (comme précédemment) ont été injectées en i.v dans des souris C57BL/6 CD45.2 ayant reçues la veille  $2.5 \times 10^6$  OT-I CD45.1/CD45.2 marquées avec 2 $\mu$ M de CFSE. Ces lymphocytes T CD8<sup>+</sup> OT-I naïfs ont été purifiés à partir des ganglions de souris OT-I CD45.1/CD45.2 en utilisant un kit de tri négatif CD8 (Invivogen) et après marquage CFSE, injectés également en i.v. Trois jours plus tard, les splénocytes des souris receveuses ont été analysés en réalisant des marquages avec des anticorps monoclonaux anti-CD8, anti-CD45.1 et anti-V $\alpha$ 2 pour évaluer l'activation cellulaire.

## 5 Analyse du mécanisme de capture de matériel cellulaire

Pour étudier le mécanisme de capture de matériel cellulaire *in vitro*, les BMDC ( $10 \times 10^4$ ) ont été cultivées avec des cellules vivantes (CCL-1 ;  $30 \times 10^4$ ), préalablement marquées avec soit un marqueur lipophile (DiD), soit un marqueur protéique (Calcéine). Après 3h de culture, les cellules ont été marquées par un anticorps anti-CD11c. Dans les expériences d'inhibition, la co-culture a été réalisée en présence ou non de wortmanine (100 nM), mannane (10 mg/ml), fucoidane (1 mg/ml), polyG (500  $\mu$ g/ml), cytochalasine D (20  $\mu$ M), PP2 (30  $\mu$ M), PP3 (30  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich), anti-CD47 purifié et son isotype Rat IgG2a K (eBiosciences) ou un peptide bloquant la calréticuline (Clinisciences). Les DC (ou les CCL-1 lorsque c'était le cas) ont été prétraitées pendant 30 min à 4°C avec les différents inhibiteurs. Alternativement, les cellules ont été cultivées en présence ou non d'un transwell (0,4 $\mu$ m, adaptable sur une plaque 24 puits, BD). Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie de flux.

## 6 Protection contre une épreuve tumorale *in vivo*

A J0, des groupes de 5 souris C57BL/6 ont été injectées avec  $10^6$  cellules B16 F10 en i.v pour induire des tumeurs pulmonaires. Les BMDC ont été cultivées pendant 16h en présence de LPS (500ng/ml) et d'IFN $\gamma$  (20ng/ml), seules ou avec des cellules B16 vivantes ou apoptotiques, ou avec des peptides restreints au CMH-I et dérivés de la tumeur (gp100<sub>25-33</sub> et TRP2<sub>181-188</sub>, 10 $\mu$ M chacun). Les BMDC ( $5 \times 10^5$ ) ont ensuite été lavées, purifiées,  $\gamma$ -irradiées (100Gy) pour éliminer les cellules tumorales vivantes résiduelles, puis immédiatement injectées en i.v dans les souris à J3 et J10. A J15, le nombre de tumeurs pulmonaires a été évalué. Les splénocytes ont été restimulés pendant 36h avec des cellules B16  $\gamma$ -irradiées ou avec 1 $\mu$ M de peptides (gp100<sub>25-33</sub> ou TRP2<sub>181-188</sub>). La capacité des splénocytes stimulés à produire de l'IFN $\gamma$  a été alors évaluée par un ELISPOT et par cytométrie de flux, après un marquage anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 et anti-IFN $\gamma$  en intracellulaire.

## 7 ELISPOT

Des plaques 96 puits en PVDF (Milipore) ont été incubées sur la nuit à 4°C avec 4 $\mu$ g/ml d'anticorps de rat monoclonal anti-IFN $\gamma$  de souris (AN18, Mabtech AB) dilué dans du PBS. Après de nombreux lavages, les puits ont été bloqués pendant 2h à 37°C avec du RPMI contenant 10% de SAB (sérum humain AB, ABCYS). Les splénocytes ( $3 \times 10^5$ ) ont été incubés pendant 36h avec un des peptides correspondant aux épitopes spécifiques (concentration finale 10 $\mu$ g/ml) ou avec les cellules B16 irradiées. Les plaques ont ensuite été lavées puis incubées avec 1 $\mu$ g/ml d'anticorps monoclonal de rat anti-IFN $\gamma$  de souris biotinylé (RA-6A2, Mabtech AB) dilué dans du PBS pendant 2h à 37°C, puis sur la nuit à 4°C. Les plaques ont ensuite été incubées en présence d'extravidine couplé à la phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich) dilué dans du PBS pendant 40 min. Après ajout du substrat NBT/BCIP (Sigma-Aldrich), les spots formés par les cellules (SFC pour spots forming cells) ont été comptés en utilisant le lecteur ELISPOT BioReader 5000F et exprimés en nombre de spots par million de cellules testées.

## 8 Western Blot

Pour le western blot évaluant le niveau d'expression des peptides tumoraux et la protéine ovalbumine, les cellules B16 et L-OVA vivantes ou apoptotiques ont été lysées à 4°C dans du tampon CHAPS (1% 3-[(3Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1propanesulfonate, 10mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, 10% glycérol ; Sigma-Aldrich) contenant des inhibiteurs de protéases (complete EDTA-free tablets, Roche) et 0.2mM d'orthovanadate de sodium (inhibiteur de phosphatases, Sigma-Aldrich). Le lysat a ensuite été centrifugé 30 min à 20000g à 4°C et le surnageant récupéré pour doser la concentration des protéines par spectrométrie à 280nm (NanoDrop, Labtech). Les lysats cellulaires ont ensuite été repris dans du tampon contenant du 2-mercaptoéthanol (Lane Marker Reducing Sample buffer, Thermosciences) et dénaturés à 95°C pendant 5 min. Cinquante µg de protéines (pour les cellules B16) ou 25 µg de protéines (pour les cellules L-OVA) ont été déposées par puits dans un gel SDS/PAGE 10% prêt à l'emploi (BioRad) puis mises à migrer pendant 1h à 150V. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 1h à 80V, puis la membrane a été saturée pendant 2h à température ambiante dans un tampon TBS 0,05% Tween avec 5% de régilait écrémé. Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps polyclonal de lapin anti-OVA (pour les cellules L-OVA), un anticorps polyclonal de chèvre anti-gp100, un anticorps polyclonal de chèvre anti-TRP2 (pour les cellules B16), ou avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-actine sur la nuit à 4°C puis incubées avec des anticorps secondaires couplés HRP (horseradish peroxidase) anti IgG de lapin ou de chèvre (Santa Cruz Biotechnology) pendant 1h à température ambiante. La révélation a été faite par chimioluminescence avec le kit ECL Plus Western Detection Reagent (GE Healthcare) pendant 5 min à température ambiante et la lecture sur l'appareil LAS 300S. L'analyse des gels a ensuite été faite sur le logiciel ImageJ64.

Pour le western blot évaluant le niveau d'expression de la Cx43 dans les cellules L-OVA shRNA Cx43, elles ont été lysées dans un tampon ELB (NP-40) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (complete EDTA-free tablets, Roche). Les étapes de lyse et dénaturation ont été faites de la même manière que précédemment. L'équivalent de  $5 \times 10^5$  de cellules (20µl) a été déposé par puits dans un gel que nous avons préparé à 12% d'acrylamide en condition dénaturante comme précédemment, puis mis à migrer 1h à 200V. Le transfert a été réalisé cette fois à ampérage fixe de 400mA pendant 1h. La suite des étapes est similaire avec l'utilisation des anticorps suivant : anticorps polyclonal de lapin anti-Cx43 (C6219, Sigma-Aldrich), anticorps polyclonal de lapin anti-AKT (#9272 Cell Signaling, Ozyme, France), anticorps secondaire HRP anti IgG de lapin (Santa Cruz Biotechnology). La révélation a également été faite par chimioluminescence avec le kit ECL

mais cette fois ci sur un film et en chambre noire. Les films ont été scannés puis analysés à l'aide du logiciel ImageJ64.

## 9 ELISA

Les ELISA ont été effectués en plaques NUNC Maxisorp en utilisant des kits IL-12p70 et IL-10 (eBiosciences). Les plaques ont été incubées avec l'anticorps de capture sur la nuit à 4°C. Après de nombreux lavages avec le tampon Wash Buffer (PBS 1X 0,05% Tween-20), les plaques ont été saturées pendant 1h à température ambiante. Les surnageants des co-cultures ont ensuite été distribués et incubés pendant 2h à température ambiante. Puis les plaques ont été incubées avec l'anticorps de détection pendant 1h à température ambiante. L'avidine-HRP a alors été ajoutée pendant 30 min à température ambiante puis le substrat TMB pendant 15 min et enfin l'acide sulfurique 2N pour arrêter la réaction. Les plaques ont été mesurées à 450nm avec le lecteur ELISA Berthold CB911.

## 10 Microscopie à fluorescence

Les cellules L-GFP-F ( $40 \times 10^4$ ), transfectées transitoirement avec 3 $\mu$ g de plasmide exprimant la Cx43mCherry, généreusement donné par Christian Giaume (Collège de France, Paris), selon le protocole du fournisseur (GeneJuice Transfection Reagent, Novagen), ont été mises en culture avec des BMDC ( $40 \times 10^4$ ) sur des lamelles pré-coatées en poly-D-lysine (polymère changeant la charge nette du support en charge +) pendant 1h à 37°C. Les cellules ont ensuite été fixées avec de la PFA 4% pendant 15 min à température ambiante puis perméabilisées avec du PBS 1X 0,2% triton pendant 30 min. Les cellules ont été saturées pendant 30 min en PBS 0,3% BSA 5% sérum de chèvre avant l'incubation à 4°C sur la nuit avec l'anticorps de lapin anti-EEA1 (Cell Signaling) et l'anticorps de souris anti-RFP, en PBS 1X 0,3% BSA. Après lavages, l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa 647 (Invitrogen) et l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris IgG1 couplé à l'Alexa 546 (Invitrogen), dilués en PBS 1X 0,3% BSA ont été ajoutés pendant 1h à 4°C. Les cellules ont ensuite été marquées avec du DAPI pendant 5 min à température ambiante dans l'obscurité avant de monter les lamelles sur des lames à l'aide d'un liquide de montage. Les lamelles ont été observées sur un microscope à champ large (LEICA DMI 6000) via le logiciel Metamorphe et les images correspondantes analysées avec le logiciel ImageJ64.

## Résultats

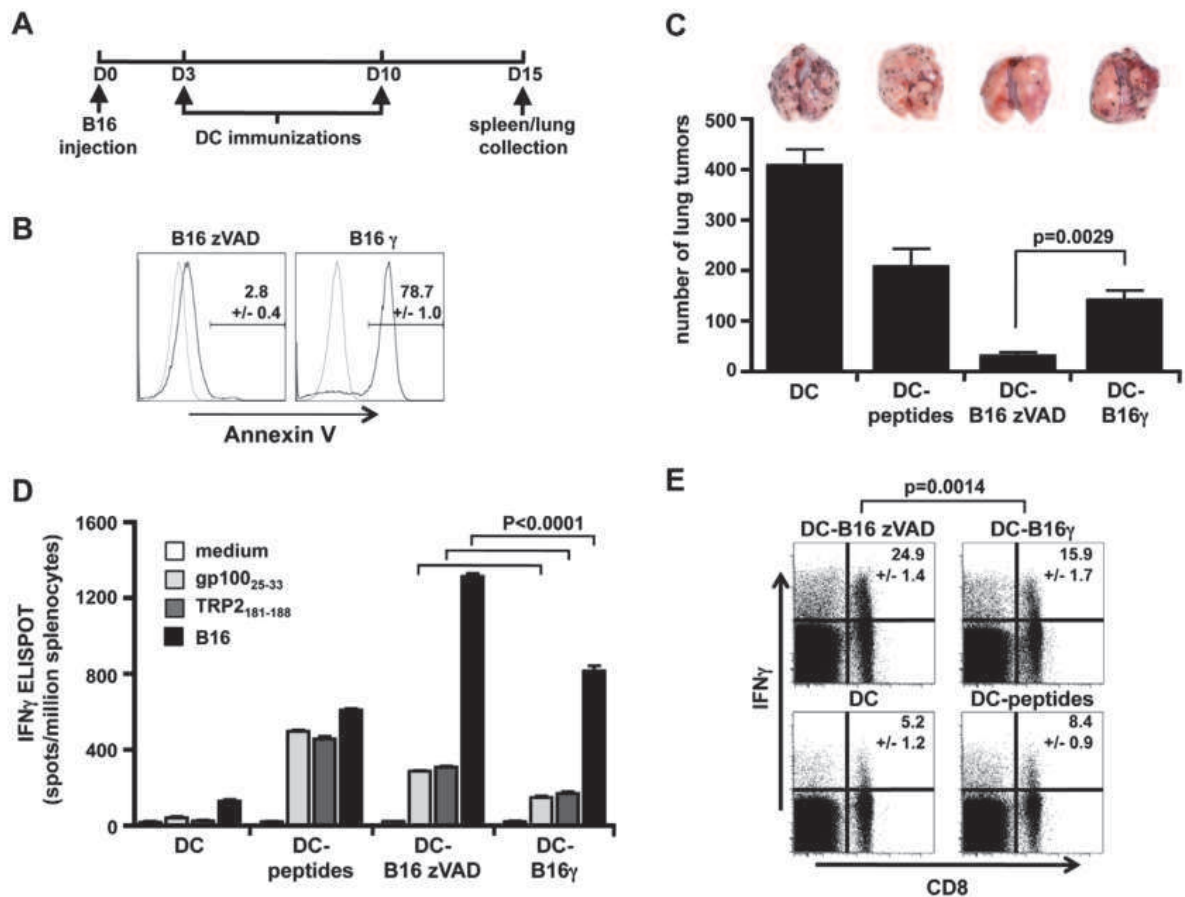


# 1 Protection contre l'implantation d'une tumeur dans un modèle thérapeutique

Notre équipe a récemment montré que, dans un modèle de type prophylactique, l'immunisation avec des DC préalablement cultivées avec des cellules vivantes de mélanome (B16) permet d'induire une protection efficace contre une tumeur dérivée de l'injection de cellules B16<sup>238</sup>. Nous voulions alors tester le potentiel de ces DC dans le contrôle d'une tumeur déjà installée (modèle de type thérapeutique). De plus, nous souhaitions comprendre pourquoi les cellules vivantes semblent être une meilleure source d'antigènes pour les DC en immunothérapie.

## 1.1 Les cellules dendritiques chargées avec des cellules vivantes de mélanome induisent une protection efficace contre une tumeur déjà installée

Nous avons mis en place un modèle d'immunothérapie de type thérapeutique utilisant les DC pour évaluer la capacité des cellules vivantes, donneuses d'antigènes, à induire une protection tumorale (Figure 1A). Pour cela, au jour 0, des groupes de souris C57BL/6 ont reçu une injection de cellules B16 par voie intraveineuse (i.v.) afin d'induire des tumeurs pulmonaires. Les BMDC ont été cultivées seules, avec des peptides épitopiques de la tumeur (gp100<sub>25-33</sub> et TRP2<sub>181-188</sub>), ou avec des cellules B16 vivantes (traitées avec du zVAD, un inhibiteur de caspases) ou apoptotiques (irradiation  $\gamma$ ) en présence de LPS et d'IFN $\gamma$  pendant 16h. La viabilité et l'induction de l'apoptose des cellules B16 ont été évaluées à l'aide d'un marquage annexine-V (Figure 1B). Les DC ont ensuite été purifiées, irradiées à 100Gy afin d'éviter toute contamination par des cellules tumorales vivantes résiduelles, puis injectées en i.v. aux jours 3 et 10. Finalement, au jour 15, le nombre de tumeurs pulmonaires a été évalué.



**Figure 1 : Les DC cultivées avec des cellules B16 vivantes induisent une forte protection contre la tumeur dans un modèle thérapeutique.** (A) Protocole expérimental de l'immunisation. Des souris C57BL/6 (n=5 par groupe) ont été injectées en i.v. avec  $10^6$  de cellules B16 à J0. Des DC ont été cultivées seules (DC), avec les peptides gp100<sub>25-33</sub> et TRP2<sub>181-188</sub> (DC-peptides), ou avec des cellules B16 vivantes (DC-B16 zVAD) ou apoptotiques (DC-B16 $\gamma$ ) en présence de LPS et d'IFN $\gamma$ , pendant 16h. Les DC ont ensuite été purifiées, irradiées puis injectées ( $0,5 \times 10^6$ ) en i.v. aux souris à J3 et J10. (B) Evaluation de la viabilité et de l'induction de l'apoptose des cellules B16 par un marquage annexine-V (ligne solide) comparé à des cellules non marquées (ligne en pointillée). Nombre moyen d'évènements annexine-V positif  $\pm$  SEM indiqué. A J15, les souris ont été sacrifiées, les tumeurs pulmonaires comptées (C) et les réponses T évaluées dans la rate. (D) Les splénocytes ont été restimulés avec les peptides gp100<sub>25-33</sub> et TRP2<sub>181-188</sub>, les cellules B16 ou le milieu seul et testés par ELISPOT pour la sécrétion d'IFN $\gamma$ . Après restimulation par les cellules B16, les splénocytes ont aussi été stimulés avec la PMA/ionomycine puis marqués avec un anticorps anti-CD3, anti-CD8 et un anti-IFN $\gamma$  (intracellulaire). Les évènements CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sont représentés et la production d'IFN $\gamma$  mesurée par cytométrie de flux. Valeur moyenne  $\pm$  SEM indiquée. La significativité des différences entre les séries de résultats a été évaluée en utilisant le t-test non apparié. Expérience représentative de deux expériences indépendantes

Nous observons que les souris immunisées avec des DC cultivées avec des cellules tumorales vivantes développent très peu de tumeurs pulmonaires comparativement à celles immunisées avec des DC seules :  $28 \pm 9$  tumeurs contre  $406 \pm 33$ , respectivement. Étonnamment, la protection est significativement beaucoup plus efficace en utilisant des DC cultivées avec des cellules tumorales vivantes qu'apoptotiques :  $28 \pm 9$  tumeurs contre  $139 \pm 20$ , respectivement (Figure 1C,  $p=0.0029$ ). De plus, lorsque les splénocytes de ces souris sont restimulés avec les peptides gp100<sub>25-33</sub> et TRP2<sub>181-188</sub> de la tumeur B16 ou bien avec la tumeur B16 entière, nous constatons que les réponses IFN $\gamma$  sont meilleures avec les splénocytes provenant de souris immunisées avec les DC cultivées avec des cellules B16 vivantes qu'avec ceux des souris immunisées avec les DC cultivées avec des cellules apoptotiques (Figure 1D). Plus généralement, l'immunisation avec des DC chargées avec des cellules vivantes ou apoptotiques induit des réponses plus fortes que celles obtenues avec des DC chargées avec des peptides dérivés de la tumeur. En effet, les cellules tumorales fournissent un répertoire antigénique ne se restreignant pas aux uniques peptides gp100<sub>25-33</sub> et TRP2<sub>181-188</sub> et sont donc capables de stimuler un plus grand nombre de clones de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur.

Parmi les splénocytes provenant de souris immunisées avec les DC chargées avec les cellules B16, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> représentent la majorité des cellules produisant l'IFN $\gamma$ , suggérant qu'il s'agit de réponses majoritairement restreintes aux molécules du CMH-I obtenues par présentation croisée des antigènes tumoraux. Notons cependant que des réponses ont également été induites parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, mais dans une moindre mesure (données non montrées).

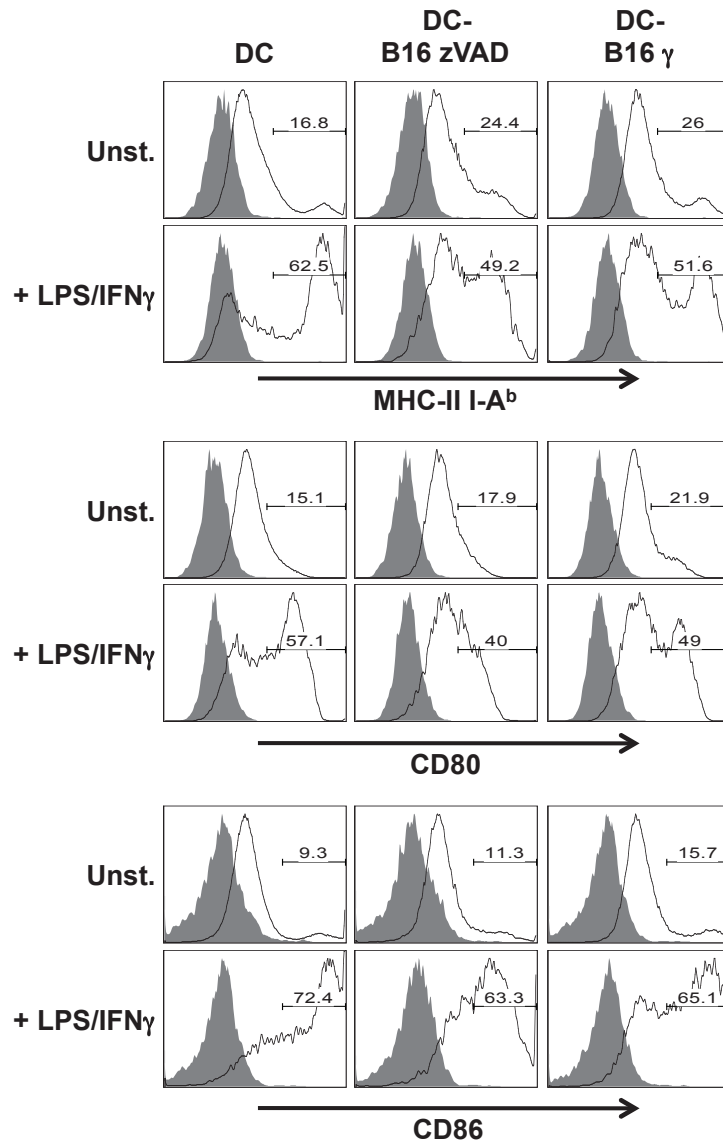
L'immunisation avec des DC chargées avec des cellules tumorales vivantes permet donc d'induire une meilleure protection et une réponse immunitaire plus efficace que celles obtenues avec des DC cultivées avec des cellules tumorales apoptotiques dans un modèle thérapeutique.

## 1.2 Les cellules dendritiques cultivées avec des cellules B16 apoptotiques produisent plus d'IL-10 que celles cultivées avec des cellules B16 vivantes

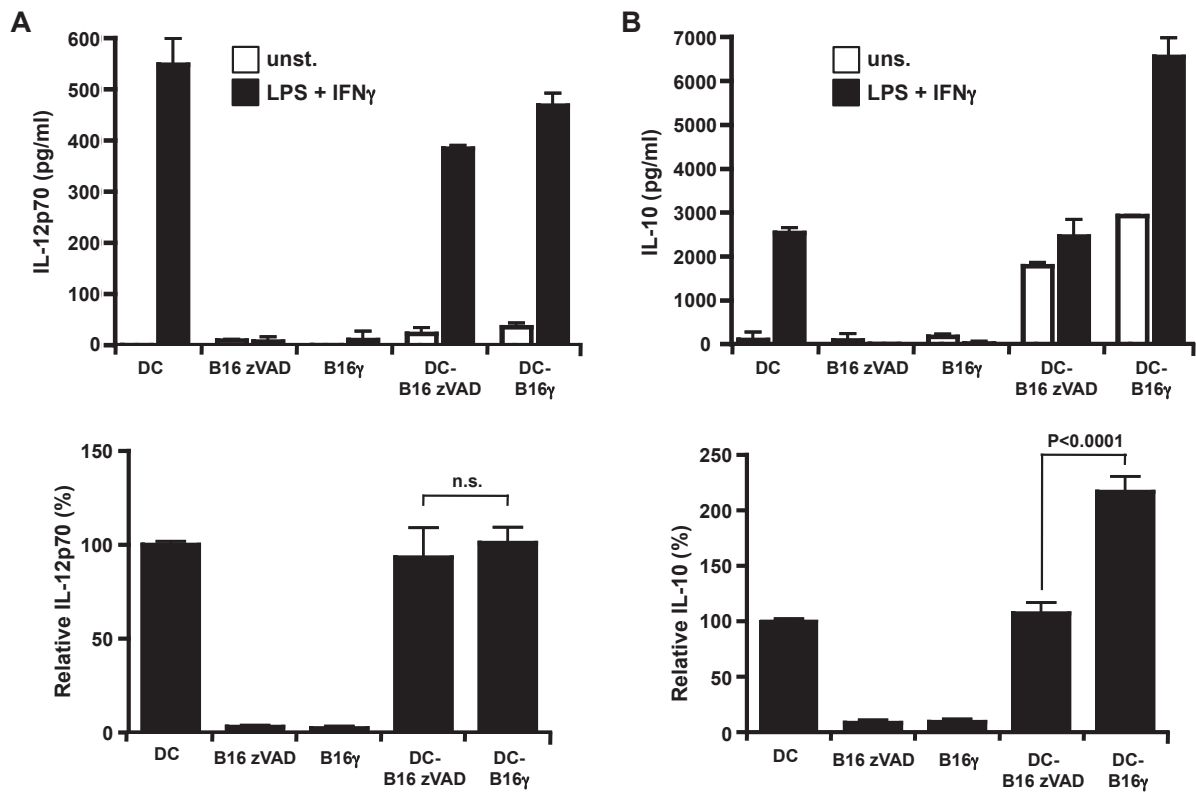
Nous avons tout d'abord évalué si la différence d'efficacité entre les cellules vivantes et les cellules apoptotiques était due à leurs effets sur la maturation des DC. Pour cela, les DC ont été cultivées avec des cellules B16 vivantes ou apoptotiques en présence ou non de LPS et d'IFN $\gamma$  pendant 24h, puis le niveau d'expression des molécules du CMH-II et de costimulation (CD80 et CD86) des DC et le profil cytokinique des surnageants de ces cultures ont été évalués. Ceci nous a permis, d'une part, d'évaluer l'effet direct des cellules vivantes ou apoptotiques sur la maturation des DC et, d'autre part, d'estimer leur impact sur la maturation induite par le LPS et l'IFN $\gamma$ . En l'absence de stimulation avec le LPS et l'IFN $\gamma$ , les DC cultivées avec des cellules vivantes ou apoptotiques présentent un phénotype très légèrement mature en terme d'expression des molécules du CMH-II et de costimulation. Au contraire, en présence de LPS et d'IFN $\gamma$ , les DC cultivées avec des cellules vivantes ou apoptotiques sont moins matures que celles cultivées seules. De plus, les DC cultivées avec des cellules B16 apoptotiques sont légèrement plus matures que celles cultivées avec des cellules B16 vivantes (Figure 2).

Nous avons également examiné la production d'IL-12p70 (cytokine pro-inflammatoire) et d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) dans ces cultures. Comme attendu, les cellules B16 vivantes ou apoptotiques seules ne produisent ni d'IL-12p70 ni d'IL-10 même après stimulation avec du LPS et de l'IFN $\gamma$ . Les DC cultivées avec des cellules vivantes ou apoptotiques produisent des concentrations similaires d'IL-12p70 après une stimulation avec du LPS et de l'IFN $\gamma$  (Figure 3A). Par contre, les DC cultivées avec des cellules B16 apoptotiques produisent plus d'IL-10 que celles cultivées avec des cellules B16 vivantes ou seules (Figure 3B).

La culture des DC avec des cellules B16 apoptotiques aboutit donc à une maturation phénotypique légèrement plus importante et une sécrétion d'IL-10 significativement plus forte que celles obtenues avec des DC cultivées avec des cellules B16 vivantes. Cette augmentation de sécrétion d'IL-10 pourrait en partie expliquer la moins bonne efficacité des DC chargées avec des cellules apoptotiques à stimuler des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.



**Figure 2: Etat de maturation des DC cultivées en présence de cellules B16 vivantes ou apoptotiques.** Les DC ont été cultivées seules (DC) ou avec des cellules B16 vivantes (DC-B16 zVAD) ou apoptotiques (DC-B16 $\gamma$ ) en présence ou non de LPS et d'IFN $\gamma$  pendant 24h. Le niveau d'expression des molécules du CMH-II et des molécules de costimulation, CD80 et CD86, a ensuite été évalué en cytométrie en flux. Expérience représentative de trois expériences indépendantes.



**Figure 3 : Profil cytokinique des DC cultivées en présence de cellules B16 vivantes ou apoptotiques.**

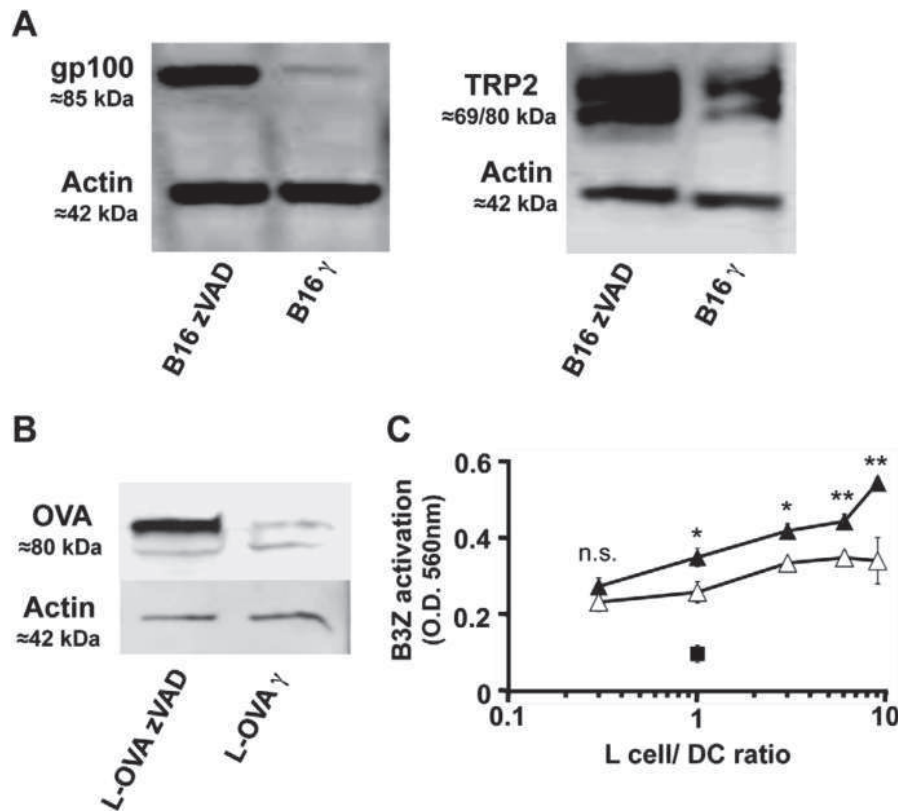
Les DC ont été cultivées seules (DC) ou avec des cellules B16 vivantes (DC-B16 zVAD) ou apoptotiques (DC-B16 $\gamma$ ) en présence ou non de LPS et d'IFN $\gamma$  pendant 24h. Des cellules B16 vivantes ou apoptotiques ont également été cultivées seules. Les niveaux de production d'IL-12p70 (A) et d'IL-10 (B) dans les surnageants de culture ont été évalués par ELISA. Panneaux du haut : expérience représentative de trois expériences indépendantes. Panneaux du bas : en condition de stimulation LPS et IFN $\gamma$ , la production relative d'IL-12p70 et d'IL-10 est exprimée par rapport à la production de cytokines obtenues dans la condition DC seules, sous forme de pourcentage (n=3, expériences indépendantes). Valeur moyenne  $\pm$  SEM indiquée. La significativité des différences entre les séries de résultats a été évaluée en utilisant un t-test apparié bilatéral.

### 1.3 Les cellules vivantes améliorent la présentation croisée par les cellules dendritiques en conservant l'antigène sous sa forme native

Un des paramètres contrôlant l'efficacité de la présentation croisée est la source d'antigène accessible à la DC<sup>331</sup>. En effet, l'efficacité de la présentation croisée dépend de la qualité et de la quantité d'antigènes fournis par les cellules donneuses d'antigènes. Nous avons donc évalué l'état des antigènes gp100<sub>25-33</sub> et TRP2<sub>181-188</sub> au sein de cellules B16 vivantes et apoptotiques par western blot. Nous observons que tous deux sont fortement dégradés dans les cellules apoptotiques alors qu'ils sont bien conservés dans les cellules vivantes (Figure 4A).

Nous avons ensuite estimé l'impact de la conservation de l'antigène sur l'efficacité de la présentation croisée. Pour cela, nous avons évalué le niveau d'expression du complexe CMH-I/SIINFEKL des DC ayant capturé du matériel provenant de cellules L-OVA exprimant de l'ovalbumine (OVA) sous sa forme non sécrétée à l'aide de l'hybridome T CD8<sup>+</sup> B3Z (hybridome T CD8<sup>+</sup> spécifiques du peptide SIINFEKL dont l'activation est indépendante des signaux de costimulation). Nous n'avons pas pu utiliser les cellules B16 exprimant l'OVA puisqu'elles l'expriment sous sa forme sécrétée. Nous avons tout d'abord confirmé que, de façon similaire aux peptides gp100<sub>25-33</sub> et TRP2<sub>181-188</sub> des cellules B16, l'ovalbumine était fortement dégradée dans les cellules L-OVA apoptotiques alors qu'elle était conservée dans un état natif dans les cellules vivantes (Figure 4B). Nous avons alors cultivé les DC avec des cellules L-OVA vivantes ou apoptotiques à différents ratios et mesuré le niveau d'activation des hybridomes T CD8<sup>+</sup> B3Z en présence de ces DC. Nous avons ainsi pu montrer qu'il fallait approximativement trois fois plus de cellules apoptotiques que de cellules vivantes pour atteindre le même niveau de complexes CMH-I/SIINFEKL. De plus, le plateau maximum d'activation est plus faible avec les DC chargées avec les cellules apoptotiques (Figure 4C). Il en résulte que l'activation des hybridomes T CD8<sup>+</sup> B3Z est significativement plus élevée lorsque les DC sont cultivées avec des cellules vivantes qu'apoptotiques.

La meilleure conservation de l'antigène sous sa forme native dans les cellules vivantes permet donc d'induire l'expression d'un plus grand nombre de complexes CMH-I/épitope sur les DC. Ce plus grand nombre de complexe pourrait en partie expliquer la meilleure efficacité des DC chargées avec des cellules B16 vivantes à stimuler des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur dans nos modèles d'immunisation.



**Figure 4 : Plus d'antigènes natifs dans les cellules vivantes qu'apoptotiques : amélioration de la présentation croisée par les DC.** (A, B) L'état de dégradation de la gp100, de TRP2 et de l'OVA a été évalué par Western blot. (A) Le lysat de  $30 \times 10^6$  de cellules B16 vivantes (B16 zVAD) ou apoptotiques (B16 $\gamma$ ) a été analysé avec un anti-gp100 ou un anti TRP2. (B) Le lysat de  $30 \times 10^6$  de cellules L-OVA vivantes (L-OVA zVAD) ou apoptotiques (L-OVA $\gamma$ ) a été analysé avec un anti-OVA. Comme témoin de charge, les lysats ont également été analysés avec un anti-actine. (C) Les DC ont été cultivées avec différentes quantités de cellules L-OVA vivantes (triangles pleins) ou apoptotiques (triangles ouverts) ou avec des cellules L n'exprimant pas l'OVA (carré plein). Les DC ont ensuite été purifiées et mises en culture avec l'hybridome T CD8<sup>+</sup> B3Z pendant 18h. L'activation des hybridomes a été détectée par densité optique à 560nm après addition du substrat CPRG. Expérience représentative de deux expériences indépendantes. Valeur moyenne  $\pm$  SEM indiquée. La significativité des différences entre les séries de résultats a été évaluée en utilisant un *t*-test non apparié bilatéral. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . n.s : non significatif.



## 2 Mécanismes impliqués dans le transfert et la présentation croisée des antigènes provenant de cellules vivantes

Durant la seconde partie de ma thèse, je me suis attachée à caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la présentation croisée d'antigènes provenant de cellules vivantes par les DC. Nous souhaitons ainsi comprendre ce qui confère à une cellule vivante sa capacité à fournir des antigènes.

Pour cela, nous avons éprouvé différents mécanismes potentiellement impliqués dans la présentation antigénique, que j'ai évoqués dans l'introduction (partie 2.2, p.47). Tout d'abord, afin de nous affranchir du « *cross-dressing* », qui correspond à l'échange de complexes CMH-I/peptide d'une cellule vers l'autre, nous avons utilisé comme cellules donneuses d'antigènes les cellules L exprimant des molécules du CMH-I d'haplotype H-2K<sup>d</sup>, incapables de présenter le peptide SIINFEKL de l'OVA.

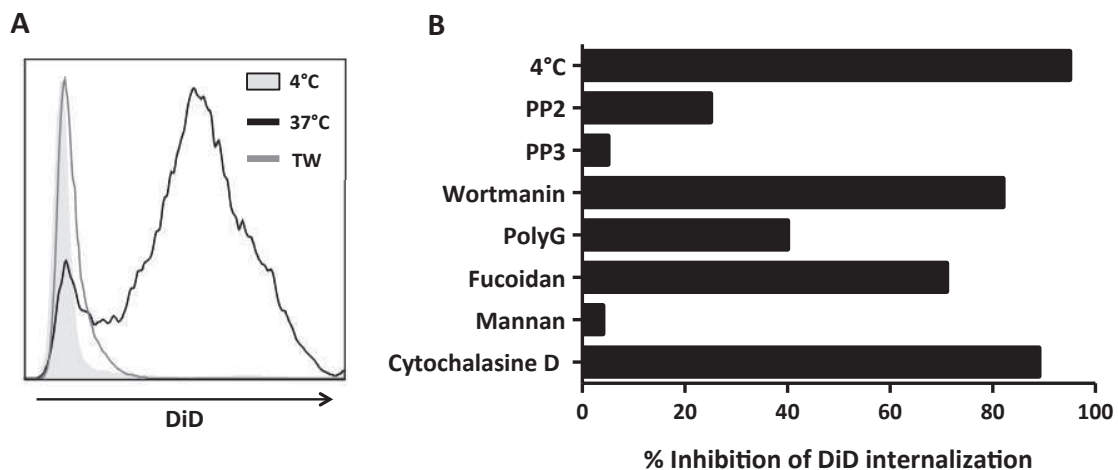
### 2.1 La capture de matériel provenant de cellules vivantes est dépendante du contact cellulaire, de la polymérisation de l'actine, des récepteurs de type scavenger et de la PI3 Kinase.

Nous avons évalué l'implication de différentes molécules dans le transfert de matériel provenant de cellules vivantes. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de capture en utilisant des cellules CCL-1 (équivalentes des cellules L) marquées avec un marqueur lipophile, le DiD. Expérimentalement, les BMDC ont été prétraitées avec des inhibiteurs de ces différentes molécules pendant 30min à 4°C. Elles ont ensuite été cultivées avec les cellules L-DiD<sup>+</sup> en présence de ces mêmes inhibiteurs pendant 3h à 37°C, puis marquées avec un anti-CD11c. Le niveau de capture a été mesuré en cytométrie en flux en évaluant le pourcentage de DC-CD11c<sup>+</sup> exhibant un marquage DiD, correspondant aux événements CD11c<sup>+</sup>DiD<sup>+</sup>.

Nous avons tout d'abord évalué la nécessité d'un contact cellulaire en cultivant les BMDC avec des cellules CCL-1-DiD<sup>+</sup> en présence ou non d'un transwell pendant 3h. Nous observons que la capture de matériel membranaire dépend d'un contact cellulaire, puisque l'utilisation du transwell empêche la capture efficace de matériel membranaire par les DC (Figure 5A).

De plus, nous montrons que cette capture est un processus actif puisqu'elle est inhibée à 4°C (Figure 5A et 5B).

Nous avons ensuite estimé l'implication de différentes molécules en traitant les BMDC avec différents inhibiteurs : le PP2 (inhibiteur des kinases de la famille Src), le PP3 (contrôle de PP2), la wortmanine (inhibiteur de la PI3 Kinase), le polyG et le fucoïdane (inhibiteurs des récepteurs scavenger), le mannane (inhibiteur des récepteurs du mannose) ou la cytochalasine D (inhibiteur de la polymérisation de l'actine), suivant le protocole indiqué dans la partie « Matériels et Méthodes ». Nous montrons ainsi que le transfert de matériel est dépendant de la polymérisation de l'actine (89% d'inhibition en présence de cytochalasine D), de la PI3 Kinase (82% d'inhibition en présence de wortmanine) et des récepteurs de type scavenger (respectivement 40% et 71% d'inhibition en présence de polyG et de fucoïdane). Les récepteurs du mannose ne semblent pas être impliqués puisque nous n'observons que 4% d'inhibition en présence de mannane. Enfin, nous avons observé une légère inhibition du transfert en présence de PP2 (25% d'inhibition), suggérant que les kinases de la famille Src ne sont que partiellement impliquées (Figure 5B).

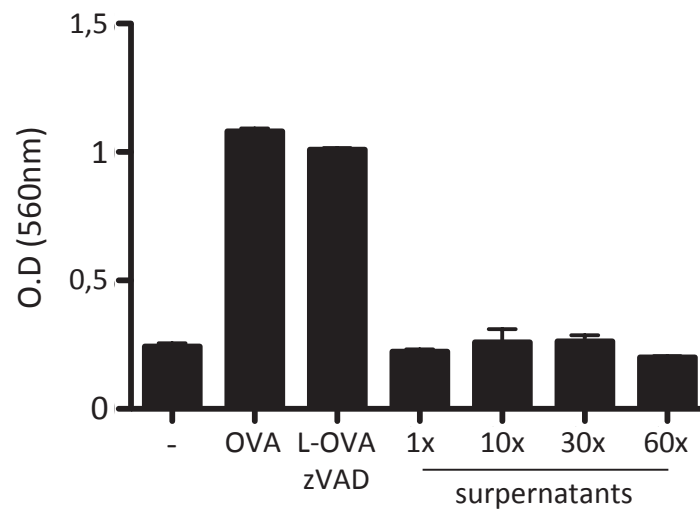


**Figure 5 : la capture de matériel membranaire provenant de cellules vivantes dépend du contact cellulaire, de la polymérisation de l'actine, des récepteurs de type scavenger et de la PI3K.** (A, B) Les BMDC ont été cultivées avec des cellules CCL-1 marquées au DiD à 4°C ou à 37°C pendant 3h. (A) Les BMDC et les cellules CCL-1-DiD<sup>+</sup> ont été mises en culture dans le même puits (ligne noire) ou séparées par un transwell (ligne grise). (B) les BMDC ont été prétraitées avec les inhibiteurs indiqués pendant 30min à 4°C. Elles ont ensuite été cultivées avec les cellules CCL-1-DiD<sup>+</sup> en présence de ces mêmes inhibiteurs pendant 3h à 37°C, puis marquées avec un anti-CD11c. Le niveau de capture a été mesuré en cytométrie en flux en évaluant le pourcentage de DC-CD11c<sup>+</sup> exhibant un marquage DiD, correspondant aux événements CD11c<sup>+</sup>DiD<sup>+</sup>. Expérience représentative de deux expériences indépendantes.

## 2.2 La présentation croisée à partir de cellules vivantes ne dépend pas des exosomes

Comme nous l'avons vu, les exosomes sont des petites vésicules sécrétées naturellement par les cellules qui peuvent contenir des protéines. Nous voulions donc vérifier si des exosomes contenant de l'ovalbumine produits par les cellules L pourraient expliquer à eux seuls le transfert d'antigènes. Bien que les expériences de transwell suggèrent que cela n'est pas le cas, la distance entre les cellules dans ces conditions pourrait empêcher d'atteindre une concentration en exosomes à proximité des DC suffisante pour traduire une réalité physiologique et ainsi observer leur véritable effet.

Pour cela, nous avons récolté le surnageant de cellules L-OVA exprimant la forme cytosolique de l'OVA. Les exosomes putatifs contenus dans ce surnageant ont été concentrés par ultracentrifugation à 100 000g<sup>332</sup>. Les cellules L-OVA vivantes (L-OVA zVAD), les cellules L vivantes (n'exprimant pas l'OVA), ou les différentes préparations d'exosomes concentrés ont ensuite été mises en culture avec des BMDC pendant 16h. Les DC récupérées ont alors été mises en culture avec l'hybridome T B3Z pendant 18h et leur activation a été évaluée en mesurant l'activité de la  $\beta$ -galactosidase (Figure 6). Dans cette expérience, que nous n'avons réalisé qu'une seule fois, nous avons utilisé différents témoins : deux témoins négatifs correspondant aux DC cultivées seules ou avec les cellules L ; et deux témoins positifs correspondant aux DC cultivées en présence de 1mg/ml de protéine OVA pure ou avec des cellules L-OVA. Ces témoins sont nécessaires pour évaluer 1) si le test de présentation croisé est fonctionnel et 2) la spécificité antigénique de la présentation croisée. Malheureusement, dans cette expérience, nous avons eu un problème avec un des témoins négatif, les DC cultivées avec les cellules L, qui présentait un niveau anormalement élevé d'activation de l'hybridome T B3Z. Compte tenu du recul que nous avons avec ce type d'expérience, nous pensons qu'il s'agit d'un point aberrant, raison pour laquelle je ne l'ai pas représenté sur la Figure 6. Néanmoins, il est indispensable que nous reproduisions cette expérience.



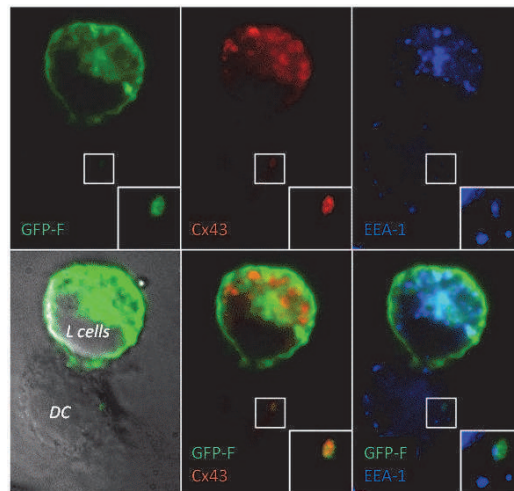
**Figure 6 : La présentation croisée d'antigènes cellulaires à partir de cellules vivantes ne dépend pas du transfert d'exosomes.** Les DC ont été cultivées seules (-), avec de la protéine OVA (OVA), avec des cellules L-OVA (L-OVA zVAD), ou en présence de différentes concentrations d'exosomes provenant du surnageant concentré (1x, 10x, 30x, 60x) de cellules L-OVA vivantes pendant 16h. Les DC ont ensuite été purifiées puis mises en culture avec les hybridomes T CD8<sup>+</sup> B3Z pendant 18h. L'activation des hybridomes a été détectée par densité optique à 560nm après l'ajout du substrat CPRG. Valeur moyenne ± SEM indiquée.

En se basant sur les témoins que nous avons, nous n'observons pas d'activation des hybridomes T CD8<sup>+</sup> B3Z en présence de DC cultivées avec les différentes préparations d'exosomes concentrés. Ce résultat indique que le transfert d'antigènes à partir de cellules vivantes et la présentation croisée subséquente sont indépendants de la sécrétion d'exosomes.

## 2.3 Ce mécanisme de capture permet le transfert de molécules de grosse taille au sein de structures qui s'apparentent aux jonctions annulaires

Les expériences d'imagerie que nous avons réalisées avaient mises en évidence le transfert de matériel membranaire (GFP-farnésylée) et cytosolique (CellTracker<sup>TM</sup> orange CMRA) de la cellule vivante vers les DC sous forme de vésicules<sup>238</sup>. Surtout, nous avons observé que ce mécanisme de transfert permettait le passage d'une molécule de grande taille, la GFP (70 kDa), qui conservait sa conformation native après transfert. Nous avons donc recherché quel type de structure et de transfert de matériel entre deux cellules pouvait correspondre à ce que nous observions. Nous avons ainsi constaté que notre mécanisme d'acquisition de matériel cellulaire s'apparentait aux jonctions annulaires (*annular gap junction*)<sup>333</sup>. Dans ces structures, l'accolement de deux cellules induit la formation d'une plaque, correspondant à l'accumulation de jonctions gap constituées de Cx43, qui est internalisée au sein d'une des cellules sous forme de vésicules. Ces vésicules sont donc constituées de matériels, dont la Cx43, provenant des deux cellules. Nous avons donc voulu éprouver plus clairement l'hypothèse selon laquelle la capture de matériel provenant de cellules vivantes fait intervenir la formation d'une structure de type « jonction annulaire ».

Pour cela, nous avons utilisé des cellules L exprimant stablement la GFP ancrée à la membrane plasmique (GFP farnésylée, GFP-F), que nous avons transfecté transitoirement avec un plasmide codant pour la Cx43 fusionnée à la sonde fluorescente mCherry (Cx43-mCherry). Ces cellules ont ensuite été cultivées avec des BMDC à un ratio 1 :1 pendant 1h à 37°C. Nous avons ainsi pu observer que les DC sont capables de capturer de la GFP et de la Cx43 provenant de la cellule vivante sous forme de vésicules qui colocalisent avec le marqueur d'endosome EEA-1 (early endosome antigen 1) (Figure 7). Ces résultats suggèrent donc l'existence d'un mécanisme de communication intercellulaire s'apparentant aux jonctions annulaires permettant le passage d'antigènes de grande taille sous forme de vésicules qui colocalisent avec les endosomes au sein des DC.



**Figure 7 : Internalisation de matériel provenant de cellules vivantes au sein de vésicules qui colocalisent avec le marqueur EEA-1 des endosomes dans les DC.** Les BMDC ont été cultivées avec des cellules L-GFP-F (en vert), exprimant transitoirement la Cx43-mCherry (en rouge) pendant 1h à 37°C. les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées puis marquées avec un anticorps anti-EEA-1 (en bleu).

## 2.4 La connexine 43 n'est pas nécessaire pour la présentation croisée d'OVA à partir de cellules vivantes ou apoptotiques

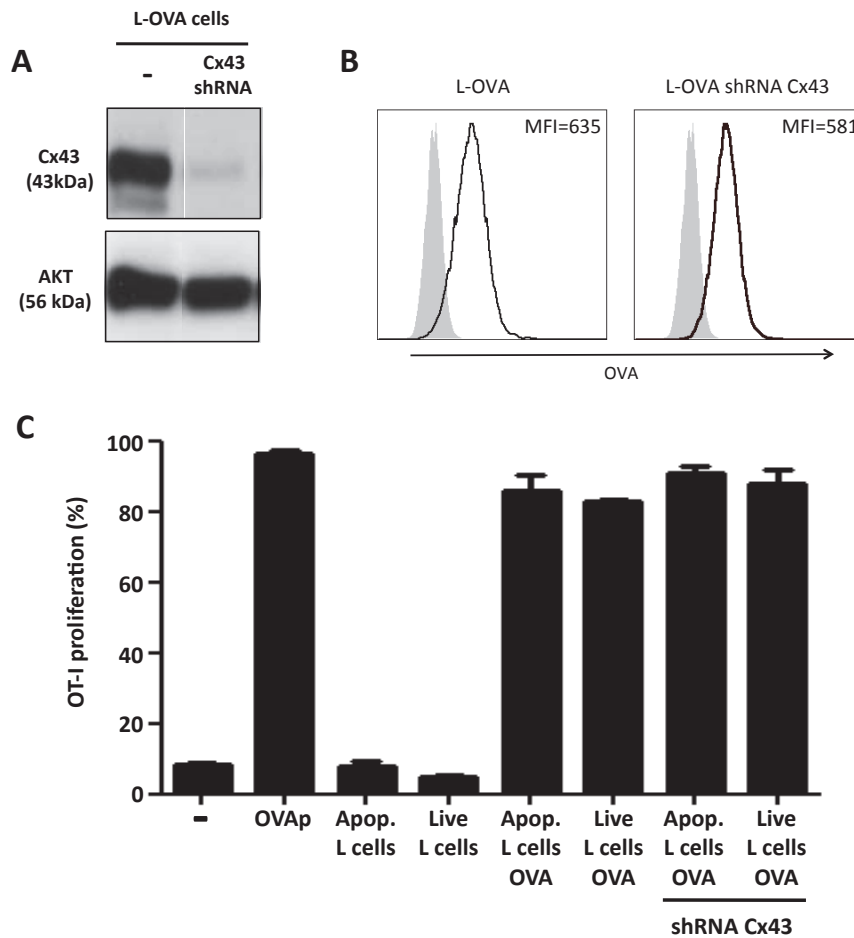
Comme je l'ai évoqué dans l'introduction, les jonctions gap permettent le passage de petites molécules entre les cellules. Ainsi, plusieurs études ont montré que les DC pouvaient acquérir des antigènes provenant de cellules sous forme de peptides via les jonctions gap constituées de Cx43 afin d'activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par présentation croisée<sup>133,135,141</sup>.

Compte tenu de ces travaux et de ce que nous avons observé en microscopie, nous avons décidé d'interroger directement le rôle de la Cx43 dans le transfert et la présentation croisée d'antigènes provenant de cellules vivantes. Pour répondre à cette question, nous avons généré des cellules L-OVA dans lesquelles nous avons éteint l'expression de la Cx43 à l'aide d'un lentivirus contenant un shRNA dirigé contre la Cx43. Nous avons ainsi pu obtenir des cellules L-OVA dont l'expression de Cx43 est réduite de 90% (Figure 8A). Nous avons également contrôlé que ces cellules exprimaient un niveau comparable d'OVA (Figure 8B).

Afin d'évaluer le rôle de la Cx43 sur la présentation croisée, nous avons effectué des expériences fonctionnelles *in vivo* (Figure 8C). Expérimentalement, les BMDC ont été cultivées seules, avec de la protéine OVA, avec des cellules L vivantes ou apoptotiques, avec

des cellules L-OVA vivantes ou apoptotiques, ou avec des cellules L-OVA dans lesquelles l'expression de la Cx43 a été éteinte par shRNA pendant 16h. Les BMDC ont ensuite été purifiées puis injectées à des souris dans lesquelles des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques du peptide SIINFEKL de l'OVA (cellules OT-I) marquées au CFSE ont été transférées adoptivement la veille. Trois jours plus tard, les rates des souris ont été prélevées et la prolifération des cellules OT-I évaluée par mesure de dilution du CFSE.

Nous avons observé que la prolifération des cellules OT-I était identique que les cellules L-OVA expriment ou pas la Cx43. Ainsi, bien que la Cx43 soit présente dans les vésicules internalisées (Figure 7), sa présence n'est pas indispensable à la présentation croisée à partir de cellules vivantes par les DC.



**Figure 8 : La Cx43 n'est pas essentielle à la présentation croisée de cellules vivantes par les DC.** (A) Expression de l'OVA (ligne noire) dans les cellules L-OVA et L-OVA éteintes pour la Cx43, comparé aux cellules L (histogramme gris). (B) Efficacité de l'extinction de la Cx43 évaluée par Western blot. Le lysat de  $0,5 \times 10^6$  de cellules L-OVA et de cellules L-OVA dans lesquelles l'expression de la Cx43 a été éteinte par shRNA (Cx43 shRNA) a été analysé avec un anti-Cx43 et un anti-Akt (comme témoin de charge). (C) Les BMDC ont été cultivées seules (-), en présence de la protéine OVA (OVAp), avec des cellules L apoptotiques (Apop. L cells) ou vivantes (Live. L cells) ou des cellules L-OVA éteintes ou non pour la Cx43 vivantes (Live L cells OVA) ou apoptotiques (Apop. L cells OVA) pendant 16h. Les DC ont ensuite été purifiées puis injectées en i.v. à des souris C57BL/6 CD45.2 (n=3 par groupe) dans lesquelles des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques du peptide SIINFEKL de l'OVA (cellules OT-I CD45.1/CD45.2) marquées au CFSE ont été transférées adoptivement la veille. Trois jours plus tard, les rates des souris ont été prélevées et la prolifération des cellules OT-I évaluée par mesure de dilution du CFSE. Valeur moyenne  $\pm$  SEM indiquée. Expérience représentative de deux expériences indépendantes.

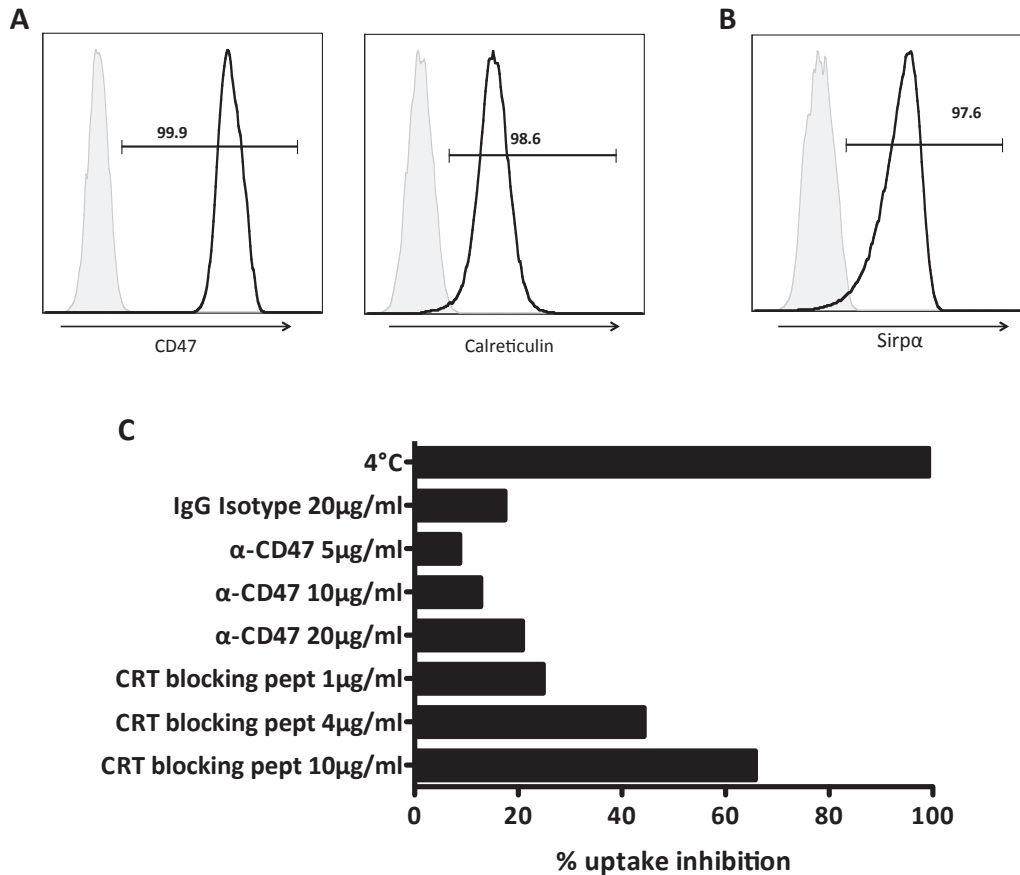


## 2.5 Le rôle des signaux « eat-me » et « don't eat-me » dans la capture de matériel provenant de cellules vivantes

Dans cette dernière partie de mon travail, j'ai essayé de définir ce qui confère à une cellule vivante sa capacité à fournir des antigènes. En effet, nous faisons l'hypothèse que certains états occasionnant un stress pourraient favoriser la reconnaissance des cellules vivantes par les DC et donc le transfert d'antigènes, en rompant l'équilibre entre les signaux « eat me » et « don't eat me » exprimés par ces cellules. Ces signaux, que j'ai largement évoqué dans mon introduction, permettent aux cellules phagocytaires de différencier les cellules apoptotiques ou subissant un stress cellulaire, qui doivent être reconnues et capturées, des cellules vivantes non stressées, qui doivent à priori être « ignorées ». Ainsi, il a été montré que l'expression membranaire de la calréticuline (CRT) sur certaines cellules apoptotiques correspondait à un signal « eat-me »<sup>98</sup>. A l'inverse, l'expression de CD47 est largement considéré comme un signal « don't eat me »<sup>97,102</sup>. Des travaux ont également montré qu'il existe une étroite relation entre l'expression de la CRT et celle de CD47. Lors de l'apoptose, elles s'expriment sous forme de patches éloignés l'un de l'autre laissant la CRT en contact avec la cellule phagocytaire<sup>97</sup>. De plus, dans les cellules tumorales humaines, la forte expression de la CRT est contrebalancée par la forte expression du CD47, et le blocage de CD47 permet d'augmenter la phagocytose dépendante de la CRT<sup>103</sup>. Compte tenu de ces éléments, nous avons décidé de nous focaliser sur l'implication de la CRT et CD47 dans le transfert de matériel provenant de cellules vivantes.

Nous avons tout d'abord évalué le niveau d'expression de la CRT et CD47 sur les cellules CCL-1 en cytométrie en flux (Figure 9A). Nous avons également vérifié l'expression de Sirp $\alpha$ , récepteur de CD47, sur les BMDC (Figure 9B). Nous avons ainsi pu montrer que la CRT et CD47 étaient fortement exprimés sur les cellules CCL-1, ainsi que Sirp $\alpha$  sur les BMDC. Nous avons ensuite estimé l'effet d'un peptide bloquant la CRT et d'un anticorps neutralisant anti-CD47 sur la capture de matériel provenant de cellules vivantes par les DC. Les cellules CCL-1 et les BMDC ont donc été prétraitées avec différentes concentrations de peptide bloquant et d'anticorps neutralisant pendant 30 min à 4°C. Au préalable, les cellules CCL-1 ont été marquées au CellTracker™ Orange CMRA, (marqueur de viabilité qui marque les protéines cytosolique). Les BMDC et les cellules CCL-1 ont ensuite été mises en culture en présence de ces mêmes inhibiteurs pendant 3h à 37°C, puis marquées avec un anti-CD11c. Le niveau de capture a été mesuré en cytométrie en flux en évaluant le pourcentage de DC-CD11c<sup>+</sup> contenant du matériel cellulaire marqué au CellTracker™ Orange CMRA provenant des cellules vivantes.

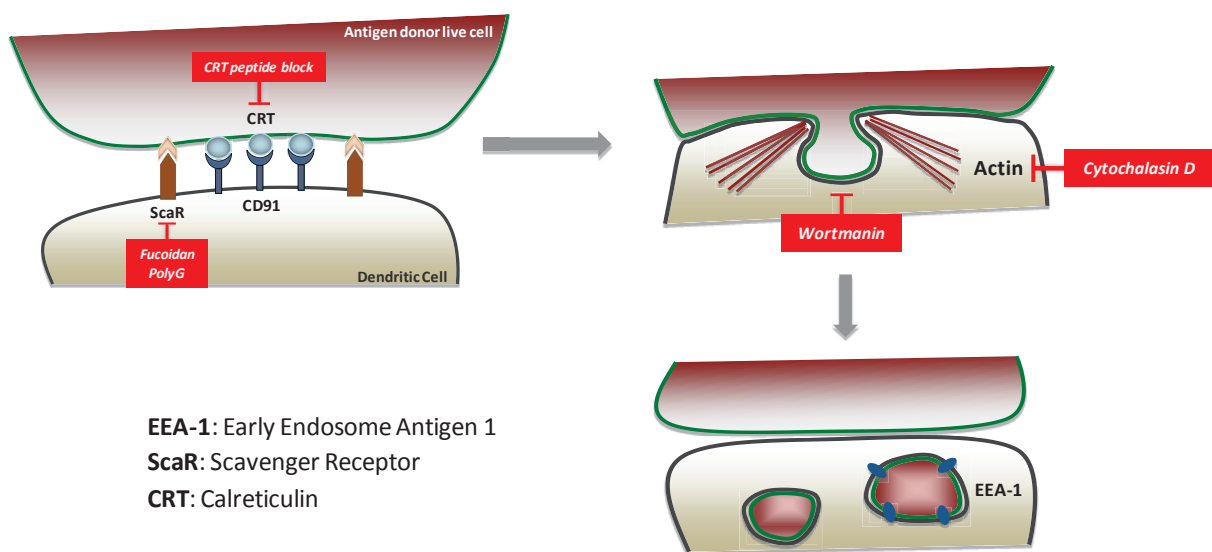
En présence de peptide bloquant la CRT, et de façon dose-dépendante, la capture de matériel cytosolique provenant des cellules vivantes par les BMDC est diminuée. En revanche, nous n'avons pas observé d'augmentation de capture en présence de l'anticorps anti-CD47, même à de fortes doses (Figure 9C).



**Figure 9 : L'expression de la calréticuline est impliquée dans la capture de matériel cytosolique provenant de cellules vivantes par les DC.** (A) les niveaux d'expression de la CRT et de CD47 sur les cellules CCL-1 (A) et de Sirpα sur les DC (B) ont été évalués en cytométrie en flux. (C) Les cellules CCL-1 et les BMDC ont été prétraitées avec différentes concentrations de peptide bloquant la CRT (CRT blocking pept) ou d'anticorps neutralisant anti-CD47 (α-CD47) pendant 30 min à 4°C. Au préalable, les cellules CCL-1 ont été marquées au CellTracker™ Orange CMRA. Les BMDC et les CCL-1 ont ensuite été mises en culture en présence de ces mêmes inhibiteurs pendant 3h à 37°C, puis marquées avec un anti-CD11c. Le niveau de capture a été mesuré en cytométrie en flux en évaluant le pourcentage de DC-CD11c<sup>+</sup> contenant du matériel cellulaire marqué au CellTracker™ Orange CMRA provenant des cellules vivantes. Expérience représentative de trois (A) et de deux (B, C) expériences indépendantes.

## 2.6 Modèle de travail

Compte tenu des résultats que nous avons obtenus, nous pouvons affirmer que la capture d'antigènes provenant de cellules vivantes par les DC nécessite un contact cellulaire et ne dépend ni du *cross-dressing* ni des exosomes. Cette capture permet le transfert de molécules de grosse taille au sein de structures qui s'apparentent aux jonctions annulaires, mais ne nécessite pas la présence de la Cx43. De plus, l'expression de récepteurs de type scavenger par les DC et de la CRT par les cellules vivantes semble requise (Figure 10).



**Figure 10 : Modèle illustrant les différentes étapes et molécules impliquées dans le transfert de matériel provenant de cellules vivantes par les DC.**

## Discussion

Notre équipe avait précédemment montré que la présentation croisée d'antigènes provenant de cellules vivantes de mélanome (B16) par les DC induisait une forte protection contre l'implantation létale d'une tumeur dans un modèle d'immunisation de type prophylactique<sup>238</sup>. Lors de ma thèse, j'ai pu montrer que l'injection de DC chargées avec des cellules vivantes B16 protège également les souris dans un modèle de type thérapeutique. De plus, les DC mises en culture avec des cellules B16 vivantes induisent une protection bien plus efficace et une immunisation plus forte que celles chargées avec des cellules B16 apoptotiques. Nous avons donc voulu comprendre ce qui conférait aux cellules vivantes cette meilleure immunogénicité et par quels mécanismes ces dernières étaient capturées par les DC.

## **1 Les cellules vivantes comme source d'antigènes en immunothérapie anti-tumorale**

### **1.1 Qu'est-ce qui explique la meilleure immunogénicité des DC chargées avec des cellules vivantes ?**

La capacité des DC à déclencher une réponse lymphocytaire effectrice dépend à la fois de leur état de maturation mais également des cytokines qu'elles produisent. Parmi les cytokines clés produites par les DC, l'IL-12 est nécessaire à la polarisation de la réponse T vers un profil de type Th1, c'est-à-dire une immunité cellulaire qui favorise l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en lymphocytes T effecteurs cytotoxiques, permettant l'élimination des cellules infectées ou transformées. Au contraire, l'IL-10, principalement sécrétée par les DC et les cellules T régulatrices, est une cytokine plutôt tolérogène qui peut inhiber l'activation des lymphocytes T<sup>228</sup>. Ces deux cytokines jouent donc un rôle opposé dans le système immunitaire et c'est l'équilibre de leur production qui permet d'orienter une réponse vers une tolérance ou une immunité. Afin d'obtenir une réponse anti-tumorale, dans nos modèles d'immunisation, nous avons ajouté du LPS et de l'IFN $\gamma$ , afin de faire maturer les DC. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de différence significative en termes de niveau d'expression des molécules du CMH et de costimulation ou de production de l'IL-12 entre les DC mises en culture avec des cellules apoptotiques et celles mises en culture avec des cellules vivantes. Ceci témoigne que dans les deux cas, les DC sont fonctionnellement matures. En revanche, nous avons observé que les DC chargées avec des cellules B16

apoptotiques produisaient plus d'IL-10 que celles chargées avec des cellules B16 vivantes, ce qui pourrait leur conférer des propriétés tolérogènes.

Ces expériences montrent que les réponses observées en immunothérapie ne semblent pas être la conséquence d'une différence de maturation des DC lorsqu'elles sont cultivées avec des cellules apoptotiques ou vivantes, mais plutôt, au moins en partie, d'une différence de production d'IL-10 tolérogène.

L'état de conservation des antigènes est un paramètre très important en immunothérapie basée sur les DC puisque l'induction d'une réponse immunitaire T effectrice dépend de la quantité et de la qualité de l'antigène<sup>331</sup>. Ce paramètre est non seulement essentiel lors de la réponse primaire mais également pour l'induction d'un répertoire T le plus large possible et la mise en place d'une mémoire. Il a déjà été montré, dans un modèle tumoral de mélanome, que l'apoptose induit la dégradation et la perte de matériel antigénique<sup>334</sup>. En effet, dans cette étude, les auteurs montrent que l'antigène Melan-A est détruit par irradiation U.V. alors que d'autres antigènes, tels que gp100, sont conservés. Ici, nous avons montré par des expériences de western blot, que les antigènes (TRP2, gp100 et OVA) sont fortement dégradés dans les cellules apoptotiques, alors qu'ils sont conservés dans un état natif dans les cellules vivantes. Ainsi, dans les cellules vivantes, le protéome serait moins dégradé, ce qui leur permettrait de conserver le répertoire antigénique, favorisant une meilleure immunité. Au contraire, dans les cellules apoptotiques, le protéome serait plus altéré et la dégradation des antigènes pourrait avoir un impact sur la présentation croisée, la rendant moins efficace.

Il a été montré que les cellules apoptotiques sont une source d'antigènes prédigérés qui pouvaient emprunter la présentation croisée dans les DC<sup>229</sup>. De plus, dans le cadre de réponses anti-VIH, ces antigènes, dont la formation dépend de l'activité des caspases, participeraient à l'activation immunitaire systémique pendant la phase chronique de l'infection VIH<sup>335</sup>. Cependant, compte tenu de nos résultats, nous avons rapidement émis l'hypothèse que la dégradation des antigènes dans les cellules apoptotiques pouvait être responsable des différences observées entre les DC chargées par des cellules vivantes et celles chargées avec les cellules apoptotiques. Ainsi, dans une cellule apoptotique, la présence en moindre quantité d'antigènes disponibles pour les DC se traduirait par la formation d'un nombre plus faible de complexes CMH-I/peptide et donc une moins bonne efficacité de présentation croisée. Pour tester cette hypothèse, dans un premier temps, nous avons essayé d'évaluer la quantité de complexes CMH-I/SIINFEKL formés à la surface des DC chargées avec des cellules L-OVA vivantes ou apoptotiques à l'aide de l'anticorps 25-D1. En

nous fondant sur les travaux de Burgdorf *et al* en 2007<sup>336</sup>, nous avons vainement essayé de mesurer la formation de ce complexe en microscopie confocale. Nous n'avons pas rencontré plus de succès concernant l'utilisation de l'anticorps 25-D1 en cytométrie en flux. Les conseils pris dans d'autres laboratoires spécialisés montrent que nous ne sommes pas les seuls à avoir rencontré ces difficultés<sup>337</sup>. C'est pourquoi nous avons finalement réalisé des expériences fonctionnelles en dose/réponse avec des hybridomes T CD8<sup>+</sup> B3Z spécifiques du peptide SIINFEKL de l'OVA, et dont l'activation est indépendante des molécules de costimulation. Ces cellules nous ont permis d'évaluer indirectement le niveau d'expression des molécules du CMH-I complexées au peptide SIINFEKL. Ainsi, nous avons montré que le nombre de complexes CMH-I/SIINFEKL formés à la surface des DC était plus important avec les cellules vivantes qu'avec les cellules apoptotiques comme cellules donneuses d'antigènes.

## 1.2 La conservation des antigènes sous leur forme native : est-ce une bonne chose ?

Au vu des travaux de Blachère *et al* et de nos résultats, l'impact de la conservation de l'antigène sur la présentation croisée peut être envisagé selon deux scénarii. Dans le premier, la mort par apoptose pourrait fournir des antigènes prédigérés par les caspases, qui seraient « prêt à l'emploi » par la DC pour une activation rapide du système immunitaire<sup>135,229</sup>. Dans ce cas, les cellules apoptotiques sélectionneraient, dans une certaine mesure, les antigènes nécessaires à l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Dans le second scénario, les cellules vivantes fourniraient un large panel d'antigènes natifs, dont le correct apprêtement serait entièrement sous le contrôle de la DC. Cette notion est importante dans le cadre du cancer car certains épitopes ont un caractère immunodominant au début du développement tumoral mais peuvent être remplacés par d'autres épitopes au cours de l'évolution du cancer : on appelle ce phénomène « l'immunoediting »<sup>338</sup>. Dans ce contexte, il est concevable que la destruction de certains antigènes au début de la réponse immunitaire anti-tumorale puisse passer inaperçue, s'il s'agit d'antigènes non immunodominants, mais, au contraire, avoir des conséquences plus grave au cours de l'évolution de la maladie, s'ils deviennent immunodominants.

Ces deux scénarii dépendent de l'antigène dégradé. En effet, si l'épitope dominant contient un site de clivage par les caspases, la prédigestion de l'antigène sera mauvaise car celui-ci sera détruit. Au contraire, si l'épitope ne contient pas de site de clivage par les caspases, cela permettrait d'accélérer et d'améliorer la présentation croisée en fournissant

des antigènes rapidement aux DC. Cette prédigestion peut donc être positive dans le cas où une réponse rapide envers certains antigènes immunodominants est nécessaire. Cependant, elle peut s'avérer négative dans le cas où la diversification du répertoire est nécessaire pour contrecarrer l'immunoediting.

### 1.3 Cellules vivantes vs. cellules apoptotiques dans l'immunothérapie anti-tumorale

Jusqu'à récemment, seules les cellules apoptotiques étaient considérées comme une source d'antigènes cellulaires efficace pour la présentation croisée. Ainsi, les protocoles d'immunisation utilisant des DC chargées avec des cellules tumorales entières n'ont été réalisés qu'avec des cellules tumorales apoptotiques, négligeant la possibilité d'utiliser des cellules tumorales vivantes. Nous avons en effet observé dans nos expériences, que même si la réponse T CD8<sup>+</sup> anti-tumorale induite par les cellules apoptotiques via les DC était moins efficace que celle induite par les cellules vivantes, elles sont capables d'induire une protection contre la tumeur. Cela signifie donc que dans les cellules apoptotiques, une partie suffisante des épitopes ne sont pas ou peu dégradés, ou que la dégradation des antigènes permet au contraire d'optimiser leur apprêtement subséquent dans la DC. Cependant, tous les antigènes ne résistent pas à la mort cellulaire (apoptose ou nécrose), et moins la cellule contient de l'antigène (ou plus elle dégrade ses antigènes), moins elle sera une source d'antigène efficace pour la présentation antigénique. L'utilisation de cellules vivantes comme source d'antigène en immunothérapie serait donc très pertinente pour fournir des antigènes de bonne qualité et en grande quantité aux DC. La principale objection contre l'utilisation de cellules tumorales vivantes concerne leur caractère dangereux. En effet, l'utilisation de cellules apoptotiques dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale semble plus sécurisée que l'utilisation de cellules vivantes, dont il faut s'assurer qu'elles ne soient pas injectées avec les DC lors de l'immunisation. Pour éviter tout danger, dans notre étude, les DC ont été irradiées (gamma, 100 Gy) avant l'immunisation pour mettre hors d'état de nuire tous cellules tumorales vivantes contaminantes. Cette irradiation aurait pu compromettre leur cheminement vers les zones de stimulation des lymphocytes T, mais elle n'a pas empêché l'immunisation ni la protection.

L'utilisation de cellules vivantes comme source d'antigène devrait donc être prise en compte pour l'amélioration des protocoles d'immunothérapie, car les antigènes tumoraux natifs qu'elles fournissent peuvent être efficacement apprêtés par les DC spécialisées pour la présentation croisée. D'autres part, les traitements par chimiothérapie ou radiothérapie



sont actuellement poussés au maximum pour détruire la plus grande proportion possible de la tumeur, ce qui induit une morbidité importante. Si on considère l'immunogénicité des cellules vivantes, on pourrait envisager de traiter de façon moins drastique dans le but de mieux stimuler les réponses immunitaires. Des protocoles de ce type sont envisagés chez la souris pour la suite de ce projet.

Compte tenu de nos résultats, et du potentiel danger d'utiliser des cellules vivantes, il serait cependant utile de réévaluer les protocoles d'immunothérapie utilisés actuellement avec des cellules apoptotiques. En effet, il faudrait pouvoir évaluer l'impact des différents protocoles d'induction d'apoptose sur la dégradation des antigènes. L'immunogénicité d'une apoptose, recherché dans ces protocoles, pourrait être le reflet, non seulement de l'induction de signaux « eat-me » de type CRT<sup>98</sup>, mais aussi d'une meilleure conservation des antigènes.

## **2 Mécanisme de capture des cellules vivantes**

Nos expériences montrent que le transfert de matériel provenant de cellules vivantes est un phénomène actif qui nécessite un contact étroit avec les DC. Bien que la séparation des DC et des cellules vivantes à l'aide d'un transwell soit déjà un argument en défaveur de l'implication des exosomes, nous avons tout de même évalué plus directement le potentiel d'exosomes concentrés provenant du surnageant de cellules vivantes sur la présentation croisée. Ainsi, nous avons pu montrer que les exosomes ne pouvaient pas expliquer à eux seuls la présentation croisée d'antigènes cellulaires à partir de cellules vivantes. Cela ne signifie pas que les exosomes ne puissent être un mécanisme de transfert d'antigènes provenant de cellules vivantes en général, mais que cela n'est pas le cas dans notre modèle/système. Néanmoins, il est impératif que nous reproduisons cette unique expérience pour confirmer notre résultat. Nous pourrions également utiliser des shRNA dirigés contre les GTPases Rab7a et Rab7b dans les cellules donneuses d'antigènes, afin d'inhiber la sécrétion des exosomes<sup>339</sup>, et définitivement nous assurer qu'ils n'interviennent pas dans notre mécanisme.

## 2.1 Existe-t-il des « Annular Gap Junction » sans Cx43 ?

Les images obtenues en microscopie suggèrent le passage de molécules de grande taille au sein d'une structure qui pourrait s'apparenter aux jonctions annulaires (« *Annular Gap junction* »). En effet, nous avons observé le passage de matériel cellulaire sous une conformation native (protéine GFP de 70kDa) colocalisant partiellement avec le marqueur d'endosomes précoces EEA-1 dans la DC. De plus, nous avons observé la présence de la Cx43 au sein des vésicules d'internalisation contenant de la GFP, provenant des cellules vivantes. Nous avons donc recherché quel type de structure et de transfert de matériel entre deux cellules pouvait correspondre à ce que nous observions. Nous avons ainsi constaté que notre mécanisme d'acquisition de matériel cellulaire s'apparentait aux jonctions annulaires (*annular gap junction*)<sup>333</sup>. Une intervention des Cx43 était d'autant plus pertinente qu'il a été montré que le passage de peptides prédigérés (d'un poids maximal de 1,8 kDa) de la cellule donneuse vers la DC, via le canal étroit des jonctions gap, permettait leur présentation croisée<sup>133,135</sup>. La Cx43 étant présente dans nos structures, son implication possible dans la présentation croisée de cellules vivantes a été évaluée en inhibant son expression dans nos cellules donneuses d'antigènes à l'aide de shRNA spécifiques. Malgré ces faisceaux d'arguments en faveur d'une implication de la Cx43, nous avons observé qu'une réduction de 90% de son niveau d'expression dans les cellules L-OVA n'avait aucun effet sur la présentation croisée.

Ainsi, bien que la Cx43 soit présente dans les vésicules internalisées par les DC, elle ne semble pas indispensable pour la présentation croisée. Il est important de noter que nos études en imagerie ont été réalisées avec des cellules L dans lesquelles nous avons surexprimé la Cx3 couplée à une sonde fluorescente mCherry, ce qui pose la question du caractère physiologique de sa localisation dans les vésicules. En effet, le fait qu'elle soit exprimée fortement dans les cellules pourrait faciliter son transfert aspécifique vers la DC lors d'échange de matériel membranaire et cytosolique. Il ne peut donc être exclu que sans surexpression, physiologiquement, la Cx43 ne soit pas transférée aux DC. De plus, sa présence ne signifie pas qu'elle joue obligatoirement un rôle dans ce phénomène : elle peut être présente comme toutes autres molécules localisées à la membrane plasmique lors de l'accolement de deux cellules. Enfin, il est concevable que l'absence de la Cx43 puisse provoquer l'augmentation de l'expression d'une autre connexine, qui puisse se substituer à la Cx43.

Afin d'évaluer le rôle de la Cx43 dans un contexte plus physiologique, il serait intéressant de réaliser des expériences *in vivo*. Cependant, de telles études sont rendues difficiles par le fait que les souris déficientes pour la Cx43 ne sont pas viables en raison d'une déficience cardiaque létale. Nous pourrions cependant utiliser le modèle de souris chimériques développé par l'équipe de S. Taffet, dans lesquelles les cellules du foie fœtal (récupérées entre E12 et E14) provenant de fœtus Cx43<sup>+/+</sup>, Cx43<sup>+/-</sup> ou Cx43<sup>-/-</sup> sont injectées dans des souris sauvages irradiées létalement<sup>340</sup>. Après reconstitution du système immunitaire, nous pourrions générer des BMDC Cx43<sup>-/-</sup> qui seraient utilisées dans des expériences de capture d'antigènes et de présentation croisée. Ce modèle nous permettrait d'évaluer l'impact de l'extinction de la Cx43 sur la capture d'antigènes provenant de cellules vivantes par les DC et de confronter nos résultats à ceux de cette équipe, qui n'a montré aucune différence dans la capacité des macrophages Cx43<sup>-/-</sup> à faire de la phagocytose<sup>341</sup>.

L'absence d'effet de l'extinction de la Cx43 sur la présentation croisée indique que le mécanisme de transfert d'antigène que nous observons ne correspond pas *stricto sensu* aux jonctions annulaires à Cx43. Pour autant, est-il concevable qu'il puisse correspondre à un équivalent de « jonction annulaire » ne faisant pas intervenir les Cx43 ? Est-il possible qu'une telle structure, caractérisée par une double membrane plasmique, puisse se former indépendamment de la Cx43 ? Des études de microscopie électronique sont nécessaires pour vérifier s'il s'agit bien du même type de structure.

## 2.2 Quid des signaux « eat-me » et « don't eat-me »

Jusqu'à présent, nous avons utilisé des lignées de cellules immortalisées comme cellules donneuses d'antigènes. Or nous savons que les cellules tumorales expriment des molécules dont la glycosylation est altérée, ou encore des lipides oxydés ou acétylés. De plus, certaines lignées cellulaires vivantes peuvent exprimer, comme les cellules apoptotiques, à leur surface des molécules dites « eat-me » comme la calréticuline, normalement exprimée dans le réticulum endoplasmique. Ces signaux sont connus pour favoriser la liaison et la phagocytose des cellules apoptotiques par les DC ainsi que la présentation croisée<sup>98</sup>. A l'inverse, les signaux « don't eat-me » préviennent la phagocytose des cellules vivantes. La molécule CD47, ligand de SIRP- $\alpha$  sur les DC, est impliquée dans ces signaux<sup>97</sup>. Récemment, des travaux réalisés par le laboratoire de I.L. Weissman ont montré que l'expression de la calréticuline correspondait au signal pro-phagocytaire dominant sur de nombreuses cellules tumorales et qu'elle pouvait être contrebalancée par l'expression de CD47<sup>103</sup>. Différents travaux de ce laboratoire suggèrent également que le blocage de CD47 permet d'augmenter

la phagocytose des cellules tumorales et pourrait être envisagé comme approche thérapeutique<sup>104,105,106</sup>.

Je souhaite porter l'accent sur le fait qu'il est important de considérer que les lignées cellulaires vivantes que nous avons utilisées correspondent à des cellules vivantes « stressées ». La notion de stress, son impact sur l'expression des signaux « eat-me » et « don't eat-me » par la cellule vivante et sur leur capacité à fournir de l'antigène pour la présentation croisée seront abordés ultérieurement.

Nous nous sommes donc focalisés sur la CRT et CD47 afin d'évaluer l'impact éventuel de leur expression sur le transfert d'antigènes à partir de cellules vivantes. Nous avons tout d'abord montré que les cellules CCL-1 (équivalentes des cellules L) vivantes employées dans nos études exprimaient bien le CD47 et la calréticuline. Nous avons ensuite regardé l'effet du blocage de CD47 ou de la calréticuline sur le transfert de matériel provenant de cellules vivantes aux DC. Nous avons observé une inhibition du transfert de matériel lors de l'ajout d'un peptide bloquant dirigé contre la CRT. Par contre, et bien que les cellules CCL-1 expriment fortement CD47, nous n'avons pas observé d'effet de l'anticorps bloquant dirigé contre CD47 sur le transfert de matériel provenant de cellules vivantes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les cellules expriment des niveaux très élevés de CD47, rendant son blocage très difficile. De plus, les études réalisées par d'autres équipes afin d'étudier le rôle de CD47 sur la phagocytose ont été réalisées avec des macrophages et non avec des DC. Le blocage de CD47 pourrait être suffisant pour qu'un macrophage reconnaisse et capture une cellule, mais pas pour une DC. En effet, il existe d'autres signaux « eat-me » et « don't eat-me » tels que la PS et le CD31, respectivement, qui jouent probablement de concert lors de la reconnaissance d'une cellule apoptotique. Il est tout à fait concevable que bloquer un seul de ces signaux ne soit pas suffisant pour qu'une DC puisse reconnaître et capturer du matériel provenant d'une cellule vivante. Le blocage simultané de CD47 et CD31 permettrait peut-être une augmentation de la capture. Enfin, il est à noter qu'après discussion avec différents laboratoires s'intéressant à CD47, les résultats obtenus par l'équipe de I.L. Weisman s'avèrent difficilement reproductibles.

Dans notre étude, pour l'instant, nous n'avons évalué l'effet du blocage de la CRT et de CD47 qu'au niveau de la capture de matériel. Ayant trouvé un effet du blocage de la CRT sur cette capture, nous devons l'éprouver sur la présentation croisée.

## 2.3 Qu'en est-il des autres molécules ?

Quelles conclusions pouvons nous tirer des résultats obtenus avec les autres inhibiteurs ? L'utilisation de ces inhibiteurs nous a permis de montrer que ce phénomène dépendait (1) de la polymérisation de l'actine, protéine impliquée dans quasiment tous les modes d'endocytose ; (2) de l'action de la PI3 kinase, qui est également importante dans certaines formes d'endocytose<sup>342,343</sup> ; (3) en partie des récepteurs de type scavenger, qui sont très importants pour la phagocytose des cellules apoptotiques et le nibbling des cellules vivantes<sup>236,237</sup> et (4) dans une moindre mesure des Src kinases, qui sont importantes dans la phagocytose et l'endocytose des plaques de jonctions gap<sup>344</sup>.

Dans cette étude, nous n'avons pas pu inhiber entièrement la capture de matériel cellulaire provenant de cellules vivantes, ni trouver une protéine majoritairement responsable de ce phénomène, comme nous l'avions présumé avec la Cx43. Ceci suggère l'existence d'autres molécules et d'autres récepteurs pouvant être impliqués dans ce processus. L'endocytose, et plus particulièrement la phagocytose des cellules apoptotiques, est caractérisée par une redondance de différents récepteurs. En effet, de nombreuses molécules peuvent être impliquées : la PS, l'annexine V<sup>93</sup>, les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$ , le SR-B CD36<sup>122</sup>, la calréticuline<sup>97</sup> ou encore Clec9A<sup>117</sup>. Une seule de ces molécules ne peut expliquer à elle seule le mécanisme de capture, probablement parce qu'elles agissent en combinaison. En effet, la recherche de récepteurs impliqués dans la capture de cellules apoptotiques n'a jamais abouti à l'identification d'un récepteur responsable à lui seul de la capture. Il en est donc de même pour la capture de cellules vivantes. A l'image des récepteurs de type scavenger, la capture de matériel à partir de cellules apoptotiques et celle à partir de cellules vivantes impliquent probablement un certain nombre de molécules communes.

## 2.4 S'agit-il vraiment d'un nouveau mécanisme ?

### 2.4.1 S'agit-il de phagoptose ?

La reconnaissance de cellules vivantes par les macrophages a déjà été observée pour (1) les globules rouges âgés<sup>345</sup>, car ces cellules ne meurent pas mais expriment la PS et diminuent l'expression de leur CD47 lorsqu'ils sont âgés, (2) les neutrophiles, qui expriment constitutivement la CRT à leur surface<sup>346</sup> pouvant faciliter leur reconnaissance et leur capture et (3) les lymphocytes T activés, qui expriment la PS et peuvent ainsi être capturés par les macrophages afin de réguler la réponse immunitaire<sup>347</sup>. Dans ces différents cas, les cellules meurent à la suite de la capture par les macrophages : ce phénomène a donc été nommé « phagoptose »<sup>348</sup> pour mettre l'accent sur la capture de cellules vivantes, et non apoptotiques, ayant pour but la mort des cellules. Ce que nous observons pourrait s'apparenter à de la phagoptose au détail près que nos cellules donneuses d'antigènes restent vivantes. Ainsi, bien que certaines cellules vivantes puissent être reconnues et phagocytées par des macrophages *in vivo*, il ne s'agit probablement pas du même mécanisme observé dans notre étude.

### 2.4.2 S'agit-il de « nibbling » ?

Rien ne permet réellement de distinguer notre mécanisme du « nibbling », décrit et défini pas les travaux de S. Barrat-Boyes<sup>154,236</sup> (discuté dans l'introduction, chapitre 2.2.4 p.53). Ce que nos travaux apportent de nouveau par rapport à la définition classique du nibbling, c'est la notion de transfert de matériel **natif** d'une cellule vivante vers une DC, et la potentielle intervention, encore non démontrée, d'une jonction annulaire. Cela permet-il ou non de le différencier du nibbling...

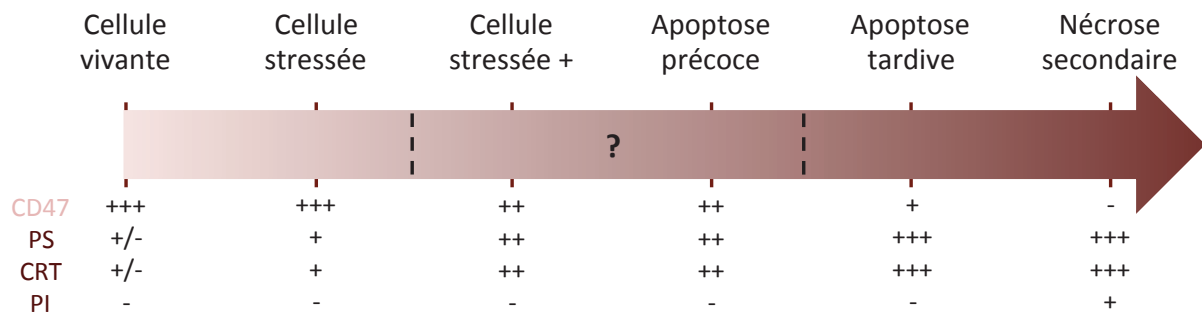
### 3 Les cellules vivantes et la réponse immunitaire

Le fait que les cellules vivantes puissent être une source d'antigènes soulève de nombreuses interrogations. Une des premières concerne le rôle physiologique du transfert de matériel antigénique provenant de cellules vivantes dans l'induction d'une immunogénicité ou d'une tolérance, une question jusqu'à présent adressée uniquement pour les cellules apoptotiques<sup>228,349</sup>. Aussi, sachant que les cellules ne sont pas des entités fixes et qu'elles peuvent se retrouver dans différents états, il est intéressant de définir ce qui permet à une cellule vivante de devenir une cellule donneuse d'antigènes. Nous verrons que la distinction entre une cellule vivante, stressée ou en pré-apoptose n'est pas si évidente. Enfin, nous pouvons aussi nous interroger sur le type de DC qui serait le plus efficace à capturer les cellules vivantes dans un contexte physiologique.

#### 3.1 De la cellule vivante à la cellule nécrotique : notion de continuum

Les cellules ne sont pas des entités fixes mais peuvent exister dans différents états (état d'équilibre, état d'activation, infection, transformation tumorale, activité métabolique intense, autophagie, etc.). L'état d'une cellule peut donc être envisagé comme un continuum allant de la cellule vivante « au repos » à la cellule apoptotique ou en nécrose secondaire en passant par la cellule « stressée ». L'un des moyens de juger de l'état d'une cellule est, entre autres, d'examiner l'état d'équilibre des signaux « eat-me » et « don't eat-me » qu'elle exhibe. Ainsi, une cellule soumise à un stress exprimera des signaux « eat-me » ou diminuera l'expression de ces signaux « don't eat-me », ce qui permettra sa reconnaissance. Cet état de stress persistant, le déséquilibre signaux « eat-me »/« don't eat-me » s'accroîtra et la cellule s'engagera dans l'apoptose si le stress cellulaire n'est pas irréversible. La Figure 1 représente les différents états que peut rencontrer une cellule lors de sa vie, ainsi que les signaux qui y sont associés. Cependant, les différents « paliers » gouvernant cette progression sont difficiles à délimiter car une cellule simplement stressée et une cellule pré-apoptotique peuvent exprimer les mêmes signaux de reconnaissance. Ainsi, comment distinguer une cellule « destinée » à mourir d'une cellule « simplement stressée » qui n'est pas engagée dans un processus de mort cellulaire ? On peut se demander où se situe le « point de non retour » à partir duquel la cellule est engagée dans un processus apoptotique.

Le passage d'une étape à l'autre est donc très difficile à évaluer et il existe une « zone d'ombre » dans laquelle on ne peut pas évaluer avec certitude si la cellule est stressée mais vouée à rester vivante ou stressée en pré-apoptose.



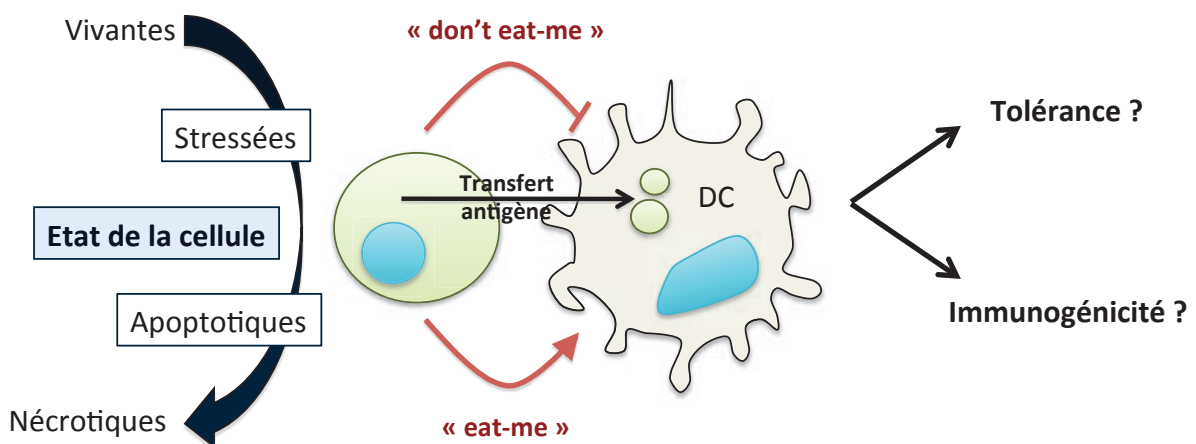
**Figure 1 : Continuum d'une cellule vivante à une cellule en nécrose secondaire.** Les cellules vivantes expriment fortement le CD47 afin d'éviter leur capture. Notons cependant que lors de leur activation les lymphocytes T, ou les neutrophiles peuvent exprimer la PS ou la CRT, respectivement. Lorsqu'une cellule est stressée (par un stress oxydatif par exemple), elle exprime dans un premier temps la PS puis la CRT. Lorsque la cellule est soumise à un stress plus important, suite à une infection bactérienne, ou lorsqu'elle entame un processus de transformation tumorale, l'expression de signaux « eat-me » va augmenter concomitamment avec la diminution des signaux « don't eat-me ». Si la cellule entre dans un processus d'apoptose, elle va alors redistribuer ces molécules de telle sorte que le CD47 soit exclu de la PS et de la CRT, facilitant ainsi la capture tout en étant entière. Finalement, si la cellule apoptotique n'est pas prise en charge par les phagocytes (suite à un défaut de recrutement ou à une inflammation incontrôlée), la cellule entre en nécrose secondaire et devient perméable. Les lignes pointillées représentent une zone d'ombre dans laquelle les cellules, bien qu'elles puissent être dans des états différents, ont une morphologie et une expression de signaux « eat-me » et « don't eat-me » similaire. Il est alors difficile de déterminer à quel moment la cellule « stressée » a atteint un point de non retour à partir duquel elle s'engage dans le processus d'apoptose.

### 3.2 Quelle pourrait être l'issue immunologique du transfert d'antigène à partir de cellules vivantes ?

Nous faisons l'hypothèse que le transfert d'antigène de cellules vivantes et la nature de la réponse immunitaire qui en découle, immunité ou tolérance, vont dépendre du niveau du stress des cellules donneuses d'antigènes et des signaux de danger associés. Le transfert d'antigène à partir de cellules en état d'équilibre pourrait être impliqué dans le maintien de la tolérance périphérique, par exemple au sein de tissus dans lesquels le taux d'apoptose est



faible. Inversement, si ce transfert est associé à un signal de danger/maturation, notamment infectieux (comme le LPS), il pourrait engendrer une réponse immunogène. Dans nos études d'immunisation, les expériences ont été effectuées avec des DC matures (stimulées par le LPS et  $IFN\gamma$ ), de façon à obtenir une activation des lymphocytes T  $CD8^+$  suffisante pour induire une réponse immunitaire efficace contre la tumeur. Il serait donc très intéressant de comparer le type de réponse, tolérogène (« cross-tolérance ») ou immunogène (« cross-priming »), obtenu avec des DC cultivées avec des cellules vivantes dans différents états (cellules non transformées comme les MEFs, cellules tumorales, cellules infectées, etc.). Nous voulons ainsi comprendre quels signaux sont nécessaires à une cellule vivante pour devenir donneuse d'antigène et rendre la DC immunogène (Figure 2). Comme nous l'avons vu, l'état de la cellule source d'antigène vivante influe très probablement sur l'état de l'antigène et la nature du signal délivré à la DC. Cet état devrait conduire à des voies d'apprêtement et de signalisation différentes, et donc à une polarisation différente des réponses T.



**Figure 2 : Etat de la cellule donneuse d'antigène et issue immunologique du transfert d'antigène.** La cellule donneuse d'antigène peut exister dans plusieurs états, allant de la cellule vivante « au repos » à la cellule apoptotique ou en nécrose secondaire en passant par la cellule « stressée ». Certains états pourraient favoriser la reconnaissance des cellules par les DC et donc le transfert d'antigènes, en rompant l'équilibre entre signaux « eat me » et « don't eat me ». L'état de la cellule pourrait également avoir une influence sur la nature de la réponse, immunité ou tolérance, qui découle du transfert de l'antigène et sa présentation par les DC.

### **3.2.1 Cellules vivantes et tolérance périphérique**

Il a été clairement démontré par de nombreuses équipes que la présentation croisée d'antigène provenant de cellules apoptotiques était un événement essentiel à l'établissement d'une tolérance périphérique<sup>233,350,351,352</sup>. Mais dans toutes ces études, l'hypothèse d'une participation des cellules vivantes a toujours été négligée. A titre d'exemple, l'équipe de T. Brocker a montré que des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> autoréactifs et fonctionnels s'accumulaient dans les ganglions de souris RIP-mOVA (exprimant l'OVA membranaire dans les cellules  $\beta$  du pancréas et les cellules rénales tubulaires) croisées avec les souris Rac1(N17) (exprimant un mutant négatif dominant de la GTPase Rac1 sous le contrôle du promoteur CD11c), qui présentent un défaut de capture de cellules mortes<sup>209,353</sup>. La présence de ces cellules, normalement éliminées, pourrait être délétère en cas d'inflammation car elles s'activeraient et pourraient ainsi être responsable du déclenchement d'une auto-immunité. Bien que Rac1 soit essentiel à la capture et à la présentation croisée de cellules apoptotiques<sup>353</sup>, rien ne permet d'exclure que cette GTPase intervienne également dans la capture de matériel vivant. En effet, Rac1 est associé à des récepteurs connus pour reconnaître les cellules apoptotiques (comme CD36 et les intégrines  $\alpha_V\beta_5$  et  $\alpha_V\beta_3$ ), mais pourrait aussi être associé à d'autres récepteurs impliqués aussi bien dans la capture de cellules apoptotiques que vivantes. L'injection d'une grande quantité de cellules apoptotiques dans cette étude pourrait très bien empêcher les DC de capturer des cellules vivantes et ainsi orienter la capture vers les cellules apoptotiques. Ainsi, il est tout à fait envisageable que des cellules vivantes des îlots de Langerhans puissent être capturées par les DC et les antigènes de ces cellules présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par présentation croisée, et ainsi contribuer à la tolérance périphérique.

### **3.2.2 Cellules vivantes et immunité**

Il est aujourd'hui admis que le système immunitaire intervient dans la surveillance des tumeurs. Comme nous l'avons rapidement vu, trois phases appuient l'hypothèse de l'immunoéditing : la phase de l'élimination, la phase d'équilibre et la phase d'échappement. La phase d'élimination n'a encore jamais été observée *in vivo* et les mécanismes alertant le système immunitaire de la présence d'une cellule tumorale en développement sont encore mal connus. Pour le moment trois mécanismes principaux ont été retenus comme ayant un rôle important lors de cette phase : il s'agit (1) du relargage d'IFN de type I dès les phases précoces du développement de la tumeur, qui permet l'activation des DC et l'activation du système immunitaire ; (2) de la présence de DAMPs sécrétés directement par les cellules

tumorales mourantes ou par les tissus endommagés environnant ; et (3) de ligands de stress (RAE-1 et H60 chez la souris ou MICA/B chez l'Homme) exprimés par les cellules tumorales et qui permettent l'activation de certaines cellules de l'immunité innée et favorisent en retour un environnement inflammatoire facilitant le développement d'une réponse adaptative anti-tumorale<sup>279</sup>. Ces deux derniers mécanismes suggèrent fortement que les cellules tumorales vont mourir sous l'action des cellules de l'immunité innée comme les NK par exemple, puis être prises en charge par les DC pour une activation efficace du système immunitaire.

Lorsque ces mécanismes ont été explorés, la présentation croisée d'antigènes provenant de cellules vivantes n'avait pas encore été démontrée. Or, sachant que cette présentation est aussi efficace, voire meilleure, que celle à partir de cellules apoptotiques, on peut tout à fait imaginer que les cellules tumorales en début de développement, qui peuvent exprimer des molécules de stress, puissent être capturées par les DC lorsqu'elles sont encore vivantes. La capture de matériel provenant de cellules tumorales vivantes pourrait ainsi contribuer à la présentation croisée d'antigènes tumoraux et donc à l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques permettant l'élimination de la tumeur, lors de la première phase d'élimination. Ainsi, les DC n'auraient pas « à attendre » que la cellule tumorale meure pour que le système immunitaire se mette en place. Ces cellules tumorales vivantes auraient donc ici un potentiel immunogène vis-à-vis du système immunitaire. Cette hypothèse, comme les précédentes, est difficile à évaluer *in vivo*, mais reste plausible en vue des études de notre équipe sur l'importance des cellules vivantes comme source d'antigènes<sup>238,329</sup>.

Dans le cadre d'une infection intracellulaire, et de manière un peu finaliste, on peut imaginer que le système immunitaire n'attende pas que les cellules infectées soient lysées par le pathogène pour le reconnaître et établir une réponse immunitaire dirigée contre lui. L'infection et/ou le stress cellulaire qui en résulte pourrait ainsi induire l'expression de molécules du pathogène ou des signaux « eat-me » favorisant la reconnaissance et la capture par les DC de matériel de cellules vivantes infectées. Ainsi, l'équipe de J. Plumas a montré que des pDC étaient capables de capturer et présenter aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> des antigènes viraux provenant de lymphocytes B vivants infectés par le virus de la grippe<sup>239</sup>.

### 3.3 Existe-t-il un type de DC spécialisé dans la présentation croisée d'antigène provenant de cellules vivantes ?

Comme nous l'avons vu, les DC  $CD8\alpha^+$  sont les DC spécialisées dans la présentation croisée d'antigènes provenant de cellules apoptotiques<sup>35,252</sup>. Puisque les cellules vivantes sont également une source d'antigènes pour la présentation croisée, on peut se demander si les DC  $CD8\alpha^+$  sont également spécialisées dans leur présentation, ou bien si d'autres DC, telles que les pDC ou les DC migratoires  $CD103^+$  sont également capables de capturer du matériel provenant de cellules vivantes. A l'instar des DC spécialisées dans la présentation croisée à partir de cellules apoptotiques, un type de DC pourrait être spécialisé dans la capture de cellules vivantes, mais d'autres types pourraient en être capables sous certaine condition, comme lors d'une inflammation par exemple. Des expériences complémentaires, utilisant les différents sous types de DC cultivés avec des cellules vivantes en présence de différents stimuli permettront de répondre à cette question.

## Bibliographie

1. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 1973, **137**(5): 1142-1162.
2. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *The Journal of experimental medicine* 1974, **139**(2): 380-397.
3. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *The Journal of experimental medicine* 1974, **139**(6): 1431-1445.
4. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978, **75**(10): 5132-5136.
5. Inaba K, Steinman RM. Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *The Journal of experimental medicine* 1984, **160**(6): 1717-1735.
6. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual review of immunology* 2005, **23**: 975-1028.
7. Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annual review of immunology* 1997, **15**: 821-850.
8. Itano AA, Jenkins MK. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature immunology* 2003, **4**(8): 733-739.
9. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 1999, **17**: 593-623.
10. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nature reviews Immunology* 2005, **5**(8): 606-616.
11. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature reviews Immunology* 2005, **5**(8): 617-628.
12. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunological reviews* 1997, **156**: 25-37.
13. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews Immunology* 2002, **2**(3): 151-161.
14. Guilliams M, Henri S, Tamoutounour S, Ardouin L, Schwartz-Cornil I, Dalod M, *et al.* From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *European journal of immunology* 2010, **40**(8): 2089-2094.

15. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews Immunology* 2012, **12**(8): 557-569.
16. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology* 2013, **31**: 563-604.
17. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunological reviews* 2010, **234**(1): 45-54.
18. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(7): 543-555.
19. Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological reviews* 2010, **234**(1): 120-141.
20. Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, *et al.* Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature immunology* 2002, **3**(12): 1135-1141.
21. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhe C, Perrin P, Romani N, *et al.* Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 2005, **22**(5): 643-654.
22. Bennett CL, van Rijn E, Jung S, Inaba K, Steinman RM, Kapsenberg ML, *et al.* Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *The Journal of cell biology* 2005, **169**(4): 569-576.
23. Kushwah R, Hu J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* 2011, **133**(4): 409-419.
24. Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devilard E, Kissenpfennig A, Malissen B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(13): 3119-3131.
25. Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH, *et al.* Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(13): 3147-3156.
26. Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, *et al.* The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *The Journal of experimental medicine* 2009, **206**(13): 3115-3130.
27. Villadangos JA, Heath WR. Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Seminars in immunology* 2005, **17**(4): 262-272.

28. Walton KL, He J, Kelsall BL, Sartor RB, Fisher NC. Dendritic cells in germ-free and specific pathogen-free mice have similar phenotypes and in vitro antigen presenting function. *Immunology letters* 2006, **102**(1): 16-24.
29. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, *et al.* Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nature immunology* 2009, **10**(5): 488-495.
30. Edelson BT, Kc W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, *et al.* Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(4): 823-836.
31. Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *Journal of immunology* 2000, **164**(6): 2978-2986.
32. Idoyaga J, Suda N, Suda K, Park CG, Steinman RM. Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(5): 1524-1529.
33. Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ, Heath WR, *et al.* Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 2003, **102**(6): 2187-2194.
34. Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, *et al.* The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *Journal of immunology* 2000, **165**(12): 6762-6770.
35. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2000, **192**(12): 1685-1696.
36. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpheller C, Yamazaki S, *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 2007, **315**(5808): 107-111.
37. Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* 2007, **26**(4): 519-531.
38. Dominguez PM, Ardavin C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunological reviews* 2010, **234**(1): 90-104.
39. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(1): 19-30.



40. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* 1994, **179**(4): 1109-1118.
41. Asselin-Paturel C, Brizard G, Chemin K, Boonstra A, O'Garra A, Vicari A, *et al.* Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(7): 1157-1167.
42. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual review of immunology* 2011, **29**: 163-183.
43. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature immunology* 2001, **2**(12): 1144-1150.
44. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008, **29**(3): 352-361.
45. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, *et al.* BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of immunology* 2000, **165**(11): 6037-6046.
46. Lindstedt M, Lundberg K, Borrebaeck CA. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *Journal of immunology* 2005, **175**(8): 4839-4846.
47. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002, **100**(13): 4512-4520.
48. Nascimbeni M, Perie L, Chorro L, Diocou S, Kreitmann L, Louis S, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression. *Blood* 2009, **113**(24): 6112-6119.
49. Robbins SH, Walzer T, Dembele D, Thibault C, Defays A, Bessou G, *et al.* Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome biology* 2008, **9**(1): R17.
50. Bachem A, Guttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, *et al.* Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(6): 1273-1281.
51. Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre CA, Ventre E, *et al.* The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(6): 1283-1292.

52. Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, *et al.* Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(6): 1247-1260.
53. Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen JL, *et al.* Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(6): 1261-1271.
54. Poulin LF, Reyat Y, Uronen-Hansson H, Schraml BU, Sancho D, Murphy KM, *et al.* DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood* 2012, **119**(25): 6052-6062.
55. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *The New England journal of medicine* 2000, **343**(5): 338-344.
56. Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity. *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(6): 447-456.
57. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature reviews Microbiology* 2004, **2**(10): 820-832.
58. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annual review of immunology* 2005, **23**: 275-306.
59. O'Neill LA. Immunity's early-warning system. *Scientific American* 2005, **292**(1): 24-31.
60. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005, **106**(7): 2252-2258.
61. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, **392**(6673): 245-252.
62. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews Immunology* 2010, **10**(4): 248-256.
63. Wilson NS, Villadangos JA. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunology and cell biology* 2004, **82**(1): 91-98.
64. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology* 2002, **20**: 621-667.
65. MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Uguccioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, *et al.* Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *The Journal of experimental medicine* 2003, **198**(4): 615-621.

66. Wilson NS, Villadangos JA. Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Advances in immunology* 2005, **86**: 241-305.
67. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual review of immunology* 1991, **9**: 271-296.
68. Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Gause WC, Morris SC. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *Journal of immunology* 1996, **157**(4): 1406-1414.
69. Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nature immunology* 2001, **2**(11): 1010-1017.
70. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(6): 476-483.
71. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(12): 964-974.
72. Henson PM, Hume DA. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends in immunology* 2006, **27**(5): 244-250.
73. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature reviews Immunology* 2002, **2**(12): 965-975.
74. Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *Journal of leukocyte biology* 2006, **79**(5): 896-903.
75. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Molecular cell* 2004, **14**(3): 277-287.
76. Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(9): 1807-1817.
77. Elliott MR, Cheken FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009, **461**(7261): 282-286.
78. Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, *et al.* Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008, **22**(8): 2629-2638.
79. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, *et al.* Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 2003, **113**(6): 717-730.

80. Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, Pound JD, Wilkinson SJ, Dumitriu IE, *et al.* CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* 2008, **112**(13): 5026-5036.
81. Ravichandran KS. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 2011, **35**(4): 445-455.
82. Peter C, Waibel M, Radu CG, Yang LV, Witte ON, Schulze-Osthoff K, *et al.* Migration to apoptotic "find-me" signals is mediated via the phagocyte receptor G2A. *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(9): 5296-5305.
83. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology* 1992, **148**(7): 2207-2216.
84. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(42): 26159-26165.
85. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(2): 1071-1077.
86. Kobayashi N, Karisola P, Pena-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, *et al.* TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 2007, **27**(6): 927-940.
87. Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 2007, **450**(7168): 435-439.
88. Park D, Tosello-Tramont AC, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, *et al.* BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 2007, **450**(7168): 430-434.
89. de Freitas A, Banerjee S, Xie N, Cui H, Davis KI, Friggeri A, *et al.* Identification of TLT2 as an Engulfment Receptor for Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology* 2012, **188**(12): 6381-6388.
90. Borisenko GG, Iverson SL, Ahlberg S, Kagan VE, Fadeel B. Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) binds to oxidized phosphatidylserine: implications for macrophage clearance of apoptotic cells. *Cell death and differentiation* 2004, **11**(8): 943-945.
91. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002, **417**(6885): 182-187.

92. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, *et al.* Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 2001, **411**(6834): 207-211.
93. Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death and differentiation* 2008, **15**(2): 243-250.
94. Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, *et al.* Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Developmental cell* 2003, **4**(4): 587-598.
95. Martins I, Kepp O, Galluzzi L, Senovilla L, Schlemmer F, Adjemian S, *et al.* Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010, **1209**: 77-82.
96. Torr EE, Gardner DH, Thomas L, Goodall DM, Bielemeier A, Willetts R, *et al.* Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells. *Cell death and differentiation* 2012, **19**(4): 671-679.
97. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, *et al.* Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 2005, **123**(2): 321-334.
98. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature medicine* 2007, **13**(1): 54-61.
99. Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 2002, **418**(6894): 200-203.
100. Vernon-Wilson EF, Aurade F, Tian L, Rowe IC, Shipston MJ, Savill J, *et al.* CD31 delays phagocyte membrane repolarization to promote efficient binding of apoptotic cells. *Journal of leukocyte biology* 2007, **82**(5): 1278-1288.
101. Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, *et al.* CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nature medicine* 1999, **5**(11): 1277-1284.
102. Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000, **288**(5473): 2051-2054.
103. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, *et al.* Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Science translational medicine* 2010, **2**(63): 63ra94.
104. Edris B, Weiskopf K, Volkmer AK, Volkmer JP, Willingham SB, Contreras-Trujillo H, *et al.* Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive

- metastatic leiomyosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(17): 6656-6661.
105. Tseng D, Volkmer JP, Willingham SB, Contreras-Trujillo H, Fathman JW, Fernhoff NB, *et al.* Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013.
  106. Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, *et al.* The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(17): 6662-6667.
  107. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1989, **54 Pt 1**: 1-13.
  108. Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nature reviews Immunology* 2011, **11**(12): 807-822.
  109. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 1994, **12**: 991-1045.
  110. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature reviews Immunology* 2008, **8**(4): 279-289.
  111. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2012, **12**(12): 860-875.
  112. Zelenay S, Reis ESC. Adaptive immunity after cell death. *Trends in immunology* 2013.
  113. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010, **140**(6): 805-820.
  114. Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current opinion in immunology* 2008, **20**(5): 530-537.
  115. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2009, **9**(7): 465-479.
  116. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Sousa CRe. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nature immunology* 2006, **7**(12): 1258-1265.
  117. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernanz-Falcon P, *et al.* Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 2009, **458**(7240): 899-903.

118. Ahrens S, Zelenay S, Sancho D, Hanc P, Kjaer S, Feest C, *et al.* F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity* 2012, **36**(4): 635-645.
119. Zhang JG, Czabotar PE, Policheni AN, Caminschi I, Wan SS, Kitsoulis S, *et al.* The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity* 2012, **36**(4): 646-657.
120. Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* 2005, **182**(1): 1-15.
121. Grolleau A, Misek DE, Kuick R, Hanash S, Mule JJ. Inducible expression of macrophage receptor Marco by dendritic cells following phagocytic uptake of dead cells uncovered by oligonucleotide arrays. *Journal of immunology* 2003, **171**(6): 2879-2888.
122. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, *et al.* Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 1998, **188**(7): 1359-1368.
123. Oka K, Sawamura T, Kikuta K, Itokawa S, Kume N, Kita T, *et al.* Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(16): 9535-9540.
124. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, **124**(4): 783-801.
125. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006, **442**(7098): 39-44.
126. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, *et al.* LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(4): 1512-1517.
127. Gupta G, Surolia A. Collectins: sentinels of innate immunity. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2007, **29**(5): 452-464.
128. Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, *et al.* Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *European journal of immunology* 2003, **33**(10): 2853-2863.
129. Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, Jeannin P, Manfredi A, Mantovani A. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Current opinion in immunology* 2006, **18**(1): 10-15.

130. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003, **422**(6927): 37-44.
131. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2010, **145**(3): 182-195.
132. Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nature reviews Molecular cell biology* 2003, **4**(4): 285-294.
133. Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 2005, **434**(7029): 83-88.
134. Neijssen J, Pang B, Neefjes J. Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Progress in biophysics and molecular biology* 2007, **94**(1-2): 207-218.
135. Pang B, Neijssen J, Qiao X, Janssen L, Janssen H, Lippuner C, *et al.* Direct antigen presentation and gap junction mediated cross-presentation during apoptosis. *Journal of immunology* 2009, **183**(2): 1083-1090.
136. Matsue H, Yao J, Matsue K, Nagasaka A, Sugiyama H, Aoki R, *et al.* Gap junction-mediated intercellular communication between dendritic cells (DCs) is required for effective activation of DCs. *Journal of immunology* 2006, **176**(1): 181-190.
137. Elgueta R, Tobar JA, Shoji KF, De Calisto J, Kalergis AM, Bono MR, *et al.* Gap junctions at the dendritic cell-T cell interface are key elements for antigen-dependent T cell activation. *Journal of immunology* 2009, **183**(1): 277-284.
138. Mendoza-Naranjo A, Saez PJ, Johansson CC, Ramirez M, Mandakovic D, Pereda C, *et al.* Functional gap junctions facilitate melanoma antigen transfer and cross-presentation between human dendritic cells. *Journal of immunology* 2007, **178**(11): 6949-6957.
139. Benlalam H, Jalil A, Hasmim M, Pang B, Tamouza R, Mitterrand M, *et al.* Gap junction communication between autologous endothelial and tumor cells induce cross-recognition and elimination by specific CTL. *Journal of immunology* 2009, **182**(5): 2654-2664.
140. Benlalam H, Carre T, Jalil A, Noman Z, Caillou B, Vielh P, *et al.* Regulation of gap junctions in melanoma and their impact on Melan-A/MART-1-specific CD8 T lymphocyte emergence. *Journal of molecular medicine* 2013.
141. Saccheri F, Pozzi C, Avogadri F, Barozzi S, Faretta M, Fusi P, *et al.* Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. *Science translational medicine* 2010, **2**(44): 44ra57.



142. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology* 2002, **2**(8): 569-579.
143. Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F. Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunological reviews* 2013, **251**(1): 125-142.
144. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Thery C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 2011, **12**(12): 1659-1668.
145. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 2007, **110**(9): 3234-3244.
146. Walker JD, Maier CL, Pober JS. Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *Journal of immunology* 2009, **182**(3): 1548-1559.
147. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, *et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature medicine* 2001, **7**(3): 297-303.
148. Dai S, Wan T, Wang B, Zhou X, Xiu F, Chen T, *et al.* More efficient induction of HLA-A\*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005, **11**(20): 7554-7563.
149. Dai S, Zhou X, Wang B, Wang Q, Fu Y, Chen T, *et al.* Enhanced induction of dendritic cell maturation and HLA-A\*0201-restricted CEA-specific CD8(+) CTL response by exosomes derived from IL-18 gene-modified CEA-positive tumor cells. *Journal of molecular medicine* 2006, **84**(12): 1067-1076.
150. Joly E, Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nature immunology* 2003, **4**(9): 815.
151. Hudrisier D, Riond J, Mazarguil H, Gairin JE, Joly E. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *Journal of immunology* 2001, **166**(6): 3645-3649.
152. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001, **15**(5): 751-761.
153. Huang JF, Yang Y, Sepulveda H, Shi W, Hwang I, Peterson PA, *et al.* TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science* 1999, **286**(5441): 952-954.

154. Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *Journal of immunology* 2001, **166**(6): 3717-3723.
155. Dolan BP, Gibbs KD, Jr., Ostrand-Rosenberg S. Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8+ T cells. *Journal of immunology* 2006, **177**(9): 6018-6024.
156. Dolan BP, Gibbs KD, Jr., Ostrand-Rosenberg S. Tumor-specific CD4+ T cells are activated by "cross-dressed" dendritic cells presenting peptide-MHC class II complexes acquired from cell-based cancer vaccines. *Journal of immunology* 2006, **176**(3): 1447-1455.
157. Wakim LM, Bevan MJ. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature* 2011, **471**(7340): 629-632.
158. Suri A, Lovitch SB, Unanue ER. The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. *Current opinion in immunology* 2006, **18**(1): 70-77.
159. Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DA, Lane WS, Strominger JL. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *The Journal of experimental medicine* 1993, **178**(1): 27-47.
160. Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, Shabanowitz J, Cox AL, Sakaguchi K, *et al.* Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* 1992, **256**(5065): 1817-1820.
161. Rudensky A, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA, Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991, **353**(6345): 622-627.
162. Dongre AR, Kovats S, deRoos P, McCormack AL, Nakagawa T, Paharkova-Vatchkova V, *et al.* In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *European journal of immunology* 2001, **31**(5): 1485-1494.
163. Bozzacco L, Yu H, Zebroski HA, Dengjel J, Deng H, Mojsov S, *et al.* Mass spectrometry analysis and quantitation of peptides presented on the MHC II molecules of mouse spleen dendritic cells. *Journal of proteome research* 2011, **10**(11): 5016-5030.
164. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Muller M, *et al.* Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(22): 7922-7927.
165. Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW, *et al.* Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *European journal of immunology* 2003, **33**(5): 1250-1259.

166. Busch R, Doebele RC, Patil NS, Pashine A, Mellins ED. Accessory molecules for MHC class II peptide loading. *Current opinion in immunology* 2000, **12**(1): 99-106.
167. Neefjes J, Jongasma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews Immunology* 2011, **11**(12): 823-836.
168. Viville S, Neefjes J, Lotteau V, Dierich A, Lemeur M, Ploegh H, *et al.* Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 1993, **72**(4): 635-648.
169. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 1990, **345**(6276): 615-618.
170. Bodmer H, Viville S, Benoist C, Mathis D. Diversity of endogenous epitopes bound to MHC class II molecules limited by invariant chain. *Science* 1994, **263**(5151): 1284-1286.
171. Bikoff EK, Huang LY, Episkopou V, van Meerwijk J, Germain RN, Robertson EJ. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *The Journal of experimental medicine* 1993, **177**(6): 1699-1712.
172. Hofmann MW, Honing S, Rodionov D, Dobberstein B, von Figura K, Bakke O. The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(51): 36153-36158.
173. Arunachalam B, Phan UT, Geuze HJ, Cresswell P. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(2): 745-750.
174. van den Hoorn T, Paul P, Jongasma ML, Neefjes J. Routes to manipulate MHC class II antigen presentation. *Current opinion in immunology* 2011, **23**(1): 88-95.
175. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991, **349**(6311): 669-676.
176. Conus S, Simon HU. Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss medical weekly* 2010, **140**: w13042.
177. Hsieh CS, deRoos P, Honey K, Beers C, Rudensky AY. A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. *Journal of immunology* 2002, **168**(6): 2618-2625.

178. Manoury B, Hewitt EW, Morrice N, Dando PM, Barrett AJ, Watts C. An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature* 1998, **396**(6712): 695-699.
179. Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 2003, **299**(5611): 1400-1403.
180. Rocha N, Neefjes J. MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *The EMBO journal* 2008, **27**(1): 1-5.
181. Sanderson F, Kleijmeer MJ, Kelly A, Verwoerd D, Tulp A, Neefjes JJ, *et al.* Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 1994, **266**(5190): 1566-1569.
182. Anders AK, Call MJ, Schulze MS, Fowler KD, Schubert DA, Seth NP, *et al.* HLA-DM captures partially empty HLA-DR molecules for catalyzed removal of peptide. *Nature immunology* 2011, **12**(1): 54-61.
183. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995, **82**(1): 155-165.
184. Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E, *et al.* Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 1995, **375**(6534): 802-806.
185. Kropshofer H, Vogt AB, Moldenhauer G, Hammer J, Blum JS, Hammerling GJ. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *The EMBO journal* 1996, **15**(22): 6144-6154.
186. Guce AI, Mortimer SE, Yoon T, Painter CA, Jiang W, Mellins ED, *et al.* HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism. *Nature structural & molecular biology* 2013, **20**(1): 90-98.
187. Yewdell JW, Anton LC, Bennink JR. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *Journal of immunology* 1996, **157**(5): 1823-1826.
188. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000, **404**(6779): 770-774.
189. Yewdell JW. DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends in immunology* 2011, **32**(11): 548-558.
190. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature reviews Immunology* 2008, **8**(8): 607-618.
191. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annual review of immunology* 2013, **31**: 443-473.

192. Kunisawa J, Shastri N. Hsp90alpha chaperones large C-terminally extended proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway. *Immunity* 2006, **24**(5): 523-534.
193. Kunisawa J, Shastri N. The group II chaperonin TRiC protects proteolytic intermediates from degradation in the MHC class I antigen processing pathway. *Molecular cell* 2003, **12**(3): 565-576.
194. Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunological reviews* 2005, **207**: 19-30.
195. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, *et al.* Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994, **78**(5): 761-771.
196. Sijts EJ, Kloetzel PM. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2011, **68**(9): 1491-1502.
197. Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, *et al.* An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 2004, **304**(5670): 587-590.
198. Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijfhout JW, *et al.* A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* 2004, **20**(4): 495-506.
199. York IA, Bhutani N, Zendzian S, Goldberg AL, Rock KL. Tripeptidyl peptidase II is the major peptidase needed to trim long antigenic precursors, but is not required for most MHC class I antigen presentation. *Journal of immunology* 2006, **177**(3): 1434-1443.
200. Kessler JH, Khan S, Seifert U, Le Gall S, Chow KM, Paschen A, *et al.* Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nature immunology* 2011, **12**(1): 45-53.
201. Kawahara M, York IA, Hearn A, Farfan D, Rock KL. Analysis of the role of tripeptidyl peptidase II in MHC class I antigen presentation in vivo. *Journal of immunology* 2009, **183**(10): 6069-6077.
202. Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 2002, **419**(6906): 480-483.
203. York IA, Chang SC, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL, *et al.* The ER aminopeptidase ERAAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nature immunology* 2002, **3**(12): 1177-1184.

204. Androlewicz MJ, Cresswell P. How selective is the transporter associated with antigen processing? *Immunity* 1996, **5**(1): 1-5.
205. van Endert PM, Tampe R, Meyer TH, Tisch R, Bach JF, McDevitt HO. A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* 1994, **1**(6): 491-500.
206. Wearsch PA, Cresswell P. The quality control of MHC class I peptide loading. *Current opinion in cell biology* 2008, **20**(6): 624-631.
207. Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunological reviews* 2005, **207**: 145-157.
208. Davey GM, Kurts C, Miller JF, Bouillet P, Strasser A, Brooks AG, *et al.* Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *The Journal of experimental medicine* 2002, **196**(7): 947-955.
209. Luckashenak N, Schroeder S, Endt K, Schmidt D, Mahnke K, Bachmann MF, *et al.* Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8+ T cell tolerance in vivo. *Immunity* 2008, **28**(4): 521-532.
210. Bevan MJ. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *Journal of immunology* 1976, **117**(6): 2233-2238.
211. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *The Journal of experimental medicine* 1976, **143**(5): 1283-1288.
212. Rock KL, Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunological reviews* 2005, **207**: 166-183.
213. Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995, **269**(5230): 1585-1588.
214. Udono H, Srivastava PK. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *The Journal of experimental medicine* 1993, **178**(4): 1391-1396.
215. Binder RJ, Srivastava PK. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nature immunology* 2005, **6**(6): 593-599.
216. Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J, Haeuw J, Aubry J, Nakamura K, *et al.* Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 2002, **17**(3): 353-362.

217. de Jong JM, Schuurhuis DH, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Ossendorp F, *et al.* Murine Fc receptors for IgG are redundant in facilitating presentation of immune complex derived antigen to CD8+ T cells in vivo. *Molecular immunology* 2006, **43**(13): 2045-2050.
218. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Theyry C, Rescigno M, *et al.* Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *The Journal of experimental medicine* 1999, **189**(2): 371-380.
219. Giodini A, Rahner C, Cresswell P. Receptor-mediated phagocytosis elicits cross-presentation in nonprofessional antigen-presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(9): 3324-3329.
220. den Haan JM, Bevan MJ. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2002, **196**(6): 817-827.
221. Baker K, Rath T, Lencer WI, Fiebiger E, Blumberg RS. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2013, **70**(8): 1319-1334.
222. Kovacsovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(11): 4942-4946.
223. Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 2004, **21**(2): 155-165.
224. Falo LD, Jr., Kovacsovics-Bankowski M, Thompson K, Rock KL. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nature medicine* 1995, **1**(7): 649-653.
225. Andre F, Chaput N, Scharz NE, Flament C, Aubert N, Bernard J, *et al.* Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *Journal of immunology* 2004, **172**(4): 2126-2136.
226. Shen L, Rock KL. Cellular protein is the source of cross-priming antigen in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(9): 3035-3040.
227. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998, **392**(6671): 86-89.

228. Albert ML. Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? *Nature reviews Immunology* 2004, **4**(3): 223-231.
229. Blachere NE, Darnell RB, Albert ML. Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS biology* 2005, **3**(6): e185.
230. Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF, Heath WR. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* 1997, **186**(2): 239-245.
231. Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Miller JF, Jones C, Lejon K, *et al.* The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *The Journal of experimental medicine* 2002, **196**(8): 1099-1104.
232. Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, *et al.* The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2002, **195**(10): 1289-1302.
233. Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *The Journal of experimental medicine* 2002, **196**(8): 1091-1097.
234. Griffith TS, Kazama H, VanOosten RL, Earle JK, Jr., Herndon JM, Green DR, *et al.* Apoptotic cells induce tolerance by generating helpless CD8+ T cells that produce TRAIL. *Journal of immunology* 2007, **178**(5): 2679-2687.
235. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, *et al.* Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nature medicine* 2003, **9**(8): 1039-1046.
236. Harshyne LA, Zimmer MI, Watkins SC, Barratt-Boyes SM. A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *Journal of immunology* 2003, **170**(5): 2302-2309.
237. Maranon C, Desoutter JF, Hoeffel G, Cohen W, Hanau D, Hosmalin A. Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(16): 6092-6097.
238. Matheoud D, Perie L, Hoeffel G, Vimeux L, Parent I, Maranon C, *et al.* Cross-presentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo. *Blood* 2010, **115**(22): 4412-4420.
239. Lui G, Manches O, Angel J, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS one* 2009, **4**(9): e7111.



240. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995, **267**(5195): 243-246.
241. Burgdorf S, Scholz C, Kautz A, Tampe R, Kurts C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nature immunology* 2008, **9**(5): 558-566.
242. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003, **425**(6956): 397-402.
243. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, *et al.* Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 2003, **425**(6956): 402-406.
244. Firat E, Saveanu L, Aichele P, Staeheli P, Huai J, Gaedicke S, *et al.* The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *Journal of immunology* 2007, **178**(4): 2241-2248.
245. Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, Guermonprez P, Firat E, Lindo V, *et al.* IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* 2009, **325**(5937): 213-217.
246. Cebrian I, Visentin G, Blanchard N, Jouve M, Bobard A, Moita C, *et al.* Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 2011, **147**(6): 1355-1368.
247. Lin ML, Zhan Y, Proietto AI, Prato S, Wu L, Heath WR, *et al.* Selective suicide of cross-presenting CD8<sup>+</sup> dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(8): 3029-3034.
248. Imai T, Kato Y, Kajiwara C, Mizukami S, Ishige I, Ichiyanagi T, *et al.* Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(39): 16363-16368.
249. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, *et al.* In vivo depletion of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells abrogates priming of CD8<sup>+</sup> T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 2002, **17**(2): 211-220.
250. Belz GT, Shortman K, Bevan MJ, Heath WR. CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *Journal of immunology* 2005, **175**(1): 196-200.
251. Pooley JL, Heath WR, Shortman K. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8<sup>-</sup> dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *Journal of immunology* 2001, **166**(9): 5327-5330.

252. Schulz O, Reis e Sousa C. Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* 2002, **107**(2): 183-189.
253. Belz GT, Vremec D, Febbraio M, Corcoran L, Shortman K, Carbone FR, *et al.* CD36 is differentially expressed by CD8+ splenic dendritic cells but is not required for cross-presentation in vivo. *Journal of immunology* 2002, **168**(12): 6066-6070.
254. Schulz O, Pennington DJ, Hodivala-Dilke K, Febbraio M, Reis e Sousa C. 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. *Journal of immunology* 2002, **168**(12): 6057-6065.
255. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, *et al.* Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 2008, **322**(5904): 1097-1100.
256. Qiu CH, Miyake Y, Kaise H, Kitamura H, Ohara O, Tanaka M. Novel subset of CD8{alpha}+ dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. *Journal of immunology* 2009, **182**(7): 4127-4136.
257. Shortman K, Heath WR. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunological reviews* 2010, **234**(1): 18-31.
258. Schnorrer P, Behrens GM, Wilson NS, Pooley JL, Smith CM, El-Sukkari D, *et al.* The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(28): 10729-10734.
259. Henri S, Poulin LF, Tamoutounour S, Ardouin L, Guilliams M, de Bovis B, *et al.* CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(1): 189-206.
260. del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Forster R. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology* 2007, **178**(11): 6861-6866.
261. GeurtsvanKessel CH, Willart MA, van Rijt LS, Muskens F, Kool M, Baas C, *et al.* Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2008, **205**(7): 1621-1634.
262. Desch AN, Randolph GJ, Murphy K, Gautier EL, Kedl RM, Lahoud MH, *et al.* CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *The Journal of experimental medicine* 2011, **208**(9): 1789-1797.

263. Mouries J, Moron G, Schlecht G, Escriou N, Dadaglio G, Leclerc C. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* 2008, **112**(9): 3713-3722.
264. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sorensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M, *et al.* Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nature immunology* 2008, **9**(5): 551-557.
265. Hoeffel G, Ripoche AC, Matheoud D, Nascimbeni M, Escriou N, Lebon P, *et al.* Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2007, **27**(3): 481-492.
266. Salio M, Palmowski MJ, Atzberger A, Hermans IF, Cerundolo V. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *The Journal of experimental medicine* 2004, **199**(4): 567-579.
267. Sapozhnikov A, Fischer JA, Zaft T, Krauthgamer R, Dzionek A, Jung S. Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(8): 1923-1933.
268. Lee HK, Zamora M, Linehan MM, Iijima N, Gonzalez D, Haberman A, *et al.* Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 2009, **206**(2): 359-370.
269. Le Borgne M, Etchart N, Goubier A, Lira SA, Sirard JC, van Rooijen N, *et al.* Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. *Immunity* 2006, **24**(2): 191-201.
270. Segura E, Albiston AL, Wicks IP, Chai SY, Villadangos JA. Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(48): 20377-20381.
271. Wakim LM, Waithman J, van Rooijen N, Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* 2008, **319**(5860): 198-202.
272. Asano K, Nabeyama A, Miyake Y, Qiu CH, Kurita A, Tomura M, *et al.* CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity* 2011, **34**(1): 85-95.
273. Beauvillain C, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guermonprez P, *et al.* Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* 2007, **110**(8): 2965-2973.

274. Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 2005, **307**(5715): 1630-1634.
275. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, *et al.* NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 2006, **126**(1): 205-218.
276. Savina A, Peres A, Cebrian I, Carmo N, Moita C, Hacohen N, *et al.* The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity* 2009, **30**(4): 544-555.
277. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, **100**(1): 57-70.
278. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(10): 715-727.
279. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011, **331**(6024): 1565-1570.
280. Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, Allison JP, Urba WJ, Robert C, *et al.* Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013, **1291**(1): 1-13.
281. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, *et al.* Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England journal of medicine* 2013, **369**(2): 122-133.
282. Galluzzi L, Vacchelli E, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C, Tartour E, *et al.* Trial Watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012, **1**(1): 28-37.
283. Palucka K, Banchereau J. Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Immunity* 2013, **39**(1): 38-48.
284. Dubensky TW, Jr., Reed SG. Adjuvants for cancer vaccines. *Seminars in immunology* 2010, **22**(3): 155-161.
285. Lutz E, Yeo CJ, Lillemoe KD, Biedrzycki B, Kobrin B, Herman J, *et al.* A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma. A Phase II trial of safety, efficacy, and immune activation. *Annals of surgery* 2011, **253**(2): 328-335.
286. Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER, Armstrong TD, Chen YC, Huang LQ, *et al.* Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *The Journal of experimental medicine* 2004, **200**(3): 297-306.

287. Dranoff G. GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunological reviews* 2002, **188**: 147-154.
288. Brockstedt DG, Giedlin MA, Leong ML, Bahjat KS, Gao Y, Lockett W, *et al.* Listeria-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(38): 13832-13837.
289. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine* 2002, **196**(12): 1627-1638.
290. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, *et al.* In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *The Journal of experimental medicine* 2004, **199**(6): 815-824.
291. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2001, **194**(6): 769-779.
292. Soares H, Waechter H, Glaichenhaus N, Mougneau E, Yagita H, Mizenina O, *et al.* A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(5): 1095-1106.
293. Klechevsky E, Flamar AL, Cao Y, Blanck JP, Liu M, O'Bar A, *et al.* Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* 2010, **116**(10): 1685-1697.
294. Meyer-Wentrup F, Cambi A, Joosten B, Looman MW, de Vries IJ, Figdor CG, *et al.* DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *Journal of leukocyte biology* 2009, **85**(3): 518-525.
295. Dakappagari N, Maruyama T, Renshaw M, Tacke P, Figdor C, Torensma R, *et al.* Internalizing antibodies to the C-type lectins, L-SIGN and DC-SIGN, inhibit viral glycoprotein binding and deliver antigen to human dendritic cells for the induction of T cell responses. *Journal of immunology* 2006, **176**(1): 426-440.
296. Ni L, Gayet I, Zurawski S, Duluc D, Flamar AL, Li XH, *et al.* Concomitant activation and antigen uptake via human dectin-1 results in potent antigen-specific CD8+ T cell responses. *Journal of immunology* 2010, **185**(6): 3504-3513.
297. Sancho D, Mourao-Sa D, Joffre OP, Schulz O, Rogers NC, Pennington DJ, *et al.* Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *The Journal of clinical investigation* 2008, **118**(6): 2098-2110.

298. Flacher V, Sparber F, Tripp CH, Romani N, Stoitzner P. Targeting of epidermal Langerhans cells with antigenic proteins: attempts to harness their properties for immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2009, **58**(7): 1137-1147.
299. Caminschi I, Vremec D, Ahmet F, Lahoud MH, Villadangos JA, Murphy KM, *et al.* Antibody responses initiated by Clec9A-bearing dendritic cells in normal and Batf3(-/-) mice. *Molecular immunology* 2012, **50**(1-2): 9-17.
300. Joffre OP, Sancho D, Zelenay S, Keller AM, Reis e Sousa C. Efficient and versatile manipulation of the peripheral CD4+ T-cell compartment by antigen targeting to DNGR-1/CLEC9A. *European journal of immunology* 2010, **40**(5): 1255-1265.
301. Li D, Romain G, Flamar AL, Duluc D, Dullaers M, Li XH, *et al.* Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 2012, **209**(1): 109-121.
302. Tsuji T, Matsuzaki J, Kelly MP, Ramakrishna V, Vitale L, He LZ, *et al.* Antibody-targeted NY-ESO-1 to mannose receptor or DEC-205 in vitro elicits dual human CD8+ and CD4+ T cell responses with broad antigen specificity. *Journal of immunology* 2011, **186**(2): 1218-1227.
303. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, *et al.* Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nature medicine* 1995, **1**(12): 1297-1302.
304. Ossevoort MA, Feltkamp MC, van Veen KJ, Melief CJ, Kast WM. Dendritic cells as carriers for a cytotoxic T-lymphocyte epitope-based peptide vaccine in protection against a human papillomavirus type 16-induced tumor. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy* 1995, **18**(2): 86-94.
305. Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *The Journal of experimental medicine* 1996, **183**(1): 317-322.
306. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature medicine* 1996, **2**(1): 52-58.
307. Mayordomo JI, Loftus DJ, Sakamoto H, De Cesare CM, Appasamy PM, Lotze MT, *et al.* Therapy of murine tumors with p53 wild-type and mutant sequence peptide-based vaccines. *The Journal of experimental medicine* 1996, **183**(4): 1357-1365.
308. Speetjens FM, Kuppen PJ, Welters MJ, Essahsah F, Voet van den Brink AM, Lantrua MG, *et al.* Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an*

- official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, **15**(3): 1086-1095.
309. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, *et al.* Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *The Journal of experimental medicine* 1996, **183**(1): 87-97.
310. Galluzzi L, Senovilla L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, *et al.* Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012, **1**(7): 1111-1134.
311. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England journal of medicine* 2010, **363**(5): 411-422.
312. Ashley DM, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *The Journal of experimental medicine* 1997, **186**(7): 1177-1182.
313. Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lyerly HK, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer research* 2000, **60**(4): 1028-1034.
314. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 1996, **184**(2): 465-472.
315. Pecher G, Haring A, Kaiser L, Thiel E. Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2002, **51**(11-12): 669-673.
316. Chiappori AA, Soliman H, Janssen WE, Antonia SJ, Gabrilovich DI. INGN-225: a dendritic cell-based p53 vaccine (Ad.p53-DC) in small cell lung cancer: observed association between immune response and enhanced chemotherapy effect. *Expert opinion on biological therapy* 2010, **10**(6): 983-991.
317. Steele JC, Rao A, Marsden JR, Armstrong CJ, Berhane S, Billingham LJ, *et al.* Phase I/II trial of a dendritic cell vaccine transfected with DNA encoding melan A and gp100 for patients with metastatic melanoma. *Gene therapy* 2011, **18**(6): 584-593.
318. Celluzzi CM, Falo LD, Jr. Physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induces protective and therapeutic tumor rejection. *Journal of immunology* 1998, **160**(7): 3081-3085.

319. Wang J, Saffold S, Cao X, Krauss J, Chen W. Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. *Journal of immunology* 1998, **161**(10): 5516-5524.
320. Vasir B, Wu Z, Crawford K, Rosenblatt J, Zarwan C, Bissonnette A, *et al.* Fusions of dendritic cells with breast carcinoma stimulate the expansion of regulatory T cells while concomitant exposure to IL-12, CpG oligodeoxynucleotides, and anti-CD3/CD28 promotes the expansion of activated tumor reactive cells. *Journal of immunology* 2008, **181**(1): 808-821.
321. Salcedo M, Bercovici N, Taylor R, Vereecken P, Massicard S, Duriau D, *et al.* Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2006, **55**(7): 819-829.
322. Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer research* 2004, **64**(14): 4973-4979.
323. Lee WC, Wang HC, Hung CF, Huang PF, Lia CR, Chen MF. Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial. *Journal of immunotherapy* 2005, **28**(5): 496-504.
324. Chang AE, Redman BG, Whitfield JR, Nickoloff BJ, Braun TM, Lee PP, *et al.* A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002, **8**(4): 1021-1032.
325. Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Nouri-Shirazi M, Taquet N, *et al.* Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *The Journal of experimental medicine* 2000, **192**(11): 1535-1544.
326. Chen Z, Moyana T, Saxena A, Warrington R, Jia Z, Xiang J. Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2001, **93**(4): 539-548.
327. Palucka AK, Ueno H, Connolly J, Kerneis-Norvell F, Blanck JP, Johnston DA, *et al.* Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *Journal of immunotherapy* 2006, **29**(5): 545-557.
328. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature reviews Immunology* 2009, **9**(5): 353-363.
329. Matheoud D, Baey C, Vimeux L, Tempez A, Valente M, Louche P, *et al.* Dendritic cells crosspresent antigens from live B16 cells more efficiently than from apoptotic cells and protect from melanoma in a therapeutic model. *PLoS one* 2011, **6**(4): e19104.



330. Karttunen J, Sanderson S, Shastri N. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**(13): 6020-6024.
331. Kurts C, Sutherland RM, Davey G, Li M, Lew AM, Blanas E, *et al.* CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(22): 12703-12707.
332. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al]* 2006, **Chapter 3**: Unit 3 22.
333. Piehl M, Lehmann C, Gumpert A, Denizot JP, Segretain D, Falk MM. Internalization of large double-membrane intercellular vesicles by a clathrin-dependent endocytic process. *Molecular biology of the cell* 2007, **18**(2): 337-347.
334. Labarriere N, Bretaudeau L, Gervois N, Bodinier M, Bougras G, Diez E, *et al.* Apoptotic body-loaded dendritic cells efficiently cross-prime cytotoxic T lymphocytes specific for NA17-A antigen but not for Melan-A/MART-1 antigen. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2002, **101**(3): 280-286.
335. Rawson PM, Molette C, Videtta M, Altieri L, Franceschini D, Donato T, *et al.* Cross-presentation of caspase-cleaved apoptotic self antigens in HIV infection. *Nature medicine* 2007, **13**(12): 1431-1439.
336. Burgdorf S, Kautz A, Bohnert V, Knolle PA, Kurts C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 2007, **316**(5824): 612-616.
337. Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Current opinion in immunology* 2010, **22**(1): 109-117.
338. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Current opinion in immunology* 2007, **19**(2): 203-208.
339. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology* 2010, **12**(1): 19-30; sup pp 11-13.
340. Nguyen TD, Taffet SM. A model system to study Connexin 43 in the immune system. *Molecular immunology* 2009, **46**(15): 2938-2946.
341. Glass AM, Wolf BJ, Schneider KM, Princiotta MF, Taffet SM. Connexin43 is dispensable for phagocytosis. *Journal of immunology* 2013, **190**(9): 4830-4835.

342. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and cell biology* 2011, **89**(8): 836-843.
343. Basquin C, Malarde V, Mellor P, Anderson DH, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, *et al.* The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. *Journal of cell science* 2013, **126**(Pt 5): 1099-1108.
344. Gilleron J, Fiorini C, Carette D, Avondet C, Falk MM, Segretain D, *et al.* Molecular reorganization of Cx43, Zo-1 and Src complexes during the endocytosis of gap junction plaques in response to a non-genomic carcinogen. *Journal of cell science* 2008, **121**(Pt 24): 4069-4078.
345. Olsson M, Oldenborg PA. CD47 on experimentally senescent murine RBCs inhibits phagocytosis following Fcγ receptor-mediated but not scavenger receptor-mediated recognition by macrophages. *Blood* 2008, **112**(10): 4259-4267.
346. Ghiran I, Klickstein LB, Nicholson-Weller A. Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(23): 21024-21031.
347. Albacker LA, Karisola P, Chang YJ, Umetsu SE, Zhou M, Akbari O, *et al.* TIM-4, a receptor for phosphatidylserine, controls adaptive immunity by regulating the removal of antigen-specific T cells. *Journal of immunology* 2010, **185**(11): 6839-6849.
348. Brown GC, Neher JJ. Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends in biochemical sciences* 2012, **37**(8): 325-332.
349. Skoberne M, Beignon AS, Larsson M, Bhardwaj N. Apoptotic cells at the crossroads of tolerance and immunity. *Current topics in microbiology and immunology* 2005, **289**: 259-292.
350. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine* 2000, **191**(3): 411-416.
351. Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *The Journal of experimental medicine* 2002, **196**(8): 1079-1090.
352. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(1): 351-358.
353. Kerksiek KM, Niedergang F, Chavrier P, Busch DH, Brocker T. Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo. *Blood* 2005, **105**(2): 742-749.

## Annexe

# Dendritic Cells Crosspresent Antigens from Live B16 Cells More Efficiently than from Apoptotic Cells and Protect from Melanoma in a Therapeutic Model

Diana Matheoud<sup>1,2,3,9,□</sup>, Camille Baey<sup>1,2,3,9</sup>, Lene Vimeux<sup>1,2,3</sup>, Andy Tempez<sup>1,2,3</sup>, Michael Valente<sup>1,2,3</sup>, Pauline Louche<sup>1,2,3</sup>, Agnès Le Bon<sup>1,2,3</sup>, Anne Hosmalin<sup>1,2,3,\*¶</sup>, Vincent Feuillet<sup>1,2,3,\*¶</sup>

**1** Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France, **2** Cnrs, UMR8104, Paris, France, **3** Université Paris Descartes, Paris, France

## Abstract

Dendritic cells (DC) are able to elicit anti-tumoral CD8<sup>+</sup> T cell responses by cross-presenting exogenous antigens in association with major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. Therefore they are crucial actors in cell-based cancer immunotherapy. Although apoptotic cells are usually considered to be the best source of antigens, live cells are also able to provide antigens for cross-presentation by DC. We have recently shown that prophylactic immunotherapy by DC after capture of antigens from live B16 melanoma cells induced strong CD8<sup>+</sup> T-cell responses and protection against a lethal tumor challenge *in vivo* in C57Bl/6 mice. Here, we showed that DC cross-presenting antigens from live B16 cells can also inhibit melanoma lung dissemination in a therapeutic protocol in mice. DC were first incubated with live tumor cells for antigen uptake and processing, then purified and irradiated for safety prior to injection. This treatment induced stronger tumor-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses than treatment by DC cross-presenting antigens from apoptotic cells. Apoptotic B16 cells induced more IL-10 secretion by DC than live B16 cells. They underwent strong native antigen degradation and led to the expression of fewer MHC class I/epitope complexes on the surface of DC than live cells. Therefore, the possibility to use live cells as sources of tumor antigens must be taken into account to improve the efficiency of cancer immunotherapy.

**Citation:** Matheoud D, Baey C, Vimeux L, Tempez A, Valente M, et al. (2011) Dendritic Cells Crosspresent Antigens from Live B16 Cells More Efficiently than from Apoptotic Cells and Protect from Melanoma in a Therapeutic Model. PLoS ONE 6(4): e19104. doi:10.1371/journal.pone.0019104

**Editor:** Jean Kanellopoulos, University Paris Sud, France

**Received:** February 4, 2011; **Accepted:** March 16, 2011; **Published:** April 28, 2011

**Copyright:** © 2011 Matheoud et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Association de Recherche contre le Cancer (ARC), Ligue contre le Cancer (studentship to C.B.), Agence Nationale de la Recherche contre le SIDA et les hépatites virales (ANRS; fellowship to D.M.), Région Ile de France (studentship to D.M.), INSERM (award to V.F.), Paris-Diderot University (studentship to M.V.), and CNRS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: anne.hosmalin@inserm.fr (AH); vincent.feUILlet@inserm.fr (VF)

9 These authors contributed equally to this work.

¶ These authors also contributed equally to this work.

□ Current address: Département de pathologie et biologie cellulaire et Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada

## Introduction

Dendritic cells (DC) are professional antigen-presenting cells that are the most powerful stimulators of naive T cells, playing a key role in the initiation of immune responses. They have developed unique cross-presentation pathways allowing major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted presentation of antigens of exogenous origin, taken up by endocytosis or phagocytosis. Cross-presentation is crucial for the stimulation of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and therefore induction of immunity and tolerance to antigens that are not directly synthesized in the cytosol of DC, such as antigens from tumors [1,2,3,4,5,6].

Given their unique properties, DC have been used with tumor-associated antigens for active cancer immunotherapy [7]. To date, different sources of antigens have been used to load DC: tumor-specific proteins or synthetic peptides [8,9,10], peptides eluted from tumor cell surface HLA molecules [11], apoptotic tumor cells [12,13,14,15], tumor cell lysates [16,17,18], tumor cell/DC fusions [19].

Loading MHC class I and MHC class II molecules on DC with peptides derived from defined tumor antigens is the most

commonly used strategy for DC vaccination, but this approach presents several disadvantages: the restriction to a limited number of HLA molecules, the limited number of well-defined tumor antigens, the relatively rapid turnover of exogenous peptide-MHC complexes and the induction of a restricted repertoire of T-cell clones. An alternative is to load derivatives from whole tumor cells, as this theoretically allows presentation of all possible epitopes, even if undefined, by all HLA types. The parallel presentation of both class I and II MHC-restricted antigens can promote a stronger overall anti-tumor response and long-term cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-cell memory via CD4<sup>+</sup> T-cell help [20]. In addition, the requirement for processing results in prolonged antigen presentation [21].

Studies have focused on the use of dead (either apoptotic or necrotic) tumor cells as a source of tumor antigens. In murine models, immunization with DC that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells induced good protection against tumors [22,23]. In patients with different types of cancers, DC loaded with autologous or allogeneic tumor-cells have also been used for immunotherapy [12,13,14,15]. However, despite the elicitation of

immune responses, clinical results have not yet matched the hopes raised by preclinical studies. The tumor environment is strongly immunosuppressive by different mechanisms, and only some types of death induce immunogenic stress signals [24,25,26].

Besides dead cells, live cells can also be a source of antigen for cross-presentation by DC [27,28,29], after antigen uptake through nibbling, a mechanism related to trogocytosis [30]. Recently, we have demonstrated that DC that had acquired antigens from live B16 melanoma cells protected mice from lethal tumor challenge in a prophylactic setting [29]. Here, we assessed the potential of DC loaded with antigens from live tumor cells to control established tumors, and we investigated activation and antigen availability using live tumor cells compared to dead tumor cells.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All experiments were performed according to the European Community Council Directive of 11/24th/1986 (86/609/EEC) and with permission of the French Veterinary Services (permit number 75-1321) and approval of the Cochin General Animal Facility Service (accreditation number A-75-14-02). All efforts were made to minimize suffering.

### Mice

Eight to twelve week-old C57Bl/6 mice obtained from Harlan Laboratories were bred in the Cochin Institute specific pathogen-free animal facility.

### Cell culture and purification

B3Z cells and B16 F10 (B16) cells were maintained in complete medium (RPMI 1640 Glutamax supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mM non essential amino acids solution, 10 mM HEPES buffer solution and 1 mM sodium pyruvate, all from Invitrogen). L cells transfected with a form of ovalbumin (OVA) only expressed in the cytoplasm, i.e. OVA-EGFP-DAP (L-OVA cells) were a kind gift from K. Rock (University of Massachusetts Medical School, Boston, MA)[31]. They were cultured in complete medium and 500 µg/ml G418 (Sigma-Aldrich). B3Z cells, *lacZ*-inducible CD8<sup>+</sup> T cell hybridoma which express β-galactosidase upon specific recognition of the OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL)-H-2K<sup>b</sup> complex [32], were a kind gift from C. Leclerc (Institut Pasteur, France).

To avoid caspase-mediated cell death, cells were cultured in the presence of 10 µM z-VAD FMK (Sigma-Aldrich). Alternatively, apoptosis was induced by γ-irradiation (100 Gy), then cells were used after 48-hour incubation in complete medium. The proportion of annexin V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> apoptotic cells was ≥70%.

For bone marrow-derived DC (BMDC) generation, bone marrow cells from C57Bl/6 mice were depleted of red blood cells using 0.84% ammonium chloride. Cells (2×10<sup>5</sup>/ml) were resuspended in complete medium with 30 µl/ml of hybridoma supernatant containing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (kind gift from David Gray, Royal Postgraduate Hospital, London). Medium was replaced after 2 and 4 days. Immature DC were obtained after 6 days.

For *in vitro* cross-presentation assays, BMDC were cultured for 16 h with different amounts of live or apoptotic cells in the presence of lipopolysaccharide (LPS from *E.Coli* 0111:B4; 500 ng/ml; Sigma-Aldrich) and DC were purified using CD11c microbeads for positive immunomagnetic selection (Miltenyi Biotec). Purified DC were cultured for 18 h with the B3Z-T cell hybridoma. After addition of the CPRG substrate, optical density was measured at 560 nm by an ELISA reader (Berthold CB911).

DC maturation was assessed after incubation with live or apoptotic B16 cells with or without LPS and IFNγ (20 ng/ml, Roche). Twenty-four hours later, supernatants were collected to assess cytokine production by ELISA and DC were used for flow cytometry.

### Anti-tumor protection *in vivo*

On day 0, mice were injected i.v. with 10<sup>6</sup> B16 cells to induce lung tumors. DC were cultured for 16 hours in the presence of LPS (500 ng/ml) and IFNγ (20 ng/ml), either alone or with B16 derived MHC class I-restricted synthetic peptides (gp100<sub>25-33</sub> and TRP2<sub>181-188</sub>, 10 µM each), or with live B16 cells in the presence of z-VAD, or with apoptotic B16 cells. DC (5×10<sup>5</sup>) were then washed, purified, γ-irradiated (100 Gy) to eliminate any residual live tumor cells, and immediately injected i.v into C57Bl/6 mice on days 3 and 10. On day 15, tumor nodules were counted on the lung surface. Splenocytes were restimulated for 36 hours with γ-irradiated B16 cells or 1 µM peptide (gp100<sub>25-33</sub> or TRP2<sub>181-188</sub>). The ability of stimulated splenocytes to produce IFNγ was assayed by ELISPOT or flow cytometry.

### Flow cytometric analysis

DC maturation was evaluated by immunofluorescence labeling with the following mAb: anti-CD11c-PE-Cy7, anti-CD80-FITC, anti-CD86-APC, anti-IA<sup>b</sup>-PE. T cells were labeled with the following mAb: anti-CD3-PE-Cy7, anti-CD4-biotin, anti-CD8α-APC-H7 and anti-IFNγ-APC. The anti-CD11c-PE-Cy7 mAb was from eBiosciences, the others from BD. Labeling was performed at 4°C using PBS containing 5% fetal calf serum and 5 mM EDTA (Sigma). Cells were incubated with purified anti-CD16/32 (2.4G2) mAb to block Fc receptors (BD) for 20 min. Then they were labeled with conjugated antibodies for further 20 min. For biotinylated antibodies, streptavidin-PerCP (BD Biosciences) was added in a second step for 15 min. For intracellular IFNγ labeling, spleen cells were restimulated for 4 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> at 10<sup>6</sup> cells/ml in complete medium with 0.5 µg/ml phorbol myristate acetate (PMA) and 0.5 µg/ml ionomycin in the presence of Golgi Plug (BD), and labeled with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 mAb, then intracellularly with an anti-IFNγ mAb (Intracellular staining kit, BD). Annexin-V staining was performed using the Annexin-V apoptosis detection kit from BD Bioscience. Events were acquired using a FACS CANTO or a BD LSR II flow cytometer and analyzed using Diva (Version 6.1.1, BD Biosciences) followed by FlowJo (Version 7.2.5; TreeStar).

### ELISPOT assays

PVDF microplates (Millipore) were coated overnight at 4°C with 4 µg/ml of an anti-mouse IFNγ rat monoclonal antibody (AN18, Mabtech AB) diluted in PBS. After extensive washes, wells were blocked with RPMI containing 10% AB human serum (ABCYS) for 2 hours at 37°C. Three ×10<sup>5</sup> splenocytes were incubated overnight with one of the peptides corresponding to a specific epitope (final concentration 10 µg/ml) or with B16 melanoma cells. The plates were then washed, incubated with 1 µg/ml biotinylated anti-mouse IFNγ rat monoclonal antibody (R4-6A2, Mabtech AB) diluted in PBS for 2 hours at 37°C, and then overnight at 4°C. Plates were subsequently incubated with extravidine-coupled alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) diluted in PBS. After adding the BCIP/NBT substrate (Sigma-Aldrich), IFNγ spot forming cells were counted using a BioReader 5000F ELISPOT reader and expressed as the number of spots per million cells tested.

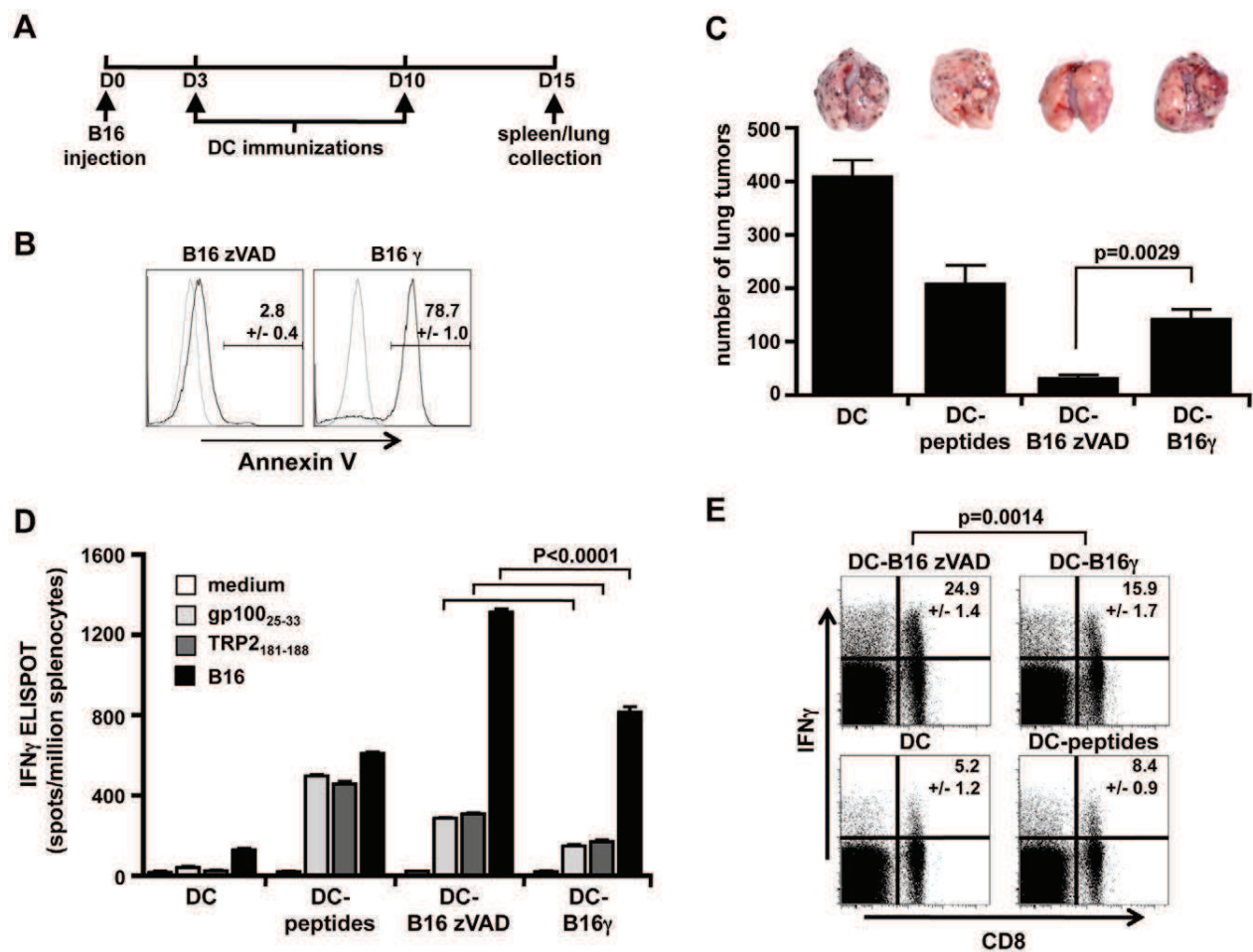
## ELISA

Culture supernatants were assayed for IL-12p70 and IL-10 using kits from Ebioscience according to supplier instructions. Optical density was measured at 560 nm using an ELISA Berthold CB911 reader.

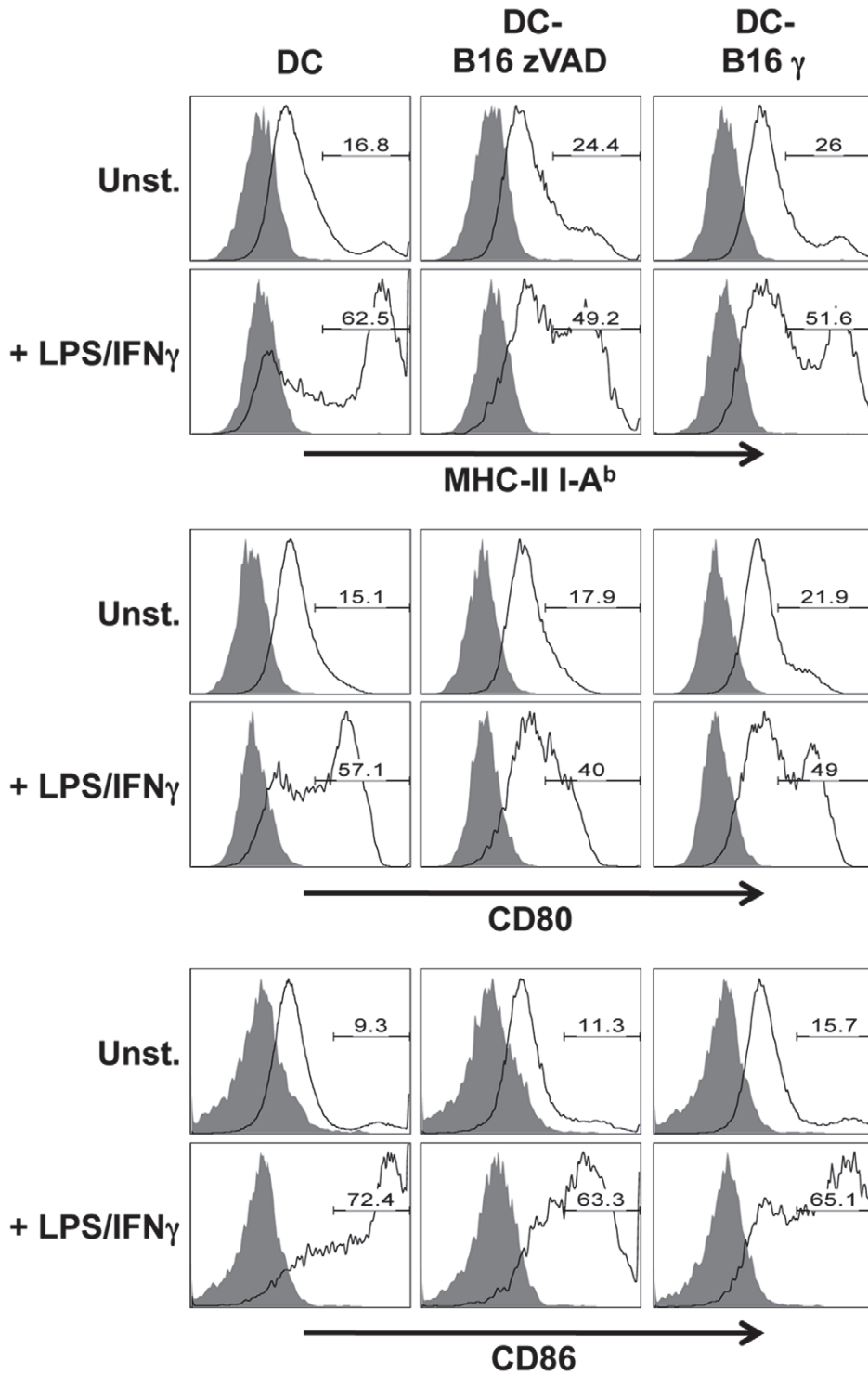
## Western Blots

Live or apoptotic B16 and L cells were scraped at 4°C in CHAPS buffer (1% 3-[[3-Cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol; Sigma-Aldrich) containing proteases inhibitors (Complete EDTA-free tablets, Roche) and 0.2 mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich). Protein concentration was measured by spectrometry at 280 nm (NanoDrop, Labtech). Cell lysates were boiled at 95°C for 5 min in sample application buffer containing

2-mercaptoethanol (Lane Marker Reducing Sample buffer; ThermoFisher). Fifty µg of proteins (for B16 cells), or 25 µg of proteins (for L cells), from each sample were separated by SDS/10%PAGE (ready-to-use; BioRad) for 1 hour at 150 V and transferred onto a nitrocellulose membrane for 1 hour at 80 V. Membranes were then blocked for 2 hours with TBS/0.05% Tween buffer plus 5% milk (BioRad). Membranes were probed with a polyclonal rabbit antibody to OVA (for OVA-EGFP-DAP cells), a polyclonal goat antibody to gp100, a polyclonal goat antibody to TRP2 (for B16 cells) or a polyclonal goat antibody to actin overnight at 4°C and incubated with horseradish peroxidase-conjugated antibodies to rabbit IgG or to goat IgG (all antibodies from Santa Cruz Biotechnology) for 1 hour. Visualization was carried out with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare). Bands were analyzed using a LAS 300S reader.



**Figure 1. DC cultured with live B16 cells induced strong protection against tumor in a therapeutic setting.** A, time schedule outlining the different stages as used in the experiments. Five C57BL/6 mice per group were inoculated *i.v.* with  $1.10^6$  B16 cells at day 0. At days 3 and 10, mice were immunized with  $0.5.10^6$  of purified and irradiated DC that were previously cultured for 16 h in the presence of LPS and IFN $\gamma$ , with either culture medium (DC), or gp100<sub>25-33</sub> and TRP2<sub>181-188</sub> peptides (DC-peptides), or live (zVAD treated) B16 cells (DC-B16 zVAD) or apoptotic ( $\gamma$ -irradiated) B16 cells (DC-B16 $\gamma$ ). B, B16 cell apoptosis was evaluated by annexin-V staining (solid lines) compared to no staining (dotted lines) and the mean number  $\pm$  SEM of the Annexin-positive events is shown. At day 15, mice were sacrificed, lung tumors were counted (C) and T cell responses were evaluated in the spleen. D, Splenocytes were restimulated with gp100<sub>25-33</sub> or TRP2<sub>181-188</sub> peptides or B16 cells or culture medium and tested in an IFN $\gamma$  ELISPOT assay. E, After B16 restimulation, splenocytes were also stimulated with PMA and ionomycin and then labeled with anti-CD3, anti-CD8 and intracellularly with anti-IFN $\gamma$  antibodies. Events were gated on CD3 $^+$ CD8 $^+$  splenocytes and IFN $\gamma$  production was measured by flow cytometry. The mean  $\pm$  SEM of data from 5 mice per group are shown for an experiment representative of two independent experiments. The significance of differences between series was assessed by unpaired *t* test. doi:10.1371/journal.pone.0019104.g001



**Figure 2. DC maturation after culture with live or apoptotic B16 cells.** DC were cultured with live (zVAD treated) or apoptotic ( $\gamma$ -irradiated) B16 cells for 24 h in the presence of culture medium or LPS and IFN $\gamma$ . The expression of maturation molecules was then tested by flow cytometry. One representative experiment out of three independent experiments is shown. doi:10.1371/journal.pone.0019104.g002

### Statistical analysis

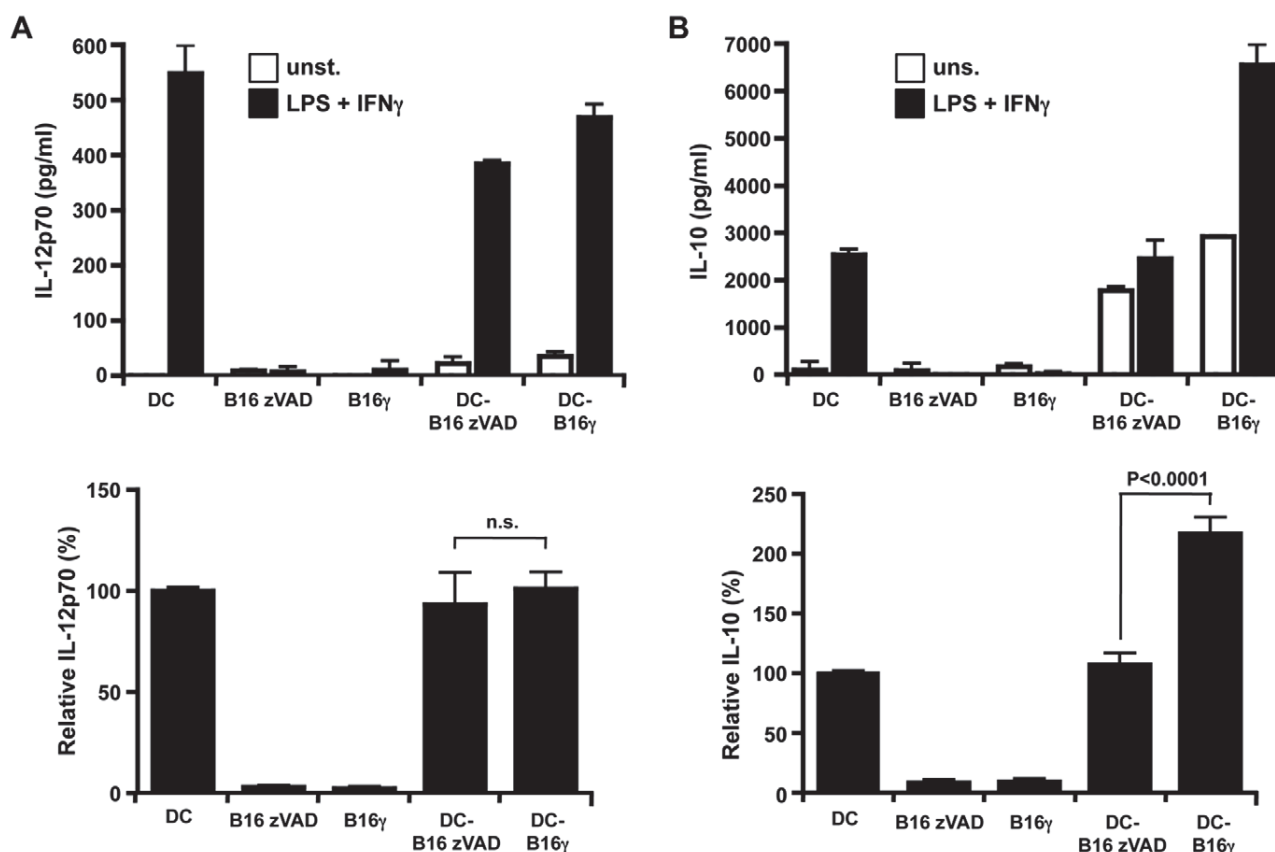
The significance of differences between series of results was assessed by unpaired *t* test (Prism 5, GraphPad Software). *P* values < 0.05 were considered significant.

### Results

DC loaded with live melanoma cells induced protection against B16 tumors in a therapeutic setting and a stronger CD8<sup>+</sup> T cell response than DC cultured with apoptotic melanoma cells

After reporting that DC cultured with live B16 melanoma cells induced a strong protection against a lethal tumor challenge in a preventive immunization model [29], we tested this immunization in a therapeutic setting (Fig. 1A). At day 0, C57BL/6 mice were inoculated *i.v.* with B16 cells. Bone marrow-derived DC were cultured for 16 h in the presence of LPS and IFN $\gamma$ , with either live B16 cells and the caspase inhibitor zVAD to avoid caspase-mediated apoptosis (DC-B16 zVAD), or apoptotic B16 cells (DC-B16 $\gamma$ ) (Fig. 1B), or tumor specific MHC class I-restricted peptides (gp100<sub>25-33</sub> and TRP2<sub>181-188</sub>, DC-peptides), or medium alone (DC). DC were purified to 98% by positive selection, irradiated at 100 Gy to avoid injecting any residual live tumor cell, then injected *i.v.* 3 and 10 days after tumor inoculation. At day 15, mice

treated with DC alone had 406 $\pm$ 50 tumors in their lungs, whereas mice treated with DC cultured with live B16 cells were strongly protected as they only displayed 28 $\pm$ 14 tumors. Surprisingly, protection was more efficient using DC cultured with live rather than with apoptotic tumor cells (Fig. 1C, *p* = 0.0029). IFN $\gamma$  responses to gp100<sub>25-33</sub> or TRP2<sub>181-188</sub> or to B16 tumor cells were reproducibly higher with DC-B16 zVAD than with DC-B16 $\gamma$  (Fig. 1D). As expected, immunization with DC cultured with B16 cells induced higher responses to the tumor itself than immunization with DC-peptides. Immunization with peptide-loaded DC yielded similar numbers of IFN $\gamma$  positive spots in response to either B16 cells or to peptide-loaded DC, whereas immunization with live or apoptotic cell-loaded DC yielded much higher responses to B16 cells than to peptide-loaded DC, indicating stimulation of a larger set of clones responding to a broader antigenic repertoire, including responses to TRP2<sub>181-188</sub> and gp100<sub>25-33</sub> (Fig. 1D). Indeed, B16 cells provide many more tumor epitopes, including undefined epitopes, than the two peptides. IFN $\gamma$  responses to B16 cells were induced in CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells in the spleens from mice immunized with DC-B16 specifically compared to spleens from mice immunized with DC or DC-peptides (Fig. 1E), showing MHC-class I-restricted responses related to cross-presentation. Responses were also induced in CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T cells (not shown). Therefore, DC cultured with live tumor cells, purified and strongly irradiated to prevent



**Figure 3. DC cytokine profile after culture with live or apoptotic B16 cells.** DC were cultured alone (DC) or with live (zVAD treated) or apoptotic ( $\gamma$ -irradiated) B16 cells for 24 h and stimulated or not with LPS and IFN $\gamma$ . As controls, B16 zVAD and B16 $\gamma$  cells were also cultured alone. DC were then assessed for their ability to produce IL-12p70 (A) or IL-10 (B) by ELISA. In the upper panels, data from one out of three independent experiments are shown. In the bottom panels, for LPS and IFN $\gamma$  stimulation, relative IL-12p70 and IL-10 productions are expressed as a percentage of the cytokine production obtained for DC alone. Mean percentage values  $\pm$  SEM are shown. The significance of differences between series of results was assessed using a paired *t* test (*n* = 3, 3 independent experiments). doi:10.1371/journal.pone.0019104.g003



inoculation of proliferating tumor cells, induced more efficient protection and a stronger immunity in a therapeutic protocol than DC cultured with apoptotic tumor cells.

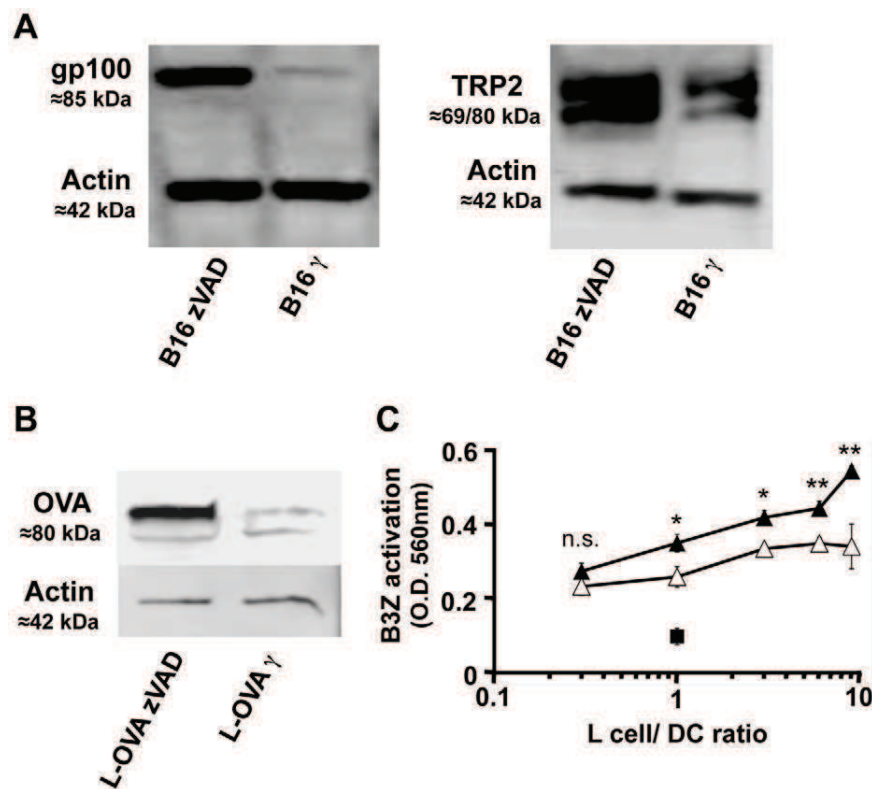
#### Culture of DC with apoptotic B16 cells led to higher IL-10 production than culture with live B16 cells

We next documented the impact of culture with either live or apoptotic B16 cells on DC maturation. DC were cultured with live (zVAD treated) or apoptotic ( $\gamma$ -irradiated) B16 cells for 24 h while maturation was induced or not using LPS and IFN $\gamma$ . First, DC maturation was assessed by labeling for MHC class II molecules and the costimulatory CD80 or CD86 molecules. Without stimulation, DC cultured either with live cells or apoptotic cells displayed a phenotype consistent with a slight maturation. On the contrary after stimulation with LPS and IFN $\gamma$ , DC cultured with apoptotic or live B16 cells were less mature than DC cultured alone. The maturation phenotype of DC was slightly higher after culture with apoptotic than with live B16 cells (Fig. 2). In the same cultures, we also examined the production of the proinflammatory cytokine IL-12 (p70) and the anti-inflammatory cytokine IL-10. As expected, live or irradiated B16 cells did not produce any IL-12p70 or IL-10 even after stimulation with LPS and IFN $\gamma$ . DC cultured with live or apoptotic cells produced similar concentrations of IL-12p70 after stimulation with LPS and IFN $\gamma$  (Fig. 3A). On the contrary, DC cultured with apoptotic B16 cells produced

more IL-10 than DC cultured with live B16 cells or cultured alone (Fig. 3B). Therefore, culture of DC with apoptotic B16 cells compared to live B16 cells led to slightly more phenotypic maturation, and significantly more IL-10 secretion, which might decrease CD8<sup>+</sup> T lymphocyte stimulation.

#### Live cells improved cross-presentation by DC by keeping antigens in a more native form than apoptotic cells

One parameter that controls cross-presentation efficiency is the amount of antigen accessible to the DC [33]. We performed western blots to evaluate the quality and the amount of two tumor antigens, gp100 and TRP2, in live or apoptotic B16 cells. We observed that both antigens were strongly degraded in apoptotic melanoma cells, while they were conserved in a native form in live cells (Fig. 4A). To examine the impact of the conservation of native antigen on cross-presentation, we used L cells expressing cytosolic, non-secreted ovalbumin (L-OVA) as a source of antigen, so as to evaluate the expression level of MHC class I-CD8<sup>+</sup> T cell OVA epitope (SIINFEKL) complexes on DC with the B3Z hybridoma. We could not use OVA-expressing B16 cells since they expressed a secreted form of OVA. We first confirmed that, similarly to gp100 and TRP2 in B16 cells, OVA antigen was strongly degraded in apoptotic L-OVA cells, while it was conserved in a native form in live cells (Fig. 4B). After culture of DC with live or apoptotic L-OVA cells at different ratios, cross-presentation was then



**Figure 4. More native antigen in live than in apoptotic donor cells: improved antigen crosspresentation by DC.** A, B,  $30.10^6$  live (zVAD treated) or apoptotic ( $\gamma$ -irradiated) B16 cells (A) or L-OVA cells (B) were lysed for protein extraction. Lysates from B16 cells were analysed using anti-gp100, anti-TRP2 and anti-actin antibodies (A). Lysates from L-OVA cells were analysed using anti-OVA and anti-actin antibodies (B). Anti-actin antibodies were used as controls. C, DC were cultured with different numbers of live (filled triangle) or apoptotic (open triangle) L-OVA cells or live L cells (filled square). DC were then purified by magnetic sorting using anti-CD11c microbeads and cultured with B3Z-T cells hybridoma cells for 18 h. Activation after recognition of the SIINFEKL-K<sup>b</sup> complex was detected by optical density measurement at 560 nm after addition of the CPRG substrate. The significance of differences between series of results was assessed using a two-tailed unpaired t test. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , n.s. not significant. Mean  $\pm$  SEM, representative of two independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0019104.g004

evaluated using the B3Z hybridoma. About three times more apoptotic cells than live cells were necessary to reach the maximal level of MHC class I-SIINFEKL complexes, which was lower using apoptotic cells. Thus, B3Z activation was significantly higher when DC were cultured with live than with apoptotic antigen donor cells. Therefore, better native antigen conservation in live cells compared to apoptotic cells seems to induce the expression of a higher number of MHC class I-epitope complexes on DC.

## Discussion

We have previously reported that cross-presentation of antigens from live B16 melanoma cells by DC induced a strong protection against a lethal tumor challenge in a preventive immunization model [29]. Here, we showed that injection of DC loaded with live B16 melanoma cells also protected mice from tumor dissemination in a therapeutic model. In the prophylactic immunization model, T cell responses were consistently stronger when DC were cultured with live melanoma cells than with apoptotic cells [29]. Here in the therapeutic model, DC cultured with live tumor cells induced more efficient protection and a stronger immunity than DC cultured with apoptotic tumor cells. We investigated what might confer a stronger immunogenicity to live cells.

The ability of DC to trigger an effective T cell response is dependent on their state of maturation and on cytokine production. We observed slightly higher MHC and costimulatory molecule expression levels after culture of DC with apoptotic compared to live cells, but similar IL-12 production levels. IL-12 is required for the polarization of Th1 responses, which in turn promote the activation of CD8<sup>+</sup> T cells into effector cytotoxic T lymphocytes, allowing the clearance of infected or transformed cells. On the contrary, IL-10, mainly secreted by DC and regulatory T cells, is rather a tolerogenic cytokine, which can inhibit T cell activation. [34]. DC cultured with apoptotic cells produced more IL-10 than DC cultured with live cells, conferring them potential tolerogenic properties, particularly when DC were matured with LPS and IFN $\gamma$ , which corresponds to the maturation stimulus used in our immunotherapeutic protocol.

The conservation state of antigens is a very important parameter in DC-based immunotherapy since the induction of an effective T cell response depends on the quality and quantity of the antigen [33]. It has already been shown that antigens are degraded in apoptotic bodies [35]. Moreover, it has also been proposed that pre-processing of antigens in apoptotic or autophagic cells could improve their cross-presentation by DC

[36,37]. Here, western blots showed that antigens were strongly degraded in apoptotic cells, while they were conserved in a native form in live cells. The degradation of antigens in apoptotic cells could have an impact on cross-presentation, making it less effective. Indeed, a dose-response experiment showed that the number of MHC class I-SIINFEKL complexes on DC was greater with live cells than with apoptotic cells as antigen-donor cells. Thus, the impact of the conservation status of antigen on cross-presentation may be considered in two ways. On the one hand, death by apoptosis or autophagy could provide pre-processed antigens, almost “ready-to-use” for DC [38,39]. On the other hand, our data show that live cells can be a source of native antigen, the correct processing of which would be under full control of the specialized DC.

Until recently, only apoptotic cells were considered as an effective cellular source of antigen for cross-presentation, and immunization protocols using DC loaded with whole tumor cells have been carried out with apoptotic tumor cells, neglecting the possibility to use live tumor cells. In a preliminary prophylactic immunization experiment where we injected purified, but unirradiated DC before tumor challenge, we suspected that despite protection against the challenge, a larger tumor in an immunized mouse than in controls might be related to a contaminating tumor cell in the DC preparation. Consequently, we chose to use strongly irradiated DC to prevent inoculation of proliferating tumor cells, and ensure safety. Irradiation of the DC did not preclude antitumor protection nor T cell responses. Therefore, live tumor cells should be taken into account as a source of antigens to load DC and improve the efficiency of tumor immunotherapy protocols, because they supply native tumor antigens that can be efficiently processed by specialized DC for cross-presentation.

## Acknowledgments

We acknowledge C.A. Dutertre, A. Blondel, B. Lucas and A. Caignard for kind advice and critical reading of the manuscript, K.L. Rock, L. Shen and the Umass for DAP-OVA cells, D. Gray (Royal Postgraduate Hospital, London) for GM-CSF-producing hybridoma, and C. Leclerc for B3Z hybridoma cells.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DM CB ALB AH VF. Performed the experiments: DM CB LV AT PL MV VF. Analyzed the data: DM CB ALB AH VF. Wrote the paper: DM CB AH VF.

## References

- Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA (2005) Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 207: 145–157.
- Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20: 621–667.
- Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, et al. (2004) Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199: 9–26.
- Kono H, Rock KL (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8: 279–289.
- Kurts C, Robinson BW, Knolle PA Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol* 10: 403–414.
- Steinman RM, Banchereau J (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449: 419–426.
- Vulink A, Radford KJ, Melief C, Hart DN (2008) Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Adv Cancer Res* 99: 363–407.
- Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, et al. (1996) Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2: 52–58.
- Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP (1996) Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 183: 317–322.
- Speetjens FM, Kuppen PJ, Welters MJ, Essahsah F, Voet van den Brink AM, et al. (2009) Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 15: 1086–1095.
- Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, et al. (1996) Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 183: 87–97.
- Palucka AK, Ueno H, Connolly J, Kerneis-Norvell F, Blanck JP, et al. (2006) Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8<sup>+</sup> T-cell immunity. *J Immunother* 29: 545–557.
- Bercovici N, Haicheur N, Massicard S, Vernel-Pauillac F, Adotevi O, et al. (2008) Analysis and characterization of antitumor T-cell response after administration of dendritic cells loaded with allogeneic tumor lysate to metastatic melanoma patients. *J Immunother* 31: 101–112.
- Salcedo M, Bercovici N, Taylor R, Vereecken P, Massicard S, et al. (2006) Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunol Immunother* 55: 819–829.
- Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Nouri-Shirazi M, et al. (2000) Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 192: 1535–1544.

16. Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, et al. (2004) Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 64: 4973–4979.
17. Lee WC, Wang HC, Hung CF, Huang PF, Lia CR, et al. (2005) Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial. *J Immunother* 28: 496–504.
18. Chang AE, Redman BG, Whitfield JR, Nickoloff BJ, Braun TM, et al. (2002) A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res* 8: 1021–1032.
19. Jenne L, Arrighi JF, Jonuleit H, Saurat JH, Hauser C (2000) Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8+ T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Res* 60: 4446–4452.
20. Toes RE, Ossendorp F, Ofringa R, Melief CJ (1999) CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med* 189: 753–756.
21. Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, et al. (2005) Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105: 2465–2472.
22. Gilboa E, Nair SK, Lyerly HK (1998) Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 46: 82–87.
23. Goldszmid RS, Idoyaga J, Bravo AI, Steinman R, Mordoh J, et al. (2003) Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma. *J Immunol* 171: 5940–5947.
24. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, et al. (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13: 54–61.
25. Lotze MT (2006) Cancer gene therapy: the power of negative thinking. *Gene Ther* 13: 191–193.
26. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G (2009) Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9: 353–363.
27. Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM (2001) Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* 166: 3717–3723.
28. Maranon C, Desoutter JF, Hoeffel G, Cohen W, Hanau D, et al. (2004) Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6092–6097.
29. Matheoud D, Perie L, Hoeffel G, Vimeux L, Parent I, et al. (2010) Cross-presentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo. *Blood* 115: 4412–4420.
30. Joly E, Hudrisier D (2003) What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol* 4: 815.
31. Shen L, Rock KL (2004) Cellular protein is the source of cross-priming antigen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3035–3040.
32. Karttunen J, Sanderson S, Shastri N (1992) Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6020–6024.
33. Kurts C, Sutherland RM, Davey G, Li M, Lew AM, et al. (1999) CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12703–12707.
34. Albert ML (2004) Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? *Nat Rev Immunol* 4: 223–231.
35. Labbarriere N, Bretaudeau L, Gervois N, Bodinier M, Bougras G, et al. (2002) Apoptotic body-loaded dendritic cells efficiently cross-prime cytotoxic T lymphocytes specific for NA17-A antigen but not for Melan-A/MART-1 antigen. *Int J Cancer* 101: 280–286.
36. Rawson PM, Molette C, Videtta M, Altieri L, Franceschini D, et al. (2007) Cross-presentation of caspase-cleaved apoptotic self antigens in HIV infection. *Nat Med* 13: 1431–1439.
37. Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, Vicencio JM, Kroemer G, et al. (2009) Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cells. *Cell Death Differ* 16: 991–1005.
38. Blachere NE, Darnell RB, Albert ML (2005) Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS Biol* 3: e185.
39. Pang B, Neijssen J, Qiao X, Janssen L, Janssen H, et al. (2009) Direct antigen presentation and gap junction mediated cross-presentation during apoptosis. *J Immunol* 183: 1083–1090.