



HAL
open science

Caractérisation des cellules dendritiques humaines BDCA3high et de leur modulation par le microenvironnement tumoral

Vincent Ollion

► **To cite this version:**

Vincent Ollion. Caractérisation des cellules dendritiques humaines BDCA3high et de leur modulation par le microenvironnement tumoral. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10163 . tel-01296985

HAL Id: tel-01296985

<https://theses.hal.science/tel-01296985>

Submitted on 1 Apr 2016

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.

N° d'ordre : 163-2015

Année 2015

Université Claude Bernard Lyon 1

THESE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN IMMUNOLOGIE

(Arrêté du 7 août 2006)

ECOLE DOCTORALE : Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement

le 24 Septembre 2015 par

Vincent OLLION

Caractérisation des cellules dendritiques humaines BDCA3^{high} et de leur modulation par le microenvironnement tumoral

Directrice de thèse : Dr. **Jenny VALLADEAU-GUILEMOND**

Membres du jury :

Mathias FAURE

Président

Nicolas BERTHO

Rapporteur

Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN

Rapporteur

Gilles UZE

Examineur

Jenny VALLADEAU-GUILEMOND

Directrice de thèse

Christophe CAUX

Directeur du laboratoire

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

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

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOSNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie en particulier Nicolas Bertho et Marie-Caroline Dieu-Nosjean d'avoir évalué avec attention mon manuscrit et de m'avoir ainsi aidé à l'améliorer grâce à leurs critiques constructives. Je remercie également Gilles Uzé pour sa participation en tant qu'examineur et Mathias Faure pour avoir accepté le rôle de Président du Jury. Je vous suis sincèrement reconnaissant d'avoir consacré une part de votre temps si précieux pour discuter de mon travail. J'en profite pour remercier Marc Dalod, Elodie Segura et Virgine Petrilli dont la participation à mes comités de thèse a contribué à l'avancement de mon projet.

Je remercie naturellement Jenny et Christophe de m'avoir offert l'opportunité de rejoindre l'équipe «Caux». Jeune étudiant en fin de première année de Master, j'avoue avoir été impressionné par l'entretien marathon effectué avec les différents chercheurs de l'équipe, mais j'ai surtout été séduit par les différents projets développés au sein de l'équipe. Ce fut ainsi une réelle joie de rejoindre le sous groupe « cross-presentation » et j'espère qu'après ces cinq années, Isabelle aura su me pardonner d'avoir alors préféré le côté « plus humain » de Jenny.

Merci à toi, Jenny, tout d'abord pour ce côté humain qui dépassait largement la nature du projet scientifique. J'ai eu la chance d'être ton étudiant dans une période riche en événements heureux pour toi (un mariage et deux grossesses !!). J'ai ainsi pu profiter de ta bonne humeur presque permanente. Dans un premier temps, à partir de ton énième café matinal puis plus précocement lorsque tu es devenue maman (peut-être avais tu alors déjà bu suffisamment de cafés avant même d'arriver au labo). Merci aussi pour toute l'expérience que tu m'as transmis, pour ton enthousiasme scientifique (qui m'a convaincu sans difficulté que les DC BDCA3 étaient rares mais que l'on arriverait malgré tout à les étudier) et pour la rigueur que tu as tenté de m'inculquer ... Mais par dessus tout, un énorme merci pour ta disponibilité, ta patience et ton soutien dans les moments difficiles.

Christophe, je te remercie de m'avoir accueilli dans ton équipe. Ce fut une chance pour moi de travailler dans cet environnement toutes ces années. La richesse des thématiques développées dans l'équipe m'a permis d'améliorer grandement mes connaissances scientifiques, en particulier en Immunologie où j'étais loin d'exceller. Cet environnement est rendu possible grâce à l'ampleur de tes connaissances et ton abnégation. Ceci associé à ton intégrité, ta modestie, ton exemplarité et au temps que tu sais nous accorder en faisant un détour par les pièces de culture lorsque tu quittes le labo, font que c'est tout sauf un hasard si les lumières du Cheney D 3ème étage sont généralement les dernières à s'éteindre. Je te remercie enfin pour tous les conseils avisés et pour toutes les idées que tu as partagées avec nous lors des réunions et qui m'ont permis d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions.

Un merci également à Florence et Anne-Claire pour m'avoir appris à manipuler toutes ces cellules immunitaires si fragiles. Merci Florence de m'avoir transmis une part de tes connaissances avant de partir, et un énorme merci à Anne Claire pour m'avoir épaulé dans l'étude si délicate de la présentation-croisée et des DC BDCA3. Enfin, merci Margaux pour ton aide également très précieuse. Et comme le destin a voulu me voir entouré de jeunes mamans, je vous souhaite à toutes les trois, ainsi qu'à Jenny, beaucoup de bonheur avec vos enfants.

Une pensée également pour Colette, toujours présente pour partager son expérience et ses gourmandises périgourdines avec les étudiants et les chercheurs de l'équipe. Il est temps maintenant pour vous de profiter de votre retraite bien méritée.

Je remercie Estelle qui a toujours répondu présente pour m'aider à redresser tous ces petits points qui ne veulent jamais s'aligner correctement. Grâce à toi je peux me la raconter en pièce de

cytométrie en disant que je sais faire du marquage multiparamétrique. Ce n'est peut être pas très utile en dehors du Centre mais c'est quand même classe. Merci aussi d'avoir supporté mon humour particulier toutes ces années et de ne pas avoir demandé à changer de bureau (à moins que les réunions fréquentes au Cheney A ...).

Je remercie également « zaza » (ouais j'ai osé) de m'avoir appris à utiliser ces grosses boîtes remplies de lasers. Elles fonctionnent finalement plutôt bien et ne nécessitent pas toutes, comme le cyan, des savoirs en chamanismes pour ne pas tomber en panne. Merci également pour tous ces tris laborieux de cellules dendritiques, et pour toutes nos discussions qui permettaient de voir le temps passer plus vite au FACS.

Merci aux thésards de l'équipe, anciens ou nouveaux, qui ont toujours maintenu l'ambiance au top dans l'équipe.

Tout d'abord Nelly, avec qui j'aurai partagé presque toute mon aventure dans l'équipe. Je te souhaite un maximum de réussite pour la suite. Elena, qui a toujours une énergie digne de sa chef et Coline que l'on commence à entendre plus distinctement. Merci Amélien et Nicolas pour tous les moments de déconne, de remises en forme sportive et pour nos WE ski mémorables. Je n'oublie pas non plus, Amélien, ce 14 Février passé à tes côtés. Merci Rodrigo pour ta simplicité et ta générosité. J'espère avoir l'occasion de venir au Brésil d'ici quelques mois pour vous revoir toi et ta femme. Merci François pour ton caractère exceptionnel qui a sans nul doute amené du piment à l'open space. Je te suis également reconnaissant de m'avoir offert une oreille attentive lorsque ma fougue révolutionnaire était en ébullition. Enfin, merci Julien pour ton amour de la Science que tu partageais si bien et j'espère te revoir bientôt pour une bonne séance de grimpe.

Une pensée également pour les anciens thésards, Hiba, Inti, Manu Ari, Jennifer, Aurélien, Armelle, Marion, Bastien ainsi que pour ceux du Cheney A que je n'ai pas eu le temps de bien connaître.

Je remercie aussi tous les chercheurs de l'équipe. Nathalie et Marie Cécile pour votre dynamisme électrique (je ne saurais jamais s'il vaut mieux manger sans gluten ou riche en chocolat). Christine pour ta gestion admirable des comptes qui nous permet de toujours pouvoir commander l'anticorps dont on a besoin et pour ton humeur changeante à laquelle on s'attache finalement très facilement. Bertrand pour ta rigueur et ton sens de la décoration (si un jour j'ai besoin de refaire une pièce chez moi je saurai que tu adores le bricolage). Isabelle pour avoir su te retenir de me charrier pendant plusieurs années avec « le côté plus humain de Jenny » et pour m'avoir appris à mettre au pluriel le mot « mousse » dans mes présentations orales. Laurent pour m'avoir appris qu'il ne fallait jamais faire confiance aux fournisseurs et que chaque protocole, ou appareil, comporte des failles intéressantes à décortiquer. Sandrine pour m'avoir inculqué ton expérience toute particulière de l'accouchement. Et bien sûr, merci à vous tous pour votre travail de recherche admirable qui permet d'envisager un avenir de plus en plus positif pour les patients touchés par le cancer.

Un grand merci à toutes les techniciennes. Céline la reine du Luminex, des normes de sécurité, des ELISA, etc. Dominique sans qui le plastique viendrait rapidement à manquer. Franceline dont la rigueur permet d'améliorer progressivement la gestion des tumeurs. Ana pour la gestion des commandes d'anticorps. Lyvia pour sa bonne humeur et son investissement (presque excessif). Merci aussi à Adeline, Agnès, Axelle et Anne-Catherine dont la présence au Cheney D 3ème étage était trop rare, surtout ces derniers temps, pour que je puisse vous connaître suffisamment.

Une grosse pensée pour tous ceux qui nous ont quittés depuis mon arrivée et que je n'ai pas encore cités ainsi que pour ceux arrivés depuis peu. Je remercie ainsi Thomas, Sandra, Marine, Anthony, Céline, Marie, Cathy, Nadège, Renaud, Carmela qui ont tous laissé une trace dans l'équipe.

Je souhaite par ailleurs plein de réussite et de bonheur dans l'équipe à Julie, Marion, Akira et Suzanne ainsi qu'à Pauline qui rejoindra je l'espère très bientôt le groupe de Marie Cécile.

Merci à tous les étudiants de passage et merci à tout le reste de l'équipe présente ou passée (les VMS), et en particulier les cliniciens qui permettent de donner un sens concret à notre travail.

Je remercie également les différentes personnes avec qui j'ai collaboré, en particulier Marc Dalod et Sreekumar Balan qui m'ont offert l'opportunité de venir découvrir leur laboratoire de recherche durant quelques jours et qui m'y ont merveilleusement bien accueilli.

Je n'oublie pas non plus tout ce que m'a apporté le CRCL, en termes de ressources matérielles et d'accès à une variété de connaissance scientifiques au travers des séminaires de département et des présentations de chercheurs ou médecins externes ou internes au Centre.

Merci au Labex/DEVweCAN et au comité de Savoie de la Ligue contre le Cancer d'avoir financé mes quatre années de doctorat.

Merci à mes partenaires de foot pour tous ces bons moments sur et en dehors du terrain. Merci de m'avoir sélectionné toutes ces années malgré mes problèmes indéniables de coordination entre jambe droite, jambe gauche et ballon.

Merci à tous mes amis de longues dates ou rencontrés depuis peu et dont le soutien m'a permis de progresser durant toutes ces années. Je sais que vous saurez vous reconnaître et j'espère savoir vous rendre tout ce que vous m'apporter.

Enfin je remercie du fond du cœur ma famille que j'ai toujours sentie à mes côtés malgré l'éloignement et qui a toujours cru en moi. Merci à ma maman, ma petite sœur et ma grande tante.

Table des matières

ABRÉVIATIONS	5
PREAMBULE.....	9
INTRODUCTION	12
CHAPITRE I : SPECIFICITES DES CELLULES DENDRITIQUES CONVENTIONNELLES BDCA3 ^{HIGH}	12
I. Découverte, caractéristiques et diversité des cellules dendritiques	12
A. Définition des cellules dendritiques.....	12
1) Découverte et caractérisation	12
2) Caractéristiques principales.....	12
3) Focus sur la présentation antigénique.....	13
B. Diversité des cellules dendritiques.....	15
1) Classification des cellules dendritiques.....	15
2) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	16
3) Les cellules dendritiques des tissus périphériques	17
4) Les cellules dendritiques résidentes des organes lymphoïdes secondaires	21
C. Culture in vitro des cellules dendritiques humaines.....	23
1) À partir de monocytes	23
2) À partir de progéniteurs CD34 ⁺	23
3) Perspectives thérapeutiques.....	24
II. Caractéristiques des cellules dendritiques conventionnelles BDCA3 ^{high} et homologies avec les cellules dendritiques CD8α ⁺ et les cellules CD103 ⁺ de souris	25
A. Homologies avec les cellules dendritiques CD8α ⁺ et les cellules dendritiques CD103 ⁺ de souris	25
1) Homologies phénotypiques et transcriptomiques.....	25
2) Homologies fonctionnelles.....	25
3) Homologies développementales	26
B. Spécificités des cellules dendritiques conventionnelles BDCA3 ^{high}	27
1) Necl2 et XCR1 : « cross-talk » avec les cellules NK et les lymphocytes T CD8	27
2) Clec9A : reconnaissance spécifique des cellules nécrotiques.....	28
3) Absence d'expression de SIRPα : meilleure internalisation d'antigènes issus de cellules tumorales	29
4) Production d'IFN-λ : intérêt dans le cadre d'HCV et d'autres pathologies	29
III. Interférons lambda	29
A. Découverte et caractéristiques générales.....	29
1) Découverte des interférons.....	29
2) Découverte des interférons lambda	30
B. Régulation des interférons lambda	30
1) Induction des interférons lambda.....	30
2) Inhibition de la production des interférons lambda.....	32
C) Activité biologique des interférons lambda.....	32
1) Engagement du récepteur et transduction du signal	33
2) Activité antivirale	34
3) Activité anti-tumorale	35
4) Immunorégulation	37
CHAPITRE II : SYSTEME IMMUNITAIRE ET TUMEURS : FOCUS SUR LES CELLULES DENDRITIQUES	39
I. Mise en évidence des cellules dendritiques dans les tumeurs solides	40
A. Présence des cellules dendritiques dans les tumeurs	40
B. Corrélation entre maturité des cellules dendritiques et bon pronostic.....	41
C. Recrutement des cellules dendritiques	42
II. Mécanismes d'échappement aux cellules dendritiques	42
A. Altérations des cellules circulantes.....	42
B. Induction de l'apoptose.....	43
C. Inhibition de la différenciation, de la maturation et de la présentation antigénique	43

D.	Altération de la production de cytokines	45
E.	Altération des lymphocytes T.....	45
III.	Mécanismes d'immunosurveillance	47
1)	Rôle de l'interféron de type I et des pDC ?	47
2)	Rôle des cellules dendritiques CD8 α^+ ?	47
	RATIONNEL ET OBJECTIFS DE LA THESE	49
	RESULTATS	52
	ARTICLE 1 (EN PREPARATION)	52
	ARTICLE 2	73
	ARTICLE 3	89
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	107
I.	Induction de la présentation croisée d'antigène d'origine cellulaire	107
A)	Exploration des mécanismes d'induction de la présentation croisée d'antigène cellulaire	109
B)	Supériorité des cellules dendritiques BDCA3 ^{high} pour la présentation croisée d'antigène ?.....	110
II.	Cellules dendritiques BDCA3 ^{high} associés aux tumeurs	111
A)	Validation de l'identité des cellules dendritiques BDCA3 ^{high} associées aux tumeurs	111
B)	Localisation, maturation et fonction des cellules dendritiques BDCA3 ^{high} associées aux tumeurs.....	112
C)	Recrutement des cellules dendritiques BDCA3 ^{high} dans les tumeurs et leur rôle potentiel ?	114
D)	Rôle pro- ou anti-tumorale des cellules dendritiques BDCA3 ^{high} associées aux tumeurs ?	114
E)	Stratégies thérapeutiques basées sur les cellules dendritiques BDCA3 ^{high} ?	116
III.	Autres questions liées aux cellules dendritiques BDCA3 ^{high}	117
A)	Interactions entre les cellules dendritiques BDCA3 ^{high} et les cellules NK	117
B)	Rareté des cellules dendritiques BDCA3 ^{high} et importance physiologique de cette sous population ?.....	118
	REFERENCES	121

Abréviations

A

ADCC : Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity

Ag : Antigène

AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor

B

Batf : Basic leucine zipper transcription factor

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

Bcl-XL : B-cell lymphoma-extra large

BDCA : Blood Dendritic Cell Antigen

BLIMP-1 : B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1

Bst2 : Bone marrow stromal cell antigen 2

C

CD : Cluster de différenciation

cDC : Cellule dendritique conventionnelle

Clec9A : C-type lectin domain family 9 member A

CLR : C-type Lectin Receptor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CpG : Cytosine phosphate Guanine

CRTAM : Class-I MHC-restricted T-cell associated molecule

CSF-1R : Colony Stimulating Factor-1 Receptor

CTL : Cytotoxic T Lymphocyte

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4

D

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern

DC : Cellule dendritique

DC-LAMP : Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein

E

EMCV : Encephalomyocarditis Virus

ERAD : Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation

ERK : Extracellular signal-regulated kinase-1

F

Flt3 : Fms-related tyrosine kinase 3

G

G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor

GILT : gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

H

HCV : Hepatitis C Virus

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HSE : Herpes Simplex Encephalitis

Hsp : Heat shock protein

HSV : Herpes Simplex Virus

I

ICOS-L : Inducible Costimulatory Molecule Ligand

IDO : Indoleamine-2,3-dioxygenase

IFN : interféron

IFNAR : *IFN-alpha Receptor*

IFNLR : *IFN-lambda Receptor*

IL : *interleukine*

ILT7 : *Immunoglobulin Like Transcript 7*

iNOS : *inducible Nitric Oxide Synthase*

IPS : *cellules souches pluripotentes induites*

IRF : *Interferon Regulatory Factor*

ISG : *Interferon Stimulated Gene*

ISGF3 : *Interferon Stimulated Gene Factor 3*

ISRE : *Interferon Stimulated Response Element*

J

JAK : *Janus Tyrosine Kinase*

JNK : *c-Jun N-terminal kinase*

L

LCMV : *Lymphocytic choriomeningitis virus*

LPS : *Lipopolysaccharide*

Ly6C : *Lymphocyte antigen 6C*

M

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

M-CSF : *Macrophage Colony-Stimulatory Factor*

MDM : *Monocyte-derived Macrophages*

MDSC : *Myeloid-Derived Suppressor Cells*

MoDC : *Monocyte-derived Dendritic Cells*

N

Necl2 : *Nectin-like molecule 2*

NK : *Natural Killer*

NOX2 : *NADPH Oxydase 2*

P

PAMP : *Pathogen Associated Molecular Pattern*

PARP : *Poly ADP Ribose Polymerase*

PD-1 : *Programmed cell-Death 1*

PD-L1 : *Programmed Death-Ligand 1*

pDC : *Cellule dendritique plasmacytoïde*

PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*

Pin-1 : *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1*

PRDI : *Positive Regulatory Domain I*

PGE2 : *Prostaglandine E2*

PolyI:C : *Polyinosinic-polycytidylic acid*

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

R

RIG-I : *Retinoic acid-inducible gene 1*

RLR : *RIG-I Like Receptor*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RSK1 : *Ribosomal S6 Kinase 1*

S

SCF : *Stem Cell Factor*

SH2 : *Src-Homology 2*

SiglecH : *Sialic acid binding immunoglobulin-like lectin H*

SIRPa : *Signal Regulatory Protein alpha*

SOCS : *Suppressor Of Cytokine Signaling*

STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*

T

TAP : *Transporter associated with antigen processing*

TCGA : *The Cancer Genome Atlas*

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

TLDA : *Taqman Low Density Array*

TLR : *Toll-Like Receptor*

Th : *T helper*

TIM-3 : *T cell Ig and mucin protein-3*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TPO : *Thrombopoietin*

TRAIL : *Tumor Necrosis Factor-Alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

TRIF : *TIR domain-containing adapter inducing IFN-Beta*

Treg : *Lymphocyte T régulateur*

U

USP18 : *Ubiquitin Specific Peptidase 18*

V

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VSV : *Vesicular Stomatitis Virus*

Z

ZEB-1 : *Zinc finger E-box Binding homeobox 1*

Préambule

Préambule

Les premières observations de maladies cancéreuses remontent à la description d'ostéosarcomes chez des momies égyptienne et à la distinction entre tumeurs bénignes et malignes par Hippocrate. Durant le Moyen-âge, quelques avancées chirurgicales eurent lieu, notamment concernant la résection des tumeurs selon leur stade d'avancement, mais les grandes découvertes n'eurent lieu qu'à partir du XVI^{ème} siècle lorsque les autopsies furent autorisées par l'Église. Au XVIII^{ème} siècle, Henri François le Dran décrit alors l'invasion des canaux et des ganglions lymphatiques par les cellules tumorales et Xavier Bichat fit émerger la notion de métastases cancéreuses. À partir du XX^{ème} siècle, les avancées s'enchaînèrent, avec la découverte du rôle des mutations génétiques, de l'angiogenèse, du métabolisme énergétique... et l'élaboration de traitements basés sur la chimiothérapie, la radiothérapie ou les transplantations avant l'application plus récente de thérapies ciblées telles que le Trastuzumab ciblant la protéine HER2 dans le cancer du sein.

En parallèle, depuis la découverte du vaccin contre la rage par Louis Pasteur, de nombreux travaux participèrent à la caractérisation de plus en plus fine du système immunitaire. Le XX^{ème} siècle vit ainsi l'émergence de nombreux concepts tels que les notions d'immunité cellulaire et humorale, innée et adaptative, la tolérance, l'orientation de la réponse immunitaire... et de différents facteurs essentiels au développement de réponses immunitaires tels que le complexe majeur d'histocompatibilité ou les cytokines ainsi que les lymphocytes, les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les cellules Natural Killer (NK).

L'importance du système immunitaire dans l'immunosurveillance des tumeurs est devenue apparente au milieu du XX^{ème} siècle. Les DC participent notamment à l'induction d'une réponse anti-tumorale en sécrétant une variété de cytokines agissant à la fois sur les acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative et en présentant les antigènes (Ag) dérivés de tumeurs aux lymphocytes T. Elles induisent ainsi la mise en place d'une réponse T cytotoxique spécifique des cellules tumorales et d'une réponse mémoire réduisant le risque de rechute. Aujourd'hui, l'amélioration des connaissances concernant les mécanismes d'immunoéchappement permet de mettre en place des immunothérapies de plus en plus efficaces basées sur la réactivation du système immunitaire. Ainsi, l'avenir des thérapies anticancéreuses consistera probablement à combiner des thérapies ciblant à la fois les cellules tumorales et les acteurs de l'immunité.

Les travaux de notre équipe visent à approfondir, chez l'homme, les mécanismes impliqués dans l'immunosurveillance ainsi que dans l'immunoéchappement des tumeurs de sein, des tumeurs d'ovaire et des sarcomes. Au sein de cette thématique, je me suis attaché à mieux caractériser la sous population de DC conventionnelles (cDC) BDCA3^{high}. Cette population possède en effet des particularités potentiellement intéressantes pour la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace liées à leur homologie avec les DC murines CD8 α ⁺. Ces dernières sont connues pour infiltrer les tumeurs et pour

leur rôle majeur dans l'activation d'une réponse T cytotoxique par présentation croisée d'Ag. Les DC BDCA3^{high} et CD8α⁺ expriment également des récepteurs spécifiques pouvant être ciblés afin d'activer les fonctions anti-tumorales de ces cellules.

Chez l'homme, peu de données existent sur les DC BDCA3^{high} des tissus, et encore moins sur celles infiltrant les tumeurs, en raison de leur rareté et du manque d'outils développés pour les étudier spécifiquement. Mon travail de thèse a ainsi consisté à mieux les caractériser, en étudiant d'une part leur capacité à présenter des Ag cellulaires *via* le processus de présentation croisée et en évaluant d'autre part leur présence ainsi que leur fonctionnalité dans les tumeurs de sein.

Dans ce manuscrit, je commencerai par une **introduction** au sein de laquelle je décrirai tout d'abord les caractéristiques principales des DC en me focalisant plus particulièrement sur les particularités des DC BDCA3^{high} puis je présenterai un état des lieux des connaissances concernant les DC infiltrant les tumeurs et les principaux mécanismes à l'origine de leur altération dans le microenvironnement tumoral. Je présenterai ensuite mes **résultats** et le contexte scientifique dans lequel a été élaboré mon projet de thèse. En quelques mots, mes travaux ont abouti à la mise en évidence de la présence de DC BDCA3^{high} dans les tumeurs de sein et d'un défaut de production de cytokines par les DC associées aux tumeurs comparativement à celles circulants dans le sang. En particulier, les DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs produisent moins d'IFN-λ après stimulation, mais continuent d'en produire, au contraire des pDC qui n'en produisent plus du tout lorsqu'elles proviennent de tumeurs. Enfin, à l'aide d'un modèle *in vitro*, nous avons montré que les surnageants de tumeurs contiennent des facteurs solubles inhibant la sécrétion d'IFN-λ par les DC BDCA3^{high}. L'ensemble de ces résultats suggèrent ainsi une immunosuppression partielle des DC BDCA3^{high} par le microenvironnement tumoral (Article 1, en préparation). D'autre part, j'ai collaboré avec l'équipe de Marc Dalod pour caractériser en détails des DC BDCA3^{high} obtenus *in vitro* à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺, d'après un protocole de différenciation publié peu de temps avant le début de ma thèse. Ces travaux nous ont permis de nous assurer de leur homologie avec les DC BDCA3^{high} du sang et de démontrer leur capacité à sécréter de l'IFN-λ et à présenter très efficacement des Ag d'origine cellulaire (Article 2, J Immunol 2014). J'ai finalement participé à l'élaboration d'un article montrant l'importance des cellules NK dans l'induction de la présentation croisée d'Ag, notamment par les DC BDCA3^{high}, *via* l'IFN-γ et le TNFα (Article 3, Int J Cancer 2015). Cependant, les cellules NK et la présentation croisée ne seront pas introduits en détails pour éviter une trop grande dispersion dans l'introduction. L'apport de ces résultats vis-à-vis de la littérature actuelle ainsi que les perspectives à envisager suite à mes travaux seront finalement examinés dans la **discussion**.

Introduction

Introduction

Chapitre I : Spécificités des cellules dendritiques conventionnelles BDCA3^{high}

I. Découverte, caractéristiques et diversité des cellules dendritiques

A. Définition des cellules dendritiques

1) Découverte et caractérisation

Les DC, dont le nom découle de leur forme étoilée caractéristique, furent observées pour la première fois par Paul Langerhans en 1868 chez l'homme avant d'être décrites de façon plus détaillée chez la souris dans les années 1970 (Steinman and Cohn, 1973; Steinman and Cohn, 1974; Steinman et al., 1975). L'approfondissement de leur caractérisation fut longtemps ralenti par les difficultés techniques liées à leur rareté et au manque de marqueurs permettant de les identifier spécifiquement. La mise en place de protocoles offrant la possibilité de générer des DC fonctionnelles *in vitro* à partir de progéniteurs ou de précurseurs fut ainsi une étape importante dans l'amélioration des connaissances sur les DC au cours des vingt dernières années (Caux et al., 1992; Romani et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Phénotypiquement, les DC expriment la molécule CD45 (lymphocyte common antigen) comme tous les leucocytes et sont dénuées des marqueurs de lignage cellulaires tels que CD3 (lymphocytes T), CD14 (monocytes), CD19 (lymphocytes B), CD16 et CD56 (cellules NK). Nous verrons par la suite qu'il existe une grande variété de DC qui peuvent être distinguées à l'aide de marqueurs plus ou moins spécifiques, tels que CD1c (BDCA1), CD141 (BDCA3) et Clec4E (BDCA2) permettant de définir respectivement les cDC BDCA1⁺ et BDCA3⁺ ainsi que les DC plasmacytoïdes (pDC) chez l'homme.

2) Caractéristiques principales

In vivo, les DC ne représentent qu'une faible proportion des leucocytes et possèdent un pouvoir prolifératif restreint. Leur renouvellement est cependant régulier afin de garder un stock constant de cellules dont la présence est essentielle pour l'initiation et l'orientation de la réponse immunitaire (Hart, 1997; Nussenzweig et al., 1980; Steinman et al., 1974; Steinman et al., 1983). Les DC ont en effet la particularité de stimuler très efficacement les lymphocytes T naïfs et sont donc considérées comme des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles. Les Ag internalisés par les DC provenant d'une part de pathogènes mais également de cellules du soi mourantes ou d'Ag protéiques circulants, les DC jouent un double rôle. En situation non pathologique, les DC immatures sont impliquées dans la tolérance centrale et périphérique des lymphocytes T pour éviter les réponses auto-immunes inappropriées dans un contexte non inflammatoire. Les DC induisent alors la délétion ou l'anergie des lymphocytes T et favorisent le développement de lymphocytes T régulateurs (Treg) (Mowat, 2003; Steinman et al., 2003). Au contraire, en présence de pathogènes, les DC induisent une

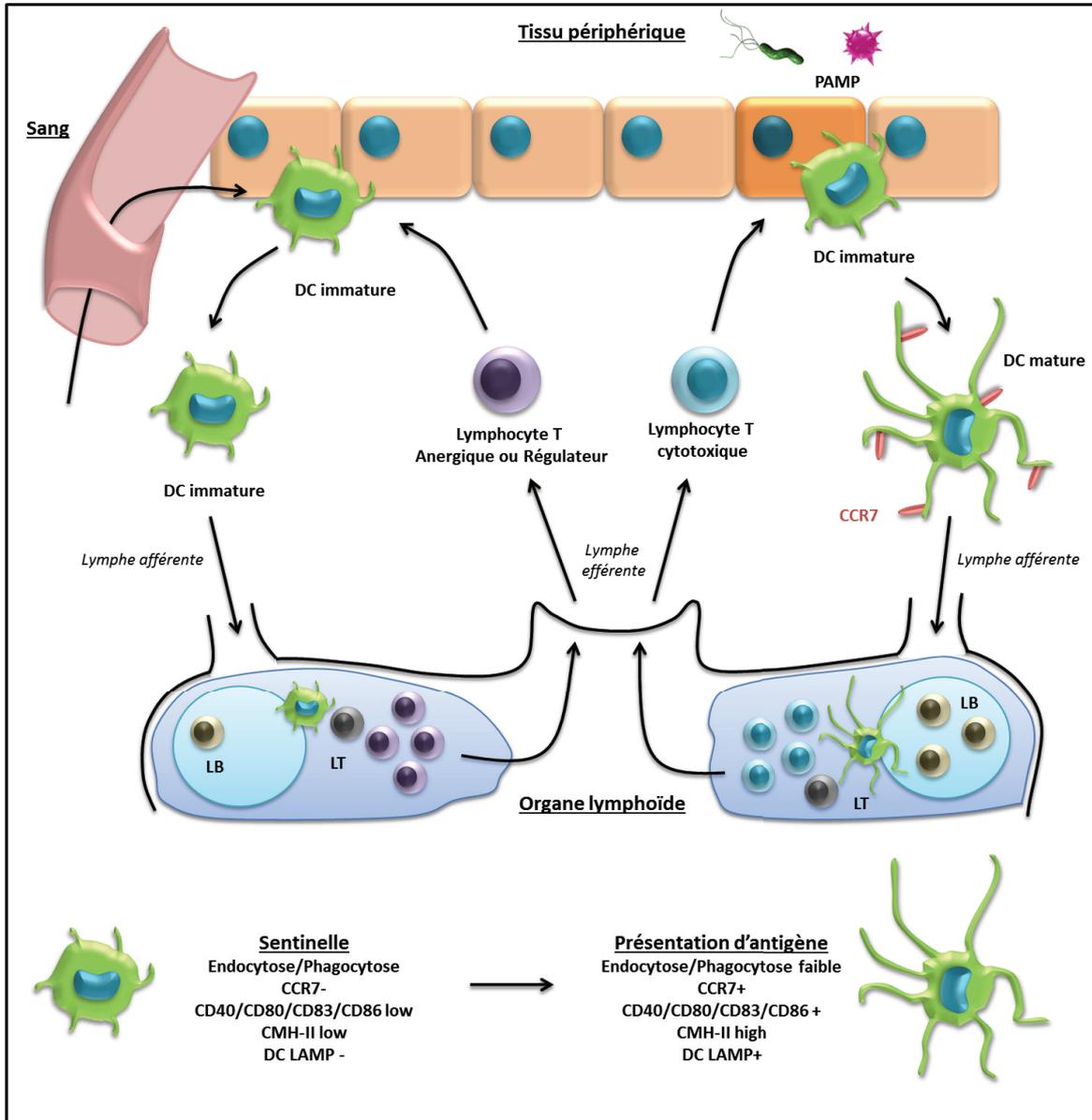


Figure 1 : A l'état basal (à gauche), les DC immatures jouent le rôle de sentinelles au sein des tissus périphériques et des organes lymphoïdes. La reconnaissance d'Ag du soi mène alors à l'anergie, la délétion ou la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs. En présence de pathogènes (à droite), les DC vont exprimer CCR7 et migrer par la lymphe afférente jusqu'aux organes lymphoïdes drainant le site infecté. Le CMH-II et différents facteurs de costimulation vont également être surexprimés pour permettre l'activation des lymphocytes T et des lymphocytes B. Ces derniers vont finalement migrer par la lymphe efférente jusqu'au site infecté.

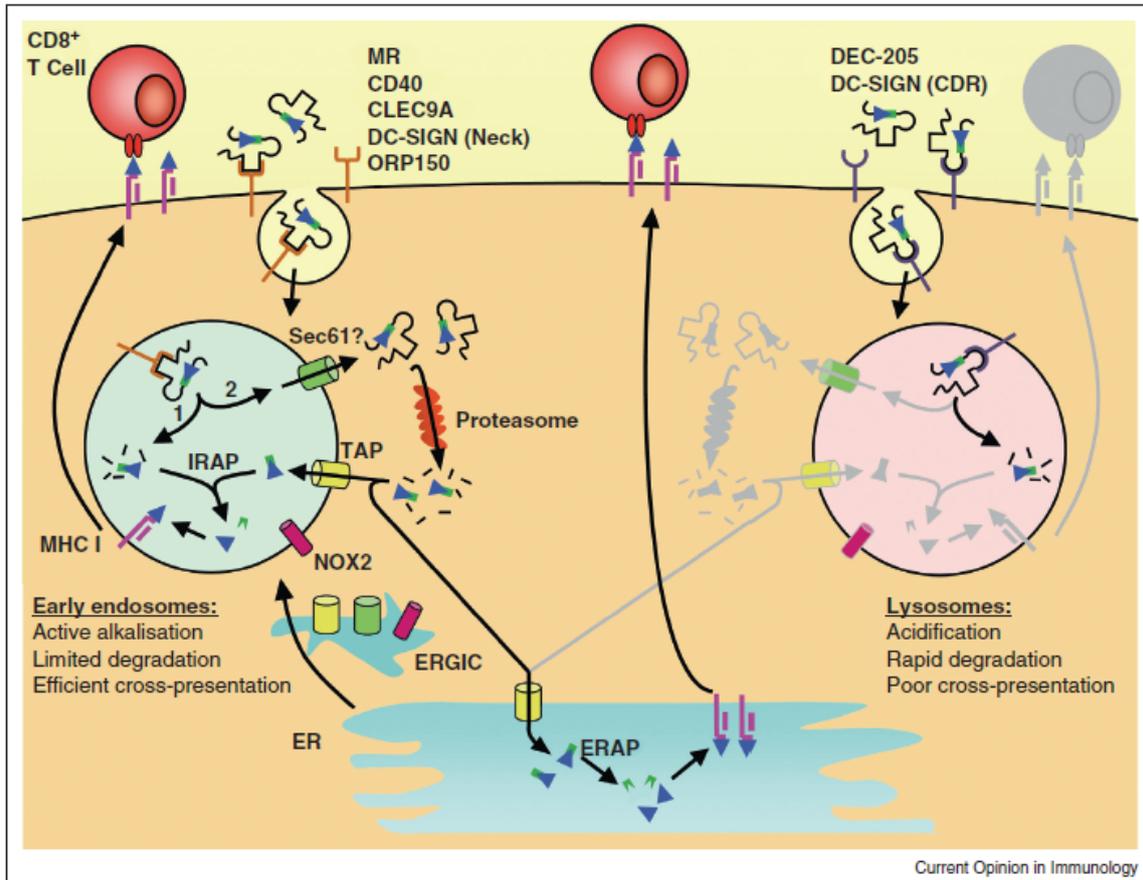
réponse immunitaire appropriée. En effet, les DC immatures possèdent une forte capacité d'endocytose et sont dotées d'un panel de récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptor) spécialisés dans la détection de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) ou aux dommages cellulaires (DAMP), dont les mieux caractérisés sont les TLR (Toll-like receptors) et les CLR (C-type lectin receptors) (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Sancho and Reis e Sousa, 2013; Takeda et al., 2003). Ainsi, en présence de signaux de danger ou de cytokines pro-inflammatoires, les DC vont évoluer vers un phénotype mature caractérisé notamment par une modulation de l'expression de leurs récepteurs de chimiokines. En particulier, elles vont exprimer CCR7 (C-C chemokine receptor type 7) afin de migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (Caux et al., 2000). En parallèle, les DC vont accroître l'expression de molécules de costimulation associées à la présentation des Ag aux lymphocytes T et intensifier la production de cytokines impliquées dans l'orientation de la réponse immunitaire (Banchereau and Steinman, 1998; Banchereau et al., 2000; Mellman and Steinman, 2001). Les cytokines sécrétées vont dépendre des stimuli rencontrés et de la sous population de DC activée. Les pDC sont par exemple connues pour produire de grande quantité d'interférons (IFN) de type I après stimulation (Siegal et al., 1999), mais les DC BDCA3^{high} sont également capable d'en produire en cas d'engagement du TLR3 (Jongbloed et al., 2010). L'origine tissulaire des DC est également importante puisque les DC BDCA1⁺ du sang sont les plus grandes productrices d'IL-12p70 lorsqu'elles sont activées avec un ligand de TLR4 ou de TLR7/8 (Nizzoli et al., 2013). Cependant, aucune sécrétion n'est détectée lorsque ces DC sont issues de la peau (Haniffa et al., 2012).

Ces données sont résumées dans la [Figure 1](#).

3) Focus sur la présentation antigénique

a) Voies de présentation antigénique

Les DC expriment à la fois le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II et peuvent ainsi présenter les Ag aux lymphocytes T CD8 et aux lymphocytes T CD4 (Mantegazza et al., 2013). Classiquement, le CMH de classe II permet aux DC de présenter des Ag exogènes, issus de microbes, de cellules infectées ou de cellules tumorales mourantes, aux lymphocytes T CD4. L'autophagie permet quant à elle de présenter des Ag endogènes via le CMH de classe II mais participerait également à la présentation d'Ag exogènes en permettant une fusion optimale des phagolysosomes (Kondylis et al., 2013; Lee et al., 2010). Deux autres voies permettent aux DC de présenter des Ag aux lymphocytes T CD8 en l'apprêtant sur le CMH de classe I. Tout d'abord, comme toutes les cellules nucléées, elles peuvent présenter directement des Ag endogènes et viraux lorsqu'elles sont infectées. De plus, elles sont capables de présenter des Ag exogènes provenant de cellules infectées ou tumorales mourantes par « présentation croisée d'Ag » (Segura and Amigorena, 2015). Une dernière voie, appelée « cross-dressing », leur permet enfin d'acquérir des Ag préalablement apprêtés sur le



(Schuette et al., 2014)

Figure 2 : Schéma des principales voies de présentation croisée d'Ag. Les Ag extracellulaires sont dirigés vers les lysosomes ou les endosomes précoces. Dans ces derniers, l'acidification est ralentie grâce au recrutement de NOX2 ce qui permet une meilleure présentation croisée selon deux mécanismes. 1) Pour la voie vacuolaire, les Ag sont dégradés par des protéases endosomales avant d'être chargés sur les molécules MHC-I pour être présenté aux lymphocytes T CD8. 2) Pour la voie cytosolique, les Ag sont transportés dans le cytoplasme pour être dégradés par le protéasome, puis les peptides dérivés de cette dégradation sont transportés dans les endosomes grâce aux protéines TAP pour être chargés sur les molécules MHC-I. Une voie alternative passe également par le transport des peptides et leur chargement sur les molécules MHC-I dans le reticulum endoplasmique.

CMH de classe I par une autre cellule et de le présenter également aux lymphocytes T CD8 (Nakayama, 2014).

b) *Présentation croisée d'antigène*

Nous allons légèrement approfondir la voie de présentation croisée d'Ag car celle-ci est essentielle pour l'induction d'une réponse T cytotoxique spécifique dirigée notamment contre les cellules tumorales (Figure 2). Tout d'abord, une variété de récepteurs permettent la reconnaissance d'Ag sous différentes formes et participent plus ou moins à leur orientation vers des compartiments facilitant la présentation croisée d'Ag (Sancho and Reis e Sousa, 2013). Un environnement endolysosomal alcalin permet en effet aux épitopes de ne pas être dégradés trop rapidement et d'être ainsi présentés plus efficacement aux lymphocytes T CD8 (Burgdorf et al., 2007). Ainsi, des Ag complexés à des anticorps dirigés contre le récepteur au mannose (CD206) ou la protéine de costimulation CD40 sont dirigés vers les endosomes précoces favorisant la présentation croisée, contrairement à DEC205 (CD205) qui les dirige vers des endosomes plus tardifs (Chatterjee et al., 2012). Cependant, les DC BDCA3^{high} chez l'homme sont malgré tout capables de présenter efficacement des Ag via DEC205 (Cohn et al., 2013). Les DC BDCA3^{high} expriment en outre spécifiquement la lectine Clec9A à leur surface ce qui leur permet d'internaliser efficacement les Ag provenant de cellules mourantes (Schreibelt et al., 2012). NOX2 (NADPH Oxydase 2) joue également un rôle essentiel dans la présentation croisée d'Ag en maintenant un pH basique dans les endolysosomes.

Une fois les Ag internalisés, deux voies de présentation croisée sont décrites. La première, appelée vacuolaire, consiste en la dégradation par les protéases lysosomales des Ag avant leur apprêtement sur le CMH de classe I. La deuxième, considérée comme plus pertinente, implique quant à elle un transfert actif des Ag du compartiment d'internalisation jusqu'au cytosol pour permettre leur dégradation par le protéasome. En particulier, le complexe GILT (γ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase) permet le dépliement des protéines alors que Sec61 et p97, toutes deux associées au complexe ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation), sont respectivement impliquées dans la formation des pores et dans l'apport d'énergie indispensable au transfert actif des protéines dépliées. Une fois transférées dans le cytoplasme, Hsp90 (Heat shock protein 90) permet le ciblage des protéines vers le protéasome, complexe enzymatique qui clive les protéines en peptides. En cas de réponses immunitaires et au sein des cellules hématopoïétiques, se met en place un immunoprotéasome qui permet l'amélioration de la qualité et de la quantité des peptides générés pour la présentation via le CMH de classe I (Basler et al., 2013). Enfin, les peptides sont transférés à nouveau dans les endosomes via les protéines TAP (Transporter associated with antigen processing) pour être apprêté sur les CMH de classe I avant leur présentation aux lymphocytes T CD8 (Schuette and Burgdorf, 2014). En résumé, la capacité d'une cellule à effectuer la présentation croisée dépend à la fois du panel de récepteurs qu'elle exprime à sa surface et de sa machinerie

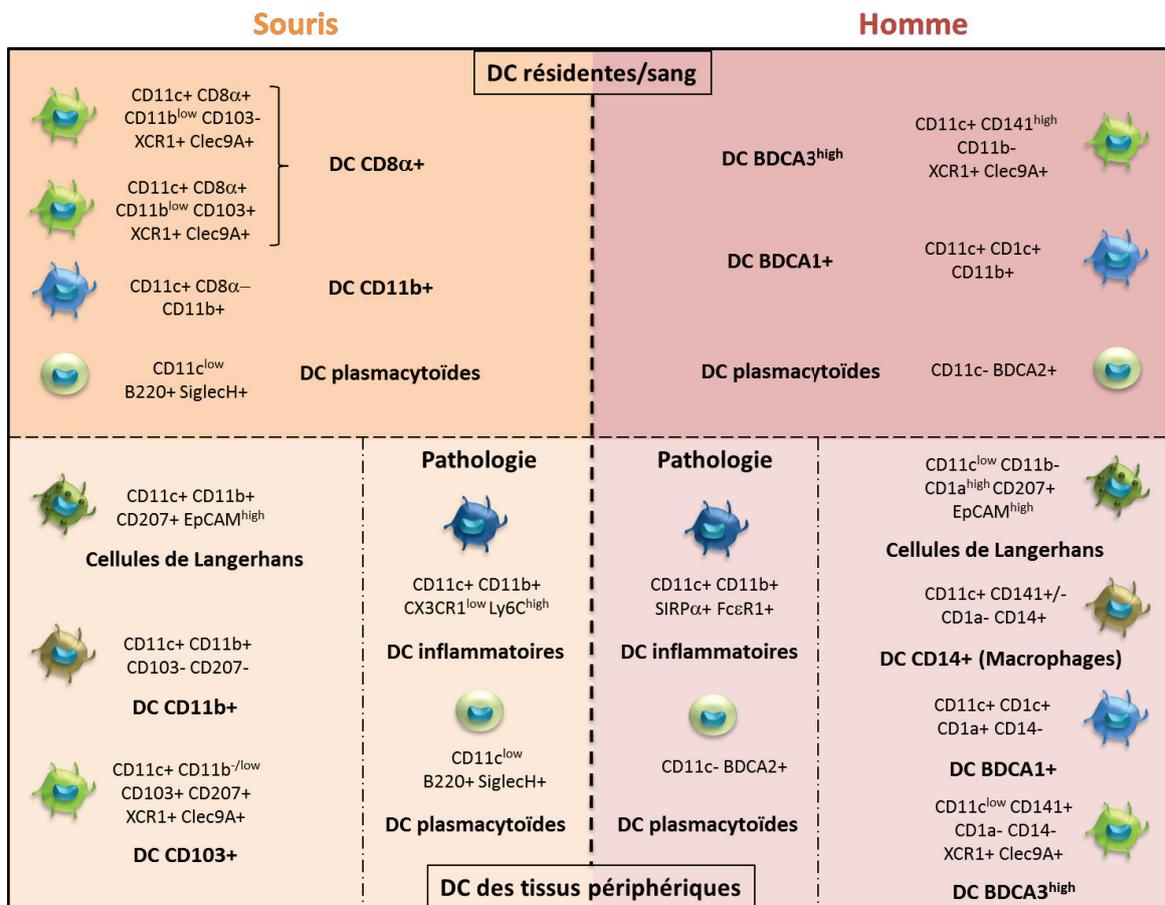


Figure 3 : Les DC sont classées en deux grandes catégories : les DC résidentes et les DC migratoires. Les DC résidentes sont retrouvées dans le sang et les organes lymphoïdes alors que les DC migratoires résident dans les tissus périphériques avant de migrer jusqu'aux organes lymphoïdes. Les DC résidentes se composent des DC CD8 α ⁺, des DC CD11b⁺ et des DC plasmacytoïdes chez la souris et des DC BDCA3^{high}, des DC BDCA1⁺ et des DC plasmacytoïdes chez l'homme. A l'état basal, les tissus périphériques se composent quant à eux des cellules de Langerhans, des DC CD11b⁺ et des DC CD103⁺ chez la souris et des cellules de Langerhans, des DC CD14⁺ (récemment redéfinies comme macrophages), des DC BDCA1⁺ et des DC BDCA3^{high}. En cas d'inflammation, de maladies auto-immunes ou de cancers, les DC inflammatoires et les DC plasmacytoïdes peuvent également infiltrer les tissus périphériques.

protéasique intracellulaire. La présentation croisée varie ainsi d'une sous population de DC et d'une forme antigénique à une autre.

B. Diversité des cellules dendritiques

1) Classification des cellules dendritiques

Au fur et à mesure des découvertes, les DC furent subdivisées en de nombreuses sous populations sur la base de leur phénotype. Cette classification manque cependant d'homogénéité car selon les marqueurs étudiés, l'origine historique de leur découverte ou le contexte inflammatoire, il arrive qu'une même population de DC possède diverses appellations. Par ailleurs, certains marqueurs sont parfois partagés entre sous populations différentes contribuant à brouiller les classifications. Les DC CD14⁺ de la peau ont par exemple été redéfinies récemment en macrophages (McGovern et al., 2014). Afin de parer à ces difficultés, trois principales approches existent aujourd'hui. Certains proposent de subdiviser les DC en fonction de leur ontogénie et des facteurs de transcription essentiels à leur développement, d'autres s'appuient préférentiellement sur des homologues transcriptomiques et certains préfèrent rester sur une classification histologique (Guilliams et al., 2014; Haniffa et al., 2012; Satpathy et al., 2012; Watchmaker et al., 2014). Ces trois approches se complètent et permettent une définition des différentes populations de DC qui est encore évolutive et discutée (Vu Manh et al., 2015).

En attendant un consensus, la méthode la plus répandue consiste à diviser les DC en deux grands sous types fonctionnels, les pDC et les cDC, CD11c⁺, elles-mêmes constituées de différentes sous populations en fonction de leur phénotype, de leur localisation et de leur capacité migratoire (Durand and Segura, 2015). Même si des dissemblances phénotypiques existent, cette classification est applicable à l'homme et à la souris. Par ailleurs, des avancées récentes ont permis d'affiner les homologues entre les DC des deux espèces, ce qui est intéressant pour le transfert à l'homme des nombreux résultats obtenus chez la souris concernant le rôle du système immunitaire dans les infections, les maladies auto-immunes ou les cancers (Clark and Allison, 1974; Cohen et al., 1971; Goverman et al., 1993; Koebel et al., 2007). Les principales populations de DC connues, ainsi que leurs marqueurs les plus représentatifs, sont schématisés dans la [Figure 3](#) et seront décrites par la suite.

Notons également qu'il a récemment été proposé de distinguer les deux sous populations de cDC grâce à l'expression exclusive de XCR1 et SIRP α (Signal Regulatory Protein alpha). En effet, cette distinction est valable dans de nombreux organes dont le thymus, la rate, le poumon, les plaques de Peyer, l'intestin et différents ganglions lymphatiques. Par ailleurs, cette classification n'est pas altérée par l'activation des cellules (Gurka et al., 2015). Il semble également que cette distinction puisse être transposée entre différentes espèces tel que cela a été montré pour l'homme, la souris, le mouton ainsi que pour les primates (Contreras et al., 2010; Dutertre et al., 2014).

2) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

a) Identification des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Il fallut un certain temps avant que les pDC ne soient considérées comme une population de DC à part entière. Elles se distinguent en effet des autres sous populations par leur forme ronde à l'état basal ainsi que par l'absence d'expression, chez l'homme, et une faible expression, chez la souris, de l'intégrine alpha X (CD11c). Aujourd'hui, leur identification s'appuie sur des combinaisons de marqueurs. Chez l'homme, les pDC sont caractérisées par l'expression spécifique de Clec4C et ILT7 (Immunoglobulin Like Transcript 7) ainsi que par celle moins spécifique du récepteur à l'IL-3 (CD123) et de la Neuropilin-1 (BDCA4). Les pDC murines expriment quant à elles spécifiquement SiglecH (Sialic acid binding immunoglobulin-like lectin H) et Bst2 (Bone marrow stromal cell antigen 2) et moins spécifiquement B220, Ly6C (Lymphocyte antigen 6C) et Ly49Q (Reizis et al., 2011). A l'état basal, les pDC sont présentes dans le sang et les organes lymphoïdes mais dans le cas de maladies auto-immunes ou de cancers, comme nous le verrons par la suite, les pDC peuvent également être recrutées dans les tissus périphériques (Hartmann et al., 2003; Nestle et al., 2005).

b) Origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC peuvent provenir de progéniteurs commun aux autres DC (Liu et al., 2009; Onai et al., 2007) ou commun aux cellules lymphoïdes comme l'atteste un réarrangement de leurs immunoglobulines (Sathe et al., 2013). Par ailleurs, quel que soit le progéniteur des pDC, ce dernier exprime toujours Flt3 (CD135). En effet, le ligand de ce récepteur, Flt3L (Fms-related tyrosine kinase 3 Ligand), est nécessaire à leur développement ainsi qu'à celui de la plupart des autres populations de DC (Breton et al., 2015). Le facteur de transcription E2-2 est également nécessaire au développement des pDC. Enfin, différentes cytokines, telles que le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), la TPO (Thrombopoietin) et l'IL-7 favorisent la différenciation des pDC (Shortman et al., 2013).

c) Propriétés fonctionnelles des pDC

Comme les autres DC, les pDC possèdent un large répertoire de PRR dont les plus caractéristiques sont le TLR7 et le TLR9 (Lindstedt et al., 2005). Suite à leur engagement, les pDC vont produire de grandes quantités d'interférons de type I (IFN- α 1-13, IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ et IFN- ω). Elles produisent par exemple 100 à 1000 fois plus d'interférons de type I que les autres cellules du sang en réponse à HSV (Herpes Simplex Virus) ou au virus influenza (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). Cette production de cytokines permet aux pDC d'agir sur un large spectre de cellules et de moduler la réponse immunitaire innée et adaptative. Les pDC possèdent par ailleurs une activité cytotoxique directe via TRAIL (Tumor Necrosis Factor-Alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand) qui interagit avec TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 à la surface des cellules infectées et des cellules tumorales. TRAIL

est induit à la suite de l'engagement des TLR ou en présence d'IFN- α (Balzarolo et al., 2012; Chaperot et al., 2006; Kalb et al., 2012; Matsui et al., 2009). Enfin, les pDC ont également la capacité de présenter les Ag aux lymphocytes T CD4 et aux lymphocytes T CD8 (Tel et al., 2013). En particulier, notons qu'à l'état basal, les pDC induisent une tolérance périphérique en recrutant des Treg comme cela a pu être observé dans le cadre de greffes cardiaques chez l'homme ou dans la tolérance orale chez la souris (Goubier et al., 2008; Ochando et al., 2006).

3) Les cellules dendritiques des tissus périphériques

Cette partie détaillera principalement les cellules dendritiques de la peau qui sont les mieux décrites et dont la diversité permet de faire ressortir la plupart des caractéristiques des DC des autres tissus périphériques.

a) Les cellules de Langerhans

- Identification des cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans furent observées pour la première fois chez l'homme par Paul Langerhans en 1868 dans l'épiderme mais elles sont également présentes dans les muqueuses. Leurs premières caractérisations reposaient sur l'observation de leur morphologie spécifique et d'organites appelés « granules de Birbeck » (Wolff, 1967). Leur appartenance au système immunitaire n'apparut cependant qu'un siècle plus tard chez la souris lorsqu'il s'avéra qu'elles étaient capables d'activer des lymphocytes T naïfs (Stingl et al., 1978) et qu'elles exprimaient comme les macrophages le CMH de classe II, des récepteurs Fc et des récepteurs du complément (Klareskog et al., 1977; Rowden et al., 1977; Stingl et al., 1977). Aujourd'hui, elles sont également identifiées sur la base de l'expression d'une lectine de type C appelée « Langerin » (CD207) impliquée dans la formation des granules de Birbeck (Valladeau et al., 2000). Celle-ci est fortement exprimée par les cellules de Langerhans mais notons qu'elle peut également être observée chez d'autres populations de DC que ce soit chez l'homme ou chez la souris (Bigley et al., 2015; Haniffa et al., 2012).

- Origine des cellules de Langerhans

Chez l'homme, des analyses transcriptomiques récentes remettent en cause l'homologie des cellules de Langerhans chez l'homme et la souris. En effet, ces données révèlent que les cellules de Langerhans humaines possèdent plus d'homologies avec les DC CD103⁺ et les DC thymiques murines, qui seront présentées par la suite, qu'avec les cellules de Langerhans de souris. Elles présentent également des similarités avec les DC BDCA3^{high} du sang (Artyomov et al., 2015). Notons cependant que cette étude s'attache principalement à l'analyse de modules de gènes impliqués dans la fonction des DC, réduisant l'importance des gènes liés à l'origine tissulaire des cellules. Il est donc possible qu'elle ne reflète pas l'origine ontogénique des cellules de Langerhans, en particulier concernant leur homologie avec les DC BDCA3^{high} du sang. En effet, des patients mutés

pour GATA2 présentent une immunodéficiences sévère caractérisée par une altération des DC du sang mais leurs cellules de Langerhans ne sont pas affectées (Bigley et al., 2011). Notons enfin, que le TGF- β oriente la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ en cellules de Langerhans (Caux et al., 1999).

Le TGF- β est également primordial pour la différenciation des cellules de Langerhans chez la souris. En effet, des souris déficientes pour cette cytokine sont dépourvues de cellules de Langerhans (Borkowski et al., 1996). Il a par ailleurs été montré que le TGF- β est également important pour le contrôle de leur maturation. Un Knock Out conditionnel du récepteur au TGF- β entraîne en effet une maturation et une migration spontanée des cellules de Langerhans indiquant le rôle essentiel du TGF- β dans l'homéostasie de ces cellules (Kel et al., 2010). Contrairement à la plupart des DC le développement des cellules de Langerhans dépend de l'expression du CSF-1R (Colony Stimulating Factor-1 Receptor), comme les macrophages, mais pas du FLT3L (Ginhoux et al., 2006). L'IL-34, exprimé dans la peau dès le stade embryonnaire chez la souris, semble être le ligand du CSF-1R jouant le rôle le plus important dans le développement des cellules de Langerhans. En effet, les souris IL34^{-/-} sont déficientes en ces cellules contrairement aux souris CSF-1^{-/-} (Wang et al., 2012; Wang and Colonna, 2014). Par contre, suite à une blessure par traitement aux ultraviolets, le remplacement des cellules de Langerhans nécessite le CSF-1 et le recrutement de monocytes Ly6C^{high} (Ginhoux et al., 2006).

- Quelle est la fonction des cellules de Langerhans ?

Chez l'homme, des résultats obtenus *in vitro* montrent que les cellules de Langerhans issues des voies respiratoires sont incapables de présenter des Ag aux lymphocytes T CD8 bien qu'elles les présentent aux lymphocytes T CD4 (van, V et al., 2011). Cependant, les cellules de Langerhans extraites de la peau après migration peuvent activer les lymphocytes T CD8 par présentation croisée d'Ag et orienter les lymphocytes T CD4 vers une réponse Th2 (Artyomov et al., 2015; Klechevsky et al., 2008). Ceci corrèle avec l'analyse de leur transcriptome qui révèle une forte expression des gènes impliqués dans l'apprêtement de l'Ag et la présentation croisée (Artyomov et al., 2015).

In vitro, les cellules de Langerhans font de la présentation croisée d'Ag alors qu'elles sont incapables d'induire une réponse T cytotoxique (CTL) *in vivo* (Allan et al., 2003; Igyarto and Kaplan, 2013). Des études récentes suggèrent qu'elles font cependant de la présentation croisée *in vivo* mais que celle-ci mène à une délétion des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'Ag et à une tolérance (Flacher et al., 2014). Ceci n'a par contre pas encore été vérifié chez l'homme.

Pour finir, notons que l'IL-34 induit la différenciation de monocytes humains en macrophages immunosuppresseurs (Foucher et al., 2013). Il serait ainsi peut être intéressant d'évaluer l'expression de l'IL-34 dans la peau humaine pour déterminer si cette cytokine

joue également un rôle dans l'homéostasie des cellules de Langerhans et dans l'orientation de leur réponse.

b) Les cellules dendritiques du derme

- Identification des cellules dendritiques du derme

Les DC du derme se distinguent des cellules de Langerhans par l'absence d'EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) et de la Cadhérine-E ainsi que par une plus faible expression de la Langerin.

La classification des DC du derme chez l'homme est encore un peu floue. Originellement elles furent subdivisées en DC CD14⁺ CD1a⁻ et DC CD1a^{dim} CD14⁻ (Nestle et al., 1993; Valladeau and Saeland, 2005). L'appartenance des premières à la famille des DC est actuellement remise en cause et il semblerait qu'elles soient en réalité plus proche des macrophages (McGovern et al., 2014). Concernant, les DC CD14⁻, une étude les a subdivisées sur la base de l'expression de CD11c et BDCA3. D'une part, les DC BDCA3⁺ CD11c^{low} expriment XCR1, Necl2 (Nectin-like molecule 2), Clec9A (C-type lectin domain family 9 member A) et le TLR3 comme les DC BDCA3^{high} du sang qui seront présentées par la suite. D'autre part, les DC BDCA3^{+/} CD11c⁺ ont un profil similaire aux DC BDCA1⁺ du sang. Ces deux populations sont retrouvées dans le poumon et le foie avec quelques différences phénotypiques mineures (Bigley et al., 2015; Haniffa et al., 2012). Cependant, dans une autre étude s'intéressant aux DC de la peau, les DC BDCA3⁺ ne furent pas observées (Segura et al., 2012). Il est donc possible cette population ne soit recrutée que dans certaines conditions.

Chez la souris, les DC du derme se subdivisent également en deux populations. L'une, minoritaire, exprimant la Langerin et l'intégrine alpha E (CD103). L'autre, exprimant l'intégrine alpha M (CD11b). Globalement, les DC CD103⁺ semblent homologues aux DC BDCA3^{high} humaines et les DC CD11b⁺ aux DC BDCA1⁺ (Haniffa et al., 2012). Notons que les DC CD103⁺ et CD11b⁺ ont aussi été décrites dans d'autres tissus périphériques tels que le poumon, l'intestin, le foie, les reins et le pancréas. Dans l'intestin, outre les DC CD103⁺ qui sont CD11b⁻ et XCR1⁺ trois autres populations de DC sont présentes. A l'inverse des DC CD103⁺, ces populations qui sont CD103⁺ CD11b⁺, CD103⁻ CD11b⁺ et CD103⁻ CD11b⁻ n'expriment pas XCR1 mais expriment SIRPα (Becker et al., 2014; Scott et al., 2014).

Chez l'homme, une population CD103⁺ SIRPα⁻ ainsi qu'une population CD103⁺ SIRPα⁺ ont été observées dans l'intestin. Les premières sont homologues aux DC BDCA3^{high} et aux DC CD103⁺ CD11b⁻ décrites précédemment alors que les deuxièmes sont homologues aux DC BDCA1⁺ et aux DC CD103⁺ CD11b⁻ (Watchmaker et al., 2014).

- Quelle est la fonction des cellules dendritiques du derme ?

Tout d'abord, l'engagement du récepteur CD40 induit la sécrétion d'une plus grande variété de cytokines par les cellules CD14⁺ que par les DC CD14⁻. Cependant, les premières sont moins efficaces pour induire une réponse CTL spécifique de l'Ag, ce qui

n'est pas surprenant s'il s'agit de macrophages (Klechevsky et al., 2008). Elles activent par ailleurs préférentiellement les lymphocytes T CD4 mémoires de manière similaire aux macrophages et elles orientent la différenciation de lymphocytes T CD4 naïfs vers un phénotype de Tfh (Follicular helper T cells), participant ainsi à la régulation de la maturation des lymphocytes B (Klechevsky et al., 2008; McGovern et al., 2014). Les cellules CD14⁺ BDCA3⁺ du derme produisent par ailleurs de l'IL-10 et induisent la différenciation des lymphocytes T en Treg de la même manière que les DC CD103⁺ de peau murine à l'état basal (Chu et al., 2012). Enfin, des avancées récentes ont été effectuées sur l'induction de réponses immunitaires au niveau de la peau suite à une infection par HSV. Il apparaît désormais que les cellules de Langerhans internalisent le virus avant de migrer vers le derme. Elles entrent alors en contact avec les DC BDCA3⁺, exprimant Clec9A, qui internalisent les Ag provenant des cellules de Langerhans apoptotiques. Par la suite, les DC BDCA3⁺ migrent vers les organes lymphoïdes pour activer les lymphocytes T CD8. De la même manière, les autres DC du derme récupèrent des Ag délivrés par les cellules de Langerhans et induisent une réponse T CD4 (Kim et al., 2015). Ces résultats corroborent des résultats obtenus chez la souris montrant que la réponse CTL dirigée contre HSV nécessite les DC CD8 α ⁺, présentant de nombreuses homologues avec les DC CD103⁺ murines et les DC BDCA3^{high} humaines comme nous le verrons par la suite (Allan et al., 2003; Hildner et al., 2008; Robbins et al., 2008; Mollah et al., 2014).

Chez la souris, les DC du derme sont responsables de l'induction de la réponse Th1 suite aux infections cutanées (Igyarto et al., 2011). Par ailleurs, les DC CD103⁺ sont les seules, parmi celles des tissus périphériques, à pouvoir efficacement présenter *in vivo* l'Ag aux lymphocytes T CD8 par présentation croisée afin d'induire une réponse CTL (Flacher et al., 2014; Henri et al., 2010). A l'état basal, les DC CD103⁺ de la peau, du poumon et de l'intestin induisent une tolérance périphérique vis-à-vis des antigènes en activant la différenciation des Treg. Elles participent aussi à leur recrutement au niveau du derme en sécrétant la chimiokine CCL22 (Coombes et al., 2007; del Rio et al., 2007; Nagao et al., 2009). En cas d'infection, les DC CD103⁺ vont au contraire induire dans les ganglions lymphatiques la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 spécifique de l'Ag (Semmrich et al., 2012). Pour leur part, les DC CD11b⁺ participent principalement au recrutement des lymphocytes T, des monocytes et des neutrophiles en sécrétant de grandes quantités de cytokines et chimiokines (Coombes et al., 2007).

Notons que dans l'intestin, les DC CD103⁺ capturent les Ag situés dans la lumière intestinale en patrouillant entre les cellules épithéliales et en y déployant leurs dendrites (Farache et al., 2013). De plus, les cellules en gobelet faciliterait cette acquisition en transférant les Ag provenant de la lumière intestinal jusqu'au tissu (McDole et al., 2012). Ainsi chaque tissu possède des caractéristiques propres favorisant la capture de l'Ag par les DC.

- Recrutement de cellules dendritiques lors de l'inflammation

Une dernière population de DC est présente de façon transitoire en cas d'inflammation.

Chez l'homme, peu de données existent sur les DC inflammatoires. Une étude décrit des cellules CD11c⁺ BDCA1⁻ présentes spécifiquement dans la peau de patients atteints de psoriasis, induisant une réponse TH1/TH17 et associées à une forte sécrétion de TNF (Tumor Necrosis Factor) et d'iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) (Lowe et al., 2005; Zaba et al., 2009). D'autres travaux révèlent l'existence d'une population de DC CD11c⁺ BDCA1⁺ CD14⁺ CD206⁺ SIRPα⁺ présente seulement en condition pathologique dans le fluide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde ou dans des ascites de tumeur et induisant une réponse Th17 (Segura et al., 2013). L'expression de FcεR1 les différencie des macrophages et l'analyse du transcriptome de ces dernières les classe comme intermédiaire des DC et des macrophages.

Chez la souris, les DC inflammatoires expriment fortement Ly6C ainsi que CD11c, CD11b, CD206, SIRPα et CD88 (Beitnes et al., 2012; Nakano et al., 2015). Elles proviennent de monocytes Ly6C^{high} exprimant faiblement CX3CR1 (Geissmann et al., 2003). Le récepteur de chimiokines CCR2 apparaît également important pour permettre aux monocytes de quitter la moelle osseuse et par la suite atteindre les tissus enflammés où elles vont se différencier en DC inflammatoires produisant de grandes quantités de TNF et d'iNOS participant à l'élimination des pathogènes microbiens (Serbina et al., 2003; Serbina and Pamer, 2006). Outre leur action antimicrobienne directe, les DC inflammatoires participent également à la réponse adaptative en induisant principalement une réponse Th1 mais aussi dans certains cas une réponse Th2 ou Th17. La quantité de DC inflammatoires est par ailleurs modulée positivement lors d'une réponse Th1 et négativement en présence d'IL-10, d'IL-4 et d'IL-13. Leur rôle supposé consisterait à renforcer la réponse immunitaire en cas de besoin (Hessel and Moser, 2012).

4) Les cellules dendritiques résidentes des organes lymphoïdes secondaires

En plus des pDC et des populations ayant migrées depuis les tissus périphériques, les organes lymphoïdes contiennent deux populations de DC résidentes. Il s'agit, chez la souris, des DC CD8α⁺ et des DC CD11b⁺ (Shortman and Heath, 2010), et chez l'homme des DC BDCA3^{high} et des DC BDCA1⁺ (Lindstedt et al., 2005; Poulin et al., 2010). Une homologie existe entre les DC BDCA1⁺ et les DC CD11b⁺ ainsi qu'entre les DC BDCA3^{high} et les DC CD8α⁺ (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010; Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010; Robbins et al., 2008).

a) Identification des cellules dendritiques résidentes

Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, les DC résidentes se distinguent des pDC par l'expression de CD11c. Elles expriment également logiquement le récepteur qui leur donne leur nom. Les DC BDCA1⁺ se distinguent ainsi par l'expression de CD1c (BDCA1)

et les DC BDCA3^{high} par une forte expression de CD141 (BDCA3). Notons que les DC CD8 α ⁺ de la rate se composent de deux sous populations distinguables grâce à l'expression de CD103 et que des DC exprimant CD103 sont également présentes dans les plaques de Peyer de l'intestin et le thymus (Sathe et al., 2011; Zhan et al., 2011).

b) Quelle est la fonction des cellules dendritiques résidentes ?

La fonction des DC BDCA3^{high}, et en particulier leur capacité de présentation croisée proche de celle des DC CD8 α ⁺, sera détaillée par la suite. Ainsi nous allons nous attacher à la fonction des DC résidentes de souris, qui par leur homologie avec les DC humaines peuvent donner des indications intéressantes.

Les DC résidentes ne provenant pas des tissus périphériques, il est intéressant de se demander comment elles acquièrent les Ag qu'elles présentent aux lymphocytes T. D'une part, les DC résidentes peuvent acquérir directement des Ag solubles transitant par la lymphe. Cependant, lorsqu'une faible quantité d'Ag est libérée, cette acquisition ne serait pas suffisante pour permettre de maintenir une tolérance périphérique. Ainsi, les DC migrantes sont capables de délivrer des Ag provenant des tissus périphériques aux DC résidentes suite à un transfert par contacts cellulaires entre DC ou par libération d'exosomes. A l'état basal, les DC résidentes maintiennent ainsi la tolérance périphérique, et participent en conditions inflammatoires à la réponse immunitaire (Carbone et al., 2004). Les DC peuvent également collaborer au sein des ganglions lymphatiques afin de promouvoir une meilleure activation des lymphocytes T. Par exemple, dans le cas d'infections par HSV, les pDC favorisent l'induction d'une réponse CTL par les DC résidentes grâce à leur sécrétion d'IFN- α et leur expression de CD40L (Yoneyama et al., 2005). L'expression de CD40L à la surface des pDC participe également à la production d'IL-12 par les cDC (Kuwajima et al., 2006).

Dans la rate, les DC CD8 α ⁺ sont principalement localisées dans les zones T. Une sous population exprimant également CD103 est située dans la zone marginale. Celle-ci disparaît en cas d'inflammation et son absence altère la tolérance périphérique (Qiu et al., 2009). L'expression de CD103 est par ailleurs augmentée en présence de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) et corrèle avec les capacités de présentation croisée des DC CD8 α ⁺ de la rate (Zhan et al., 2011). La présentation croisée des DC thymique est quant à elle supérieure à celle des DC de la rate et moins sensible à la présence de GM-CSF (Dresch et al., 2011; Kyewski and Klein, 2006).

c) Dépendance envers Batf3 et IRF8

Les souris Batf3^{-/-} sont déficientes en DC CD103⁺ et en DC CD8 α ⁺ mais possèdent un répertoire intact concernant les autres sous populations de DC (Hildner et al., 2008). Les souris IRF8^{-/-} sont quant à elles aussi déficientes pour ces deux sous populations de DC mais de façon moins spécifique puisqu'elles sont aussi déficientes en pDC (Schiavoni et al., 2002). Ces éléments, ainsi que la similarité de leur profil d'expression génique et de

leur capacité de présentation antigénique, indiquent que les DC CD8 α ⁺ et les DC CD103⁺ sont issues d'un progéniteur commun (Edelson et al., 2010). De plus, il a récemment été montré que l'injection d'IL-12 ou la présence de pathogènes, tels que *Lysteria monocytogenes* ou *Mycobacterium tuberculosis*, restaurent la présence de DC CD103⁺ et CD8 α ⁺ fonctionnelles dans des souris Batf3^{-/-} grâce à une compensation par Batf (Basic leucine zipper transcription factor) et Batf 2 (Tussiwand et al., 2012). Batf possédant comme Batf3 des sites de fixation pour IRF4 et IRF8, il est supposé que la spécificité des gènes induisant le lignage cellulaire passe principalement par les IRF (Interferon Regulatory Factor).

C. Culture *in vitro* des cellules dendritiques humaines

La différenciation des DC, *in vitro*, constitue à la fois un moyen efficace d'en obtenir une quantité suffisante pour étudier leur biologie en détails et un outil permettant la mise en œuvre de thérapies basées sur l'injection de DC chez des patients afin de rétablir une réponse immunitaire efficace. Cette approche testée dans différents essais cliniques, suite à des résultats encourageants chez la souris, a apporté quelques résultats en termes de ralentissement de la croissance tumorale et de prolongement de la survie des patients mais ne permet pas d'obtenir des rémissions complètes (Inaba et al., 1992; Pizzurro and Barrio, 2015; Porgador and Gilboa, 1995). Cependant, de nouveaux protocoles permettant d'obtenir une plus grande variété de DC similaires à celles observées *in vivo* pourraient permettre de progresser encore dans le domaine de la vaccination anti-tumorale.

1) À partir de monocytes

Nous avons précédemment vu que certaines cellules de Langerhans ainsi que les DC inflammatoires proviennent de la différenciation des monocytes. *In vitro*, il est possible d'induire, en présence de GM-CSF et d'IL-4 ou par migration au travers d'une couche monocellulaire de cellules endothéliales, la différenciation de monocytes en DC capables de présenter efficacement l'Ag aux lymphocytes T (Randolph et al., 1998; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Les DC dérivées de monocytes (MoDC) conservent cependant un profil transcriptomique plus proche des monocytes que des DC du sang (Robbins et al., 2008). Il est ainsi actuellement envisagé que les MoDC se rapprocheraient des DC inflammatoires observées chez la souris.

2) À partir de progéniteurs CD34⁺

Les premières DC obtenues *in vitro* le furent à partir de progéniteurs CD34⁺ (Human progenitor cell antigen) cultivés durant une dizaine de jours en présence de GM-CSF et de TNF α (Caux et al., 1992; Caux et al., 1996). L'utilisation de Flt3L et/ou de cellules stromales permet par ailleurs d'obtenir des pDC, exprimant CD123 et sécrétant de l'IFN- α , dont le nombre peut être augmenté en présence de TPO (Chen et al., 2004; Chicha et al., 2004). Il s'est avéré par la suite que ce protocole permet également d'obtenir des DC

BDCA1⁺ et des DC BDCA3^{high} (Proietto et al., 2012). Un autre protocole permettant d'obtenir ces trois populations consiste à cultiver des progéniteurs en présence de cellules MS5 et de Flt3L, SCF (Stem Cell Factor) et GM-CSF. Les DC ainsi obtenues sont similaires à celles du sang en termes de transcriptome, de phénotype et de fonctionnalité (Lee et al., 2015). Ce protocole permet également d'obtenir des lymphocytes B, des cellules NK, des granulocytes et des monocytes.

Pour notre part, nous avons utilisé un autre protocole permettant d'obtenir de grandes quantités de DC BDCA3^{high} *in vitro*, en induisant la prolifération de progéniteurs issus de sang de cordons en présence de SCF, de Flt3L, d'IL-3 et d'IL-6 puis en induisant leur différenciation en présence de SCF, de Flt3L, de GM-CSF et d'IL-4 (Poulin et al., 2010). Nous avons ainsi montré en collaboration avec l'équipe de Marc Dalod que les DC BDCA3^{high} obtenues sont similaires en termes de phénotype, de transcriptome, de sécrétion de cytokines et de capacité de présentation antigénique à celles du sang. Ces travaux, publiés, sont présentés dans la partie **résultats** (Balan et al., 2014).

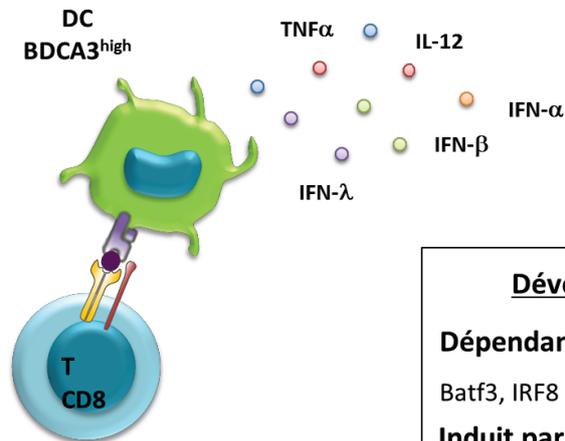
3) Perspectives thérapeutiques

Plusieurs essais de vaccinations anti-tumorales ont été réalisés avec des MoDC. Les résultats de ces études ont permis d'affiner les conditions dans lesquelles elles sont capables d'induire une réponse immunitaire efficace. Par exemple, la maturation préalable des MoDC est importante pour éviter qu'elles n'induisent une tolérance plutôt qu'une réponse cytotoxique (de Vries et al., 2003; Dhodapkar et al., 2001). L'introduction par électroporation de différents ARNm codant pour des antigènes associés aux tumeurs dans les MoDC permet également d'enrichir le répertoire de lymphocytes activés permettant ainsi d'obtenir de meilleurs résultats qu'en cas de vaccinations avec des DC sensibilisés préalablement avec une faible diversité d'antigènes (Aarntzen et al., 2012). Ceci est cohérent avec des résultats récents montrant que la réactivation du système immunitaire est plus efficace si les tumeurs présentent un nombre élevé de mutations (Rizvi et al., 2015).

Dans l'optique d'une utilisation thérapeutique la rareté des progéniteurs CD34⁺ présente un obstacle majeur. La solution optimale consiste à injecter des cellules issues du patient lui-même pour éviter les réactions du système immunitaire à l'encontre des cellules injectées. En ce sens, des travaux récents ont montré qu'il était possible d'obtenir des DC BDCA3^{high} XCR1⁺ à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPS) à partir de fibroblastes du derme (Silk et al., 2012). Les DC obtenues sont intéressantes car elles apparaissent plus efficaces que les MoDC pour présenter des Ag provenant de cellules tumorales aux lymphocytes T CD8 naïfs. Les DC BDCA3^{high} du sang étant extrêmement rare, l'utilisation d'iPS pourrait offrir une solution permettant d'en obtenir un nombre suffisant pour les injecter chez les patients.

<u>Phénotype</u>
Expriment :
XCR1 : récepteur des chimiokines XCL1 et XCL2
Clec9A : lectine de type C. Reconnaissance des filaments d'actine de cellules nécrotiques
Necl-2 : interaction avec CRTAM
TLR3 : reconnaissance ARN double brin
Clnk, Gcet2 ...
N'expriment pas :
SIRPα : inhibe la phagocytose des cellules exprimant CD47
CD11b : intégrine alpha M

<u>Fonction</u>	
Sécrètent :	Présentation d'antigène :
TNF α , IL-12, IFN- λ , IFN- β , IFN- α^{low}	Présentation croisée d'antigène soluble ou cellulaire



<u>Développement</u>
Dépendant de :
Batf3, IRF8
Induit par :
Flt3-L

Figure 4 : Particularités des DC BDCA3^{high}. Les DC BDCA3^{high} se distinguent des autres populations de DC par l'expression, ou l'absence d'expression, de certains marqueurs phénotypiques tels que XCR1 et Clec9A. Leur développement dépend des facteurs de transcription Batf3 et IRF8. Enfin, elles sont de grandes productrices de cytokines, en particulier d'IFN, et sont douées pour la présentation croisée d'Ag.

II. Caractéristiques des cellules dendritiques conventionnelles BDCA3^{high} et homologies avec les cellules dendritiques CD8α⁺ et les cellules CD103⁺ de souris

Je vais maintenant présenter plus en détails les DC BDCA3^{high} qui possèdent des caractéristiques très intéressantes dans l'initiation de réponses anti-tumorales (Figure 4). Ces DC sont extrêmement rares et représentent de 0,03 à 0,08% des cellules hématopoïétiques du sang (Jongbloed et al., 2010). Elles représentent également la minorité des DC dans l'amygdale, la moelle osseuse, la peau ou le poumon ainsi que dans la plupart des tissus (Haniffa et al., 2012; Nizzoli et al., 2013). Hors précision, les propos tenus porteront sur les DC BDCA3^{high} du sang qui sont les mieux caractérisées.

A. Homologies avec les cellules dendritiques CD8α⁺ et les cellules dendritiques CD103⁺ de souris

1) Homologies phénotypiques et transcriptomiques

Comme nous l'avons vu précédemment, les DC BDCA3^{high} et les DC CD8α⁺ de souris partagent une forte homologie transcriptomique (Robbins et al., 2008). L'étude de Robbins et de ses collaborateurs a confirmé l'expression partagée de certains gènes entre les DC BDCA3^{high} et les DC CD8α⁺ tels que le TLR3 (Lindstedt et al., 2005) ou Necl2 (Galibert et al., 2005) et a révélé d'autres gènes encore peu étudiés chez les DC tels que Clnk (Cytokine-dependent hematopoietic cell linker) ou Gcet2. Notons que ces gènes sont également exprimés par d'autres populations cellulaires. Ils peuvent donc servir à distinguer les différentes sous populations de DC entre elles, mais ne doivent pas être considérés comme spécifiques des DC BDCA3^{high} et des DC CD8α⁺. Par contre, ces dernières expriment toutes les deux spécifiquement le récepteur de chimiokines XCR1 (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010; Dorner et al., 2009) et la lectine Clec9A (Caminschi et al., 2008; Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010; Sancho et al., 2008). Notons également leur faible expression de CD11b et l'absence d'expression de SIRPα qui permet d'émettre l'hypothèse d'une meilleure phagocytose des cellules tumorales par les DC BDCA3^{high} comme nous le verrons plus tard.

2) Homologies fonctionnelles

Nous avons vu que les DC CD8α⁺ et les DC CD103⁺ sont les plus efficaces pour la présentation croisée d'Ag chez la souris. Chez l'homme, les DC BDCA3^{high} sont également particulièrement douées pour la présentation croisée d'Ag solubles ou provenant de cellules mortes (Bachem et al., 2010; Haniffa et al., 2012; Jongbloed et al., 2010). Dans certaines de ces études, la supériorité des DC BDCA3^{high} vis-à-vis des autres DC est cependant due à une activation préalable par polyI:C, un ligand de TLR3 (Jongbloed et al., 2010). Les DC BDCA3^{high} de la peau ne nécessitent quant à elles pas d'activation préalable pour présenter des Ag solubles (Haniffa et al., 2012), probablement parce qu'elles sont

plus matures que celles du sang après leur extraction de la peau. D'autres résultats montrent que les DC BDCA3^{high} issues de ganglions ou du sang, ne sont pas plus efficaces que les DC BDCA1⁺ pour présenter un Ag soluble aux lymphocytes T CD8 (Segura et al., 2012). De plus, lorsque l'Ag est délivré aux DC via CD40, la supériorité des DC BDCA3^{high} vis-à-vis des DC BDCA1⁺ n'est plus observée (Cohn et al., 2013).

Les DC BDCA3^{high} obtenues *in vitro* sont également douées pour la présentation croisée (Poulin et al., 2010) et je présenterai dans la partie **résultats** nos données montrant que ceci est particulièrement vrai dans le cadre d'Ag cellulaires (Balan et al., 2014; Deauvieau et al., 2015).

Par ailleurs, les DC BDCA3^{high} comme les DC CD8 α ⁺ produisent de l'IL-12p70 après activation avec des cocktails composés de différentes combinaisons de ligands de TLR et de cytokines telles que l'IFN- γ , l'IFN- α , le TNF et l'IL-1 β (Hochrein et al., 2001; Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010). Cependant, cette production reste faible vis-à-vis de DC BDCA1⁺ activées par des ligands de TLR4, TLR7 et TLR8 (Nizzoli et al., 2013). *In vivo*, la sécrétion d'IL-12 par les DC BDCA3^{high} nécessite donc probablement une forte activation. Mais la capacité des DC BDCA3^{high} à produire de l'IL-12 reste intéressante car elle induit notamment la prolifération des cellules NK et des CTL et favorise une réponse de type Th1 (Xu et al., 2010). Les DC BDCA3^{high} possèdent ainsi potentiellement un rôle anti-tumoral *in vivo*, d'autant plus que les DC BDCA3^{high} sont également des productrices majeures d'IFN- λ , une cytokine possédant entre autres de potentielles propriétés anti-tumorales qui seront discutées en détails par la suite (Lasfar et al., 2011; Lauterbach et al., 2010). Enfin, les DC CD8 α ⁺ sont connues pour produire des interférons de type I (Hochrein et al., 2001) et de manière similaire les DC BDCA3^{high} produisent de l'IFN- β et de l'IFN- α après stimulation par un ligand de TLR-3 (Jongbloed et al., 2010; Meixlsperger et al., 2013). La production d'IFN- α est cependant une observation récente obtenue en présence de polyI:CLC et n'avait pas été observée précédemment en présence de polyI:C. L'étude à l'origine de cette observation révèle également que les IFN- α produits par les DC BDCA3^{high} sont complémentaires de l'IFN- α 2 produit en majorité par les pDC.

3) Homologies développementales

Tout d'abord, comme les DC CD8 α ⁺, les DC BDCA3^{high} représentent la plus faible proportion des DC du sang et de la plupart des organes lymphoïdes alors qu'elles sont enrichies dans le thymus et le foie (Dresch et al., 2011; Kelly et al., 2014; Shortman and Heath, 2010). Dans le thymus, leur enrichissement et leur forte capacité de présentation croisée sont probablement importants pour l'induction de la tolérance centrale (Dresch et al., 2011).

Les facteurs de croissance et les facteurs de transcription nécessaires aux développements des DC ont été étudiés en détails chez la souris (Watowich and Liu, 2010). Tout d'abord, nous avons vu que le Flt3L est impliqué dans la différenciation de la plupart des DC murines dont les DC CD8 α ⁺ et les DC CD103⁺. De manière similaire chez

l'homme, les protocoles permettant la différenciation de la plupart des DC *in vitro* nécessitent la présence de Flt3L et les précurseurs des DC BDCA3^{high} et des DC BDCA1⁺ expriment Flt3 (Breton et al., 2015). Les facteurs de transcription IRF8 et Batf3 sont pour leur part nécessaires à la différenciation des DC CD8α⁺ et des DC CD103⁺ (Hildner et al., 2008; Raetz et al., 2013). IRF8 est également nécessaire à la différenciation des pDC et participe à la sécrétion d'IL-12 par les DC CD8α⁺ (Raetz et al., 2013). Chez l'homme, les DC BDCA3^{high} sont les seules DC circulantes à exprimer IRF8 (Poulin et al., 2010), mais des patients mutés pour IRF8 sont également déficients en cDC et en pDC comme chez la souris (Salem et al., 2014). Enfin, les DC BDCA3^{high} expriment également Batf3 (Poulin et al., 2010). Dans leur ensemble, tous ces éléments laissent penser que les DC BDCA3^{high} ont un développement similaire aux DC CD8α⁺ et aux DC CD103⁺.

B. Spécificités des cellules dendritiques conventionnelles BDCA3^{high}

1) Necl2 et XCR1 : « cross-talk » avec les cellules NK et les lymphocytes T CD8

a) Necl2

Necl2 est une protéine d'adhésion fortement exprimée par les DC BDCA3^{high} (Galibert et al., 2005; Robbins et al., 2008). Elle est connue pour interagir de façon homotypique et hétérotypique avec différentes protéines d'adhésion dont CRTAM (Class-I-restricted T-cell-associated molecule) qui est probablement la plus intéressante dans le cadre de la réponse immunitaire car elle est particulièrement exprimée chez la souris par les lymphocytes T CD8 αβ et γδ ainsi que par les cellules NK activées (Arase et al., 2005; Boles et al., 2005; Galibert et al., 2005). L'induction de CRTAM suite à leur activation est plus rapide pour les lymphocytes T CD8 de la rate que pour ceux du sang et pour les lymphocytes T CD8 γδ que pour les αβ. Par ailleurs, l'IL-2 induit également l'expression de CRTAM mais de façon transitoire et uniquement pour les lymphocytes de la rate (Zechmann et al., 2013).

La protéine Necl2 est aussi considérée comme un suppresseur de tumeur car son expression participe au maintien de la structure épithéliale des cellules et empêche leur propagation. La perte d'expression de Necl2 par hyperméthylation a été observée dans différents cancers permettant à la fois aux cellules tumorales de changer de morphologie et d'échapper à la cytotoxicité des cellules immunitaires (Fukami et al., 2003; Murakami, 2005). A l'inverse, il a également été montré que l'interaction entre CRTAM et Necl2 induit la mort des lymphocytes T γδ protégeant ainsi potentiellement les cellules tumorales de leur cytotoxicité (Dessarthe et al., 2013). Le rôle de Necl2 pourrait donc être double dans les tumeurs.

Dans le cas des DC BDCA3^{high}, l'implication de Necl2 n'est pas encore éclaircie. Nous pouvons émettre l'hypothèse que Necl2 pourrait être important dans l'homéostasie des DC BDCA3^{high} ou dans le recrutement et/ou l'activation des cellules NK et des lymphocytes T CD8 (Dessarthe et al., 2013; Zechmann et al., 2013). En effet, l'expression

de CRTAM participe à la rétention des lymphocytes T CD8 par les DC CD8 α^+ dans les ganglions lymphatiques chez la souris, permettant ainsi potentiellement d'améliorer la réponse CTL (Takeuchi et al., 2009).

b) XCR1

L'expression de XCR1, le récepteur de XCL1 chez la souris et de XCL1 et XCL2 chez l'homme, est conservée entre les DC CD8 α^+ et les DC BDCA3^{high} (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010; Fox et al., 2015). Parmi les cellules hématopoïétiques, XCL1 est produit par les lymphocytes T CD8 et les cellules NK activées et permet la migration spécifique des DC CD8 α^+ et des DC BDCA3^{high} (Yamazaki et al., 2010). Chez la souris, il a également été montré que les lymphocytes T CD8, activés par les DC CD8 α^+ , sécrètent XCL1 dont la présence est importante pour une sécrétion d'IFN- γ et une cytotoxicité optimale des CTL (Dorner et al., 2009). Par ailleurs, le recrutement des DC CD8 α^+ et des DC BDCA3^{high} dans le thymus, où elles sont enrichies et induisent la différenciation des Treg, est dû à une sécrétion de XCL1 par les cellules épithéliales thymiques (Lei et al., 2011).

L'expression spécifique de XCR1 par les DC BDCA3^{high} est également intéressante dans l'éventualité d'immunothérapies basées sur leur ciblage *in vivo*. Cette hypothèse a récemment été testée et validée chez des souris dont les DC XCR1⁺ ont été spécifiquement ciblées à l'aide d'un anticorps dirigé contre XCR1 ou de XCL1 couplés à l'ovalbumine. Les DC XCR1⁺ ainsi ciblées orientent la différenciation des lymphocytes T CD4 vers un profil Th1 et induisent une réponse CTL spécifique et efficace à l'encontre de tumeurs (Hartung et al., 2015).

2) Clec9A : reconnaissance spécifique des cellules nécrotiques

Clec9A est une lectine de type C exprimée spécifiquement par les DC CD8 α^+ et les DC BDCA3^{high}. Elle est impliquée dans la reconnaissance de l'actine F, sous forme de filaments considérés comme DAMP, provenant des cellules nécrotiques et dans la présentation des Ag provenant de ces cellules aux lymphocytes T CD8 pour l'induction d'une réponse CTL spécifique (Ahrens et al., 2012; Hanc et al., 2015; Sancho et al., 2009; Zhang et al., 2012). Dans l'environnement tumoral, riche en cellules mortes, il est donc probable que Clec9A joue un rôle non négligeable dans la capture des Ag de cellules tumorales.

Par ailleurs, comme pour XCR1, des anticorps dirigés contre Clec9A et couplés à l'ovalbumine ou à la Mucine-1 permettent d'induire une réponse CTL spécifique et de limiter le développement de tumeurs exprimant ces Ag chez la souris (Caminschi et al., 2008; Picco et al., 2014; Sancho et al., 2008). L'utilisation d'anticorps dirigés contre Clec9A aboutit également à la formation transitoire de centres germinatifs et à une forte réponse humorale chez la souris et chez le macaque, en absence d'adjuvants (Li et al., 2015; Park et al., 2013).

3) Absence d'expression de SIRP α : meilleure internalisation d'antigènes issus de cellules tumorales

Une autre particularité intéressante des DC BDCA3^{high} est leur absence d'expression de SIRP α (Signal-regulatory protein- α). La phagocytose des DC et des macrophages est inhibée lorsque SIRP α est engagé par son ligand, CD47. Cette interaction est nécessaire à l'homéostasie des globules rouges dans le sang, mais l'expression de CD47 est également observée dans une grande variété de cancer où elle est associée à un mauvais pronostic pour les patients (Murata et al., 2014b; Willingham et al., 2012). L'absence d'expression de SIRP α à la surface des DC BDCA3^{high} pourrait donc leur apporter un avantage dans la présentation croisée d'Ag cellulaires (Bachem et al., 2010; Jongbloed et al., 2010).

4) Production d'IFN- λ : intérêt dans le cadre d'HCV et d'autres pathologies

L'IFN- λ possède des activités antivirales et anti-tumorales qui seront détaillées par la suite. Chez l'homme, les DC BDCA3^{high} sont enrichies dans le foie et elles produisent des quantités d'IFN- λ supérieure aux pDC en réponse à HCV (Hepatitis C Virus) (Kelly et al., 2014; Yoshio et al., 2013; Zhang et al., 2013). La production d'IFN- λ par les DC BDCA3^{high} nécessite la reconnaissance du virus par le récepteur membranaire CD81 ainsi qu'une acidification des endosomes et l'engagement de TRIF (TIR domain-containing adapter inducing IFN-Beta) (Yoshio et al., 2013). L'IFN- λ produit par les DC BDCA3^{high} permet d'amplifier la réponse IFN- α des pDC et inversement l'IFN- α amplifie la réponse IFN- λ des DC BDCA3^{high} (Zhang et al., 2013). L'étude des DC BDCA3^{high} mériterait ainsi d'être approfondie chez les patients, sachant que celles-ci sécrètent de grandes quantités d'IFN- λ dans de nombreux autres tissus et en réponse à différents virus (Lauterbach et al., 2010; Martinez et al., 2015; Schulte et al., 2015).

III. Interférons lambda

A. Découverte et caractéristiques générales

1) Découverte des interférons

La mise en évidence des interférons résulte de travaux menés sur l'interférence dans les années 1950 par A. Isaacs et J. Lindenmann. Le terme interférence recouvre l'ensemble des mécanismes qui, suite à une infection virale, limitent la multiplication d'un autre virus au sein des cellules infectées et des cellules saines. A l'issue de leurs expériences avec le virus influenza, Isaacs et Lindenmann conclurent à l'existence d'un agent interférent, libéré par les cellules, qu'ils nommèrent interféron (ISAACS and LINDENMANN, 1957; LINDENMANN et al., 1957). Au cours des années 1970, trois interférons aux propriétés antivirales complémentaires furent caractérisés : l'IFN- α , l'IFN- β et l'IFN- γ (Muller et al., 1994; Stewart et al., 1973). L'IFN- α et l'IFN- β appartiennent à la famille des interférons de type I et interagissent avec un récepteur de surface composé

Cellules	Inducteur	Interférons produits	Références
Blood cells	Herpes Simplex Virus	IL29, IL28A, IL28B	Casrouge, Science 2006
Macrophages	TLR3 ligand, TLR4 ligand, Influenza, Sendai Virus	ARNm IL-28 et IL29	Sirén, J Immunol 2005
Monocytes	TLR4 ligand	ARNm IL29	Wolk, J Leukoc Biol 2008
MoDC	TLR3 ligand, TLR4 ligand, Influenza, Sendai Virus	ARNm IL28 et IL29	Coccia, Eur J Immunol 2004
MoDC	Sendai Virus	ARNm IL28 et IL29	Osterlund, J Immunol 2007
MoDC	CD40L + IFN gamma, TLR4 ligand	ARNm IL-29	Wolk, J Leukoc Biol 2008
pDC	TLR9 ligand, Influenza	ARNm IL28 et IL-29	Coccia, Eur J Immunol 2004
pDC	TLR7 ligand, TLR9 ligand, Herpes Simplex Virus	IL29	Megjurograc, J Leukoc Biol 2009
pDC	TLR7 ligand, Influenza, Sendai Virus, Herpes Simplex Virus	IL29, IL28A, IL28B	Yin, J Immunol 2012
pDC	TLR7 ligand	IL29, IL28A, IL28B	Murata, J Gastroenterol 2013
BDCA3 DC	TLR3 ligand	IL29, IL28A, IL28B	Murata, J Gastroenterol 2013
BDCA3 DC	TLR3 ligand, Hepatitis C Virus	IL29, IL28A, IL28B	Yoshio, Hepatology 2013
Fibroblaste transformé	TLR3 ligand, Herpes Simplex Virus, Vesicular Stomatitis Virus	IL29, IL28A, IL28B	Casrouge, Science 2006
Cellules épithéliales voies respiratoires	Rhinovirus	ARNm IL28 et IL29	Khaitov, Allergy 2009
Cellules épithéliales voies respiratoires	Rhinovirus	ARNm IL28 et IL29	Siegel, J Immunol 2011
Cellules épithéliales voies respiratoires	TLR3 ligand, Influenza	IL29, IL28A, IL28B	Ioannis, J Virol 2013
Cellules épithéliales colon	TLR3 ligand	IL29	Swider, Cytokine 2014
Hépatocytes primaires et lignées	TLR3 ligand, Hepatitis C Virus	ARNm IL28 et IL29	Lee, J Biol Chem 2014

Figure 5 : Les interférons de type III sont produits par certaines populations immunitaires et par différentes cellules épithéliales en réponse à une variété de ligand de TLR et de virus. La production d'interférons de type III peut faire suite à la reconnaissance de virus ou de ligands de TLR à ADN (TLR9 ligand, HSV) ou à ARN (TLR3 ligand, Influenza, Sendai Virus, Hepatitis C Virus, Vesicular Stomatitis Virus, Rhinovirus). L'expression d'ARN messager (ARNm) est à prendre avec précaution car il n'est pas certains qu'elle soit représentative des cytokines réellement produites.

de deux sous unités, l'IFN- α R1 et l'IFN- α R2, connu sous le nom d'IFNAR (IFN- α receptor) (Domanski and Colamonici, 1996; Prejean and Colamonici, 2000). L'IFN- γ , unique représentant des interférons de type II, interagit pour sa part avec l'IFNGR (IFN- γ receptor), composé également de deux sous unités, l'IFN- γ R1 et l'IFN- γ R2.

2) Découverte des interférons lambda

Une troisième famille d'interférons, fut caractérisée au début des années 2000 (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Chez l'homme, cette famille comporte quatre cytokines appartenant également à la famille de l'IL-10 : l'IFN- λ 1 (IL-29), l'IFN- λ 2 (IL-28A), l'IFN- λ 3 (IL-28B) et l'IFN- λ 4. Les gènes codants pour ces cytokines sont présents sur le chromosome 19 (19q13) et sont composés de 5 exons (Donnelly and Kotenko, 2010). L'IFN- λ 1 possède 81% d'homologie avec l'IFN- λ 2 et l'IFN- λ 3 alors que ces derniers possèdent 96% d'homologie entre eux, le second venant probablement d'une duplication du premier. L'IFN- λ 4 n'est quant à lui exprimé que chez certains individus porteur d'un polymorphisme permettant sa transcription au sein de l'exon 1 (Prokunina-Olsson et al., 2013). Bien qu'appartenant à la famille des interférons de type III, sa séquence ne présente que 29% d'homologies avec les autres IFN- λ . Chez la souris, seuls les gènes codant pour les IFN- λ 2 et -3 sont exprimés, celui codant l'IFN- λ 1 étant un pseudogène. Le récepteur des IFN- λ , l'IFNLR (IFN- λ receptor), est exprimé chez l'homme et chez la souris (Kotenko et al., 2003; Lasfar et al., 2006; Sheppard et al., 2003). Il se compose d'une sous unité spécifique aux IFN- λ , l'IFN- λ R1 (IL-28R), et d'une sous unité interagissant également avec d'autres cytokines (IL-10, IL-22 et IL-26), l'IL-10R2 (Donnelly et al., 2004; Kotenko and Langer, 2004; Zdanov, 2010). L'interaction entre l'IFN- λ 1 et la sous unité IFN- λ R1 est bien caractérisée et repose principalement sur des forces de van der Waals et des contacts hydrophobes (Miknis et al., 2010).

B. Régulation des interférons lambda

1) Induction des interférons lambda

a) Quelles populations cellulaires produisent l'interféron lambda ?

A l'instar des interférons de type I, les interférons de type III possèdent des propriétés antivirales et sont donc exprimés en présence d'un large spectre de virus, par certaines cellules immunitaires, par les hépatocytes et par une grande variété de cellules épithéliales (Figure 5) (Coccia et al., 2004; Kotenko et al., 2003). Leur transcription est inductible en quelques heures suite à l'engagement de différents PRR, conférant au système immunitaire un éventail de réponses adaptées en fonction des pathogènes rencontrés. L'expression des IFN- λ peut faire suite à l'engagement du TLR7 par l'Imiquimod ou du TLR9 par CpG pour les pDC et du TLR3 par polyI:C pour les DC BDCA3^{high} ou les MoDC (Coccia et al., 2004; Lauterbach et al., 2010). Les macrophages dérivés de monocytes (MDM) et les MoDC répondent également au LPS

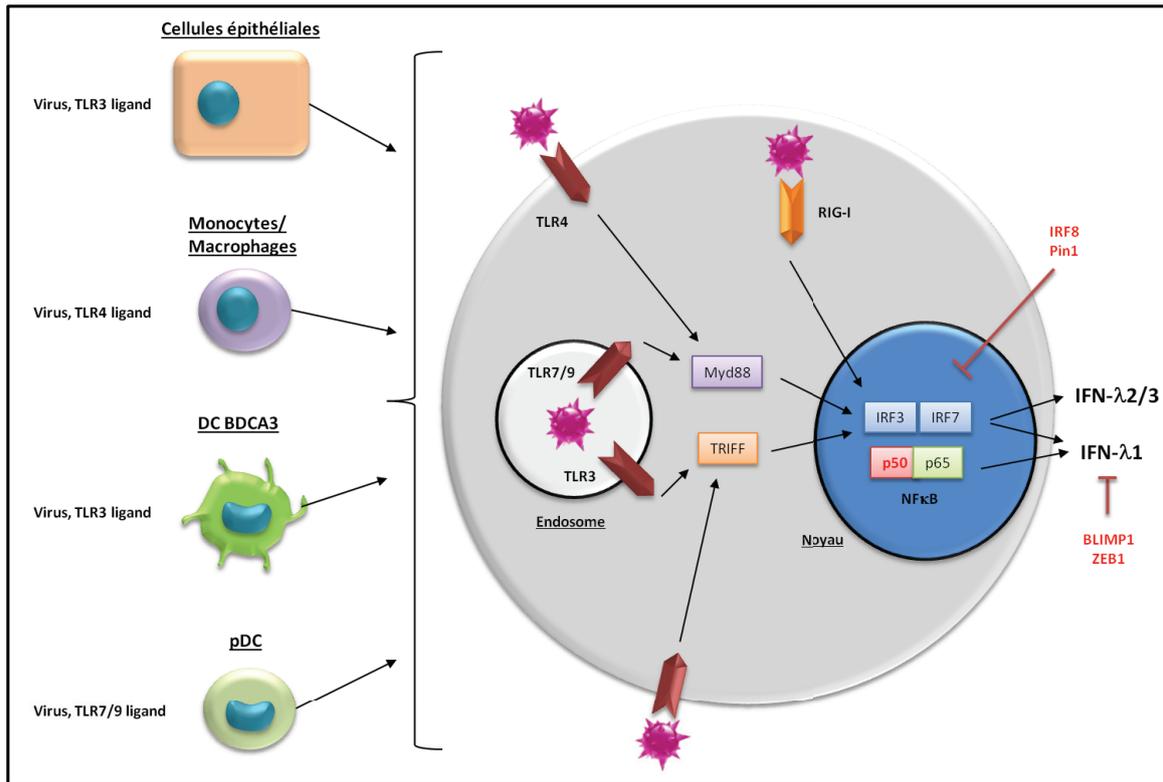


Figure 6 : Représentation schématique des voies de signalisation aboutissant à la production d'IFN-λ suite à l'engagement des TLR3, TLR4, TLR7 et TLR9 ou de RIG-I par des virus ou des ligands spécifiques de ces PRR. En présence de leurs ligands, les TLR et RIG-I vont induire l'expression des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF-κB aboutissant à la production d'IFN-λ. La transcription de ces derniers peut par ailleurs être inhibée par différentes protéines telles qu'IRF8, Pin-1, BLIMP-1 ou ZEB1.

(lipopolysaccharide), un ligand de TLR4. Il est intéressant de noter qu'une sensibilisation préalable des MDM avec de l'IFN- α augmente l'expression du TLR4 et induit celle du TLR3 et du TLR7 permettant une forte réponse IFN- λ en présence d'activateurs de ces TLR (Siren et al., 2005). De la même manière, la production d'IFN- λ par les pDC est amplifiée après traitement avec de l'IFN- α ou de l'IFN- λ (Yin et al., 2012). L'expression des IFN- λ_1 , - λ_2 et - λ_3 par des monocytes, des MDM, des MoDC et différentes sous populations de DC en présence de différents ligands de TLR a été comparé au sein de la même étude (Hillyer et al., 2012). Il apparaît que l'IFN- λ_1 , tout comme l'IFN- β , est produit en réponse au polyI:C et au LPS par les monocytes, les MDM et par les différentes populations de DC étudiées. Les IFN- λ_2 et - λ_3 sont exprimés par les DC, et principalement par les DC BDCA3^{high} en réponse à polyI:C ou à HCV (Lauterbach et al., 2010; Yoshio et al., 2013).

b) Voies de signalisation conduisant à la production des interférons lambda

Les voies d'induction des IFN- λ sont schématisées dans la [Figure 6](#) et ont été principalement étudié par Osterlund et son équipe dans un modèle de cellules HEK293 transfectées (Osterlund et al., 2007). Certaines voies de signalisation décrites par la suite ne sont donc peut-être pas activées en conditions physiologiques. Tout d'abord, l'analyse des régions proximales et distales des promoteurs des IFN- λ révèle la présence de plusieurs sites de fixation potentiels pour leur facteur de transcription NF- κ B (Siegel et al., 2011; Thomson et al., 2009). Cependant, lors d'infections par HCV, seul l'IFN- λ_1 est induit par le NF- κ B, se fixant au niveau du promoteur proximal (<1000 paires de bases en amont du gène). Les trois IFN- λ sont par contre induits également par l'IRF3 et l'IRF7 (Lee et al., 2014). Ces derniers se fixent en effet sur un site ISRE (Interferon Stimulated Response Element) et un site PRDI (Positive Regulatory Domain I) situés au niveau des promoteurs proximaux. L'expression des IFN- λ corrèle d'ailleurs généralement avec une légère induction d'IRF3 et une forte induction d'IRF7 et RIG-I (Onoguchi et al., 2007; Osterlund et al., 2007; Siren et al., 2005). En amont, les protéines adaptatrices TRIF impliquées dans la signalisation via le TLR3 et le TLR4, et Myd88 impliquée dans celle de tous les TLR hormis le TLR3, interviennent également dans l'induction des IFN- λ . L'expression des IFN- λ est cependant plus forte après activation de TRIF. Outre les TLR, les RLR (RIG-I Like Receptors), et en particulier RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene 1) ainsi que les protéines situées en aval de ce PRR sont également importants pour l'induction des IFN- λ . Notons que l'IFN- λ_1 est toujours le plus exprimé, quel que soit la voie de signalisation engagée. Son profil d'induction est similaire à celui de l'IFN- β alors que le profil d'induction de l'IFN- λ_3 est proche de celui de l'IFN- α (Osterlund et al., 2007). Tous ces résultats obtenus *in vitro* concordent avec des déficiences de production d'IFN- λ observées en clinique chez des patients atteints de HSE (Herpes Simplex Encephalitis) et déficients pour TLR3 ou pour Unc93B1, une protéine connue pour s'associer aux TLR3, TLR7 et TLR9 (Casrouge et al., 2006; Zhang et al., 2007).

Chez la souris, l'expression des IFN- λ est également sous contrôle d'IRF3 et peut être induite par l'engagement de TLR ou de la voie RIG-I. Elle est par ailleurs potentialisée par l'IFN- α (Ank et al., 2008; Onoguchi et al., 2007). Notons qu'en cas d'infections, l'IFN- λ ne semble pas pouvoir contrôler le développement du virus en l'absence d'adjuvants engageant les TLR tels que polyI:C ou CpG (Ank et al., 2008). Parmi les cellules immunes, les DC CD8 α^+ et les pDC sont capables de produire de l'IFN- λ à un niveau comparable suite à une infection par HSV-1 ou le parapoxvirus mais dans le cas du virus Sendai seules les pDC expriment l'IFN- λ . Les DC CD8 α^+ sont quant à elles les seules cellules à répondre à polyI:C, que ce soit *in vivo* ou *ex vivo*. Cette réponse, dépendante du TLR3, d'IRF3 et d'IRF7, peut être potentialisée par d'autres ligands de TLR ou par l'IFN- γ (Lauterbach et al., 2010).

2) Inhibition de la production des interférons lambda

L'inhibition des IFN- λ n'a pas encore été étudiée en détails mais il semble que les IFN- λ soient globalement soumis aux mêmes mécanismes inhibiteurs que ceux décrits pour les interférons de type I. Tout d'abord, pour l'IFN- λ_1 , des sites présents au niveau du promoteur permettent à des facteurs répresseurs de s'y fixer. Ainsi, la protéine BLIMP-1 (B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1), connue pour réprimer également l'expression de l'IFN- β , et ZEB-1 (Zinc finger E-box Binding homeobox 1) répriment toutes deux la transcription de l'IFN- λ_1 au sein des cellules épithéliales (Siegel et al., 2011; Swider et al., 2014). La sous unité p50, à l'inverse de la sous unité p65, du facteur de transcription NF- κ B réprime également l'expression des IFN- λ (Siegel et al., 2011) tout comme l'IRF8 qui se fixe de manière compétitive avec l'IRF3 et l'IRF7 sur leurs promoteurs. Il provoque au passage l'instabilité et la dégradation d'IRF7 (Osterlund et al., 2007). Par ailleurs, Pin-1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1) interagit avec la forme phosphorylée d'IRF3 et provoque son ubiquitynilation et sa dégradation par le protéasome (Saitoh et al., 2006). Pin-1 diminue ainsi l'induction des interférons de type I et des interférons de type III découlant des voies de signalisations dépendante de RIG-I, de TRIF, et de Myd88, indépendamment de NF- κ B (Osterlund et al., 2007).

C) Activité biologique des interférons lambda

Contrairement aux interférons de type I, les interférons de type III n'affectent pas tous les types cellulaires, en raison d'une expression non ubiquitaire de la sous unité IFN- λ R1. Les IFN- λ agissent ainsi principalement sur les cellules épithéliales, les neurones, les macrophages, les neutrophiles, les cellules NK et les DC mais n'ont que peu ou pas d'effet sur les autres populations hématopoïétiques, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les adipocytes (Blazek et al., 2015; Dickensheets et al., 2013; Lasfar et al., 2011; Sato et al., 2006; Witte et al., 2009). Il est ainsi possible d'envisager des traitements avec moins d'effets secondaires que ceux observés avec les interférons de type I. Il est également intéressant de noter que l'expression de l'IFN- λ R1 est réprimée au niveau épigénétique par la machinerie des histones déacétylases et peut être restaurée en inhibant ces

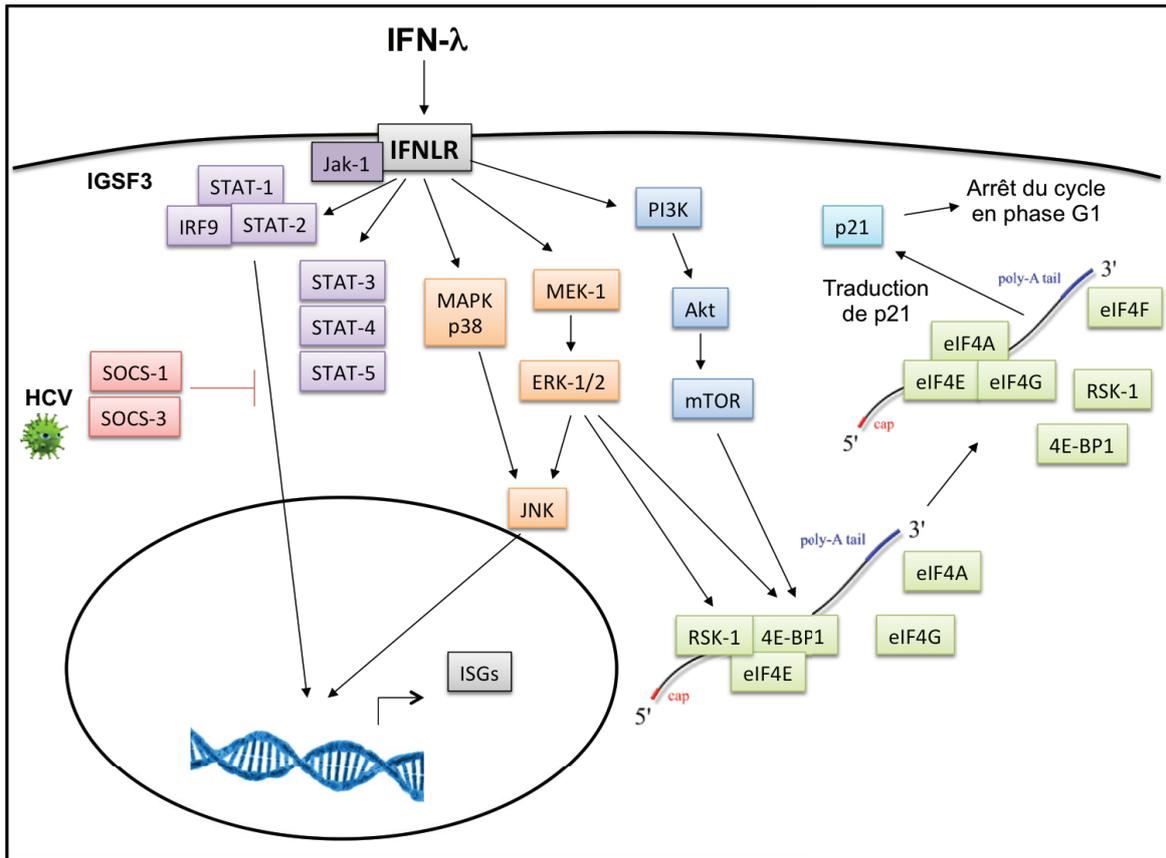


Figure 7 : Les IFN-λ activent différentes voies de signalisation. Par l'intermédiaire de Jak-1, le récepteur à l'IFN-λ recrute et active différentes protéines STAT aboutissant à l'expression d'ISG. Cette voie peut être inhibée dans le cadre d'infection par des virus tels que HCV. La voie des MAPK aboutit également à l'induction d'ISG ou comme la voie de PI3K, à la traduction de la protéine p21 et l'arrêt du cycle cellulaire.

enzymes (Ding et al., 2014). L'association de traitements inhibant les histones déacétylases, déjà utilisés en clinique, avec les IFN- λ pourraient ainsi potentialiser leur pouvoir anti-tumoral (West and Johnstone, 2014).

1) Engagement du récepteur et transduction du signal

La transduction du signal induit par les IFN- λ est décrite dans la [Figure 7](#). Elle a principalement été étudiée dans les cellules épithéliales.

a) Voie Jak-STAT

La fixation des IFN- λ sur la sous unité IFN- λ R1 de l'IFNLR induit le recrutement et l'activation par JAK (Janus Tyrosine Kinase) du complexe ISGF3 (IFN-Stimulated Gene Factor 3) composé des protéines STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) et STAT-2 ainsi que du facteur de transcription IRF9 (Kotenko et al., 2003). Le recrutement des protéines STAT par le récepteur de l'IFN- λ a été étudié à l'aide d'une lignée de lymphome transfectée pour l'IFNLR (Dumoutier et al., 2004). Chez l'homme, l'activation de STAT-2 nécessite les tyrosines 343 et 517 de la sous unité IFN- λ R1. En particulier la séquence entourant la tyrosine 343 possède de fortes similarités avec celle entourant la tyrosine 466 de la sous unité IFN- α R1 du récepteur des interférons de type I connu pour recruter également STAT-2 via le motif SH2 (Src-Homology 2) (Krishnan et al., 1998). Les tyrosines 343, 406 et 517 de l'IFN- λ R1 sont également impliquées dans le recrutement de STAT-5 mais ne sont pas nécessaires pour la phosphorylation de STAT-1, STAT-3 et STAT-4. Par ailleurs, comme pour les interférons de type I, l'activation de STAT-4 par les interférons de type III est indépendante de STAT-2 (Dumoutier et al., 2004; Nguyen et al., 2002). Chez la souris, le recrutement d'ISGF3 passe probablement par les tyrosines 341 et 533 dont les séquences alentours sont similaires à celles entourant les tyrosines 343 et 517 du récepteur humain (Lasfar et al., 2006). Deux différences entre l'activation par l'IFN- α et l'IFN- λ résident dans la différence de cinétique de phosphorylation des molécules STAT et dans l'intensité de cette induction. Il a en effet été montré dans une lignée d'hépatocarcinome qu'en présence d'IFN- λ la phosphorylation de STAT-1 et de STAT-2 est plus précoce et plus faible qu'avec l'IFN- α (Marcello et al., 2006). Par ailleurs, le recrutement d'ISGF3 par les interférons induit l'activation de nombreux gènes appelés ISG (Interferon Stimulated Genes), codant pour des protéines impliqués dans la réponse antivirale chez l'homme et chez la souris (Ank et al., 2008; Doyle et al., 2006; Zhou et al., 2007). Là encore, une différence entre l'IFN- α et l'IFN- λ concerne la cinétique d'induction de ces gènes qui est cette fois, à l'inverse de ce qui est observé pour les molécules STAT-1 et STAT-2, plus tardive mais maintenue au cours du temps en présence d'IFN- λ (Marcello et al., 2006). Ceci peut potentiellement s'expliquer par une fixation plus faible d'ISGF3 au niveau des promoteurs lors de l'induction par l'IFN- λ .

b) Voie des MAPK et de la PI3K

Les voies de transduction des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et de la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), parallèlement ou en amont de celle des molécules STAT, sont également importantes dans l'induction des ISG. Suite à l'engagement de leur récepteur par les IFN- λ une phosphorylation rapide et transitoire d'ERK-1 (Extracellular signal-regulated kinase-1) et d'ERK-2, dépendante de MEK-1 (Meiosis-specific serine/threonine-protein kinase), est ainsi observée au sein de la lignée issue de cancer colorectal HT-29. La protéine JNK (c-Jun N-terminal kinase), Akt et la MAPK p38 sont également rapidement phosphorylées (Brand et al., 2005a; Zhou et al., 2007). Le rôle de cette MAPK avait été préalablement mis en évidence pour l'induction d'ISG par les interférons de type I (Platanias, 2005) et il apparaît que son inhibition, ainsi que celle des protéines JNK et ERK, altère la production d'ISG en présence d'IFN- λ (Zou et al., 2001). Il est intéressant de noter que seul STAT-1 est phosphorylée suite à l'activation des cellules HT29 par les IFN- λ (Brand et al., 2005a) alors que STAT-3 est également phosphorylée, bien que faiblement, au sein de la lignée issue de cancer pancréatique neuroendocrine BON-1 (Zitzmann et al., 2006). Dans ces deux lignées la phosphorylation de STAT-3 est induite par l'IFN- α . Ceci participe peut être à la différence d'induction des ISG discuté précédemment. Par ailleurs, les différences observées entre ces deux lignées concernant la phosphorylation de STAT-3 indiquent que l'activation des voies de signalisation induite par les IFN- λ est dépendante du tissu observé et ne peuvent pas être extrapolées.

2) Activité antivirale

a) Spectre d'action

Comme pour les interférons de type I, l'activité antivirale fut la première activité biologique caractérisée pour les IFN- λ (Kotenko et al., 2003). Les interférons de type I agissent cependant à plus faible dose et avec un spectre d'action plus large, en terme de cellules cibles, que les IFN- λ (Meager et al., 2005). Les IFN- λ possèdent malgré tout un rôle protecteur non négligeable contre différents virus, tels que HIV (Human Immunodeficiency Virus), HCV, VSV (Vesicular Stomatitis Virus), EMCV (Encephalomyocarditis Virus) ou le virus Mengo. De leur côté, les virus ont développé différentes stratégies basées sur l'inhibition de la voie JAK-STAT pour résister à cette réponse immune (Brand et al., 2005b; Huang et al., 2007). Il a par exemple été montré que le virus HCV est capable d'inhiber cette voie en induisant les protéines SOCS-1 (Suppressor Of Cytokine Signaling 1) et SOCS-3 (Brand et al., 2005b). A l'inverse, les IFN- λ bloquent l'expression de SOCS-3 par HCV en inhibant miR-122 (Lee et al., 2014).

b) Focus sur HCV et l'IFN- λ 4

La majeure partie des recherches effectuées sur l'activité antivirale des IFN- λ l'ont été en lien avec HCV qui représente un problème majeur de santé publique à travers le monde. Plusieurs travaux révélèrent en 2009 une association entre des polymorphismes à

proximité ou au sein du gène codant pour l'IFN- λ_3 et une meilleure réponse au traitement préconisé pour les patients infectés par HCV, combinant Interféron- α -pégylé et Ribavirin (Ge et al., 2009; Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009; Thomas et al., 2009). Ces polymorphismes, permettent d'expliquer pour moitié les différences de réponse aux traitements entre les populations d'origine européenne et africaine (Ge et al., 2009), et les pDC de patients porteurs de polymorphismes de bon pronostic produisent plus d'IFN- λ en réponse au virus, permettant probablement un meilleur contrôle de l'infection (Murata et al., 2014a; Stone et al., 2013). Ces polymorphismes sont d'ailleurs associés à une meilleure élimination spontanée du virus (Di et al., 2011; Thomas et al., 2009). De façon surprenante, l'expression des ISG dans le foie et la quantité d'IFN- λ dans le sérum de patients répondant efficacement au traitement est plus faible que chez les patients développant une hépatite chronique (Dill et al., 2011; Dolganiuc et al., 2012; Honda et al., 2010; Urban et al., 2010). Les polymorphismes de mauvais pronostic sont associés à une mutation permettant l'expression de l'IFN- λ_4 dont la séquence sensiblement différente des autres IFN- λ l'empêcherait potentiellement d'engager l'IFNLR (Bibert et al., 2013; Prokunina-Olsson et al., 2013). Ces résultats semblent indiquer qu'une réponse antivirale soutenue empêche les patients de répondre au traitement, probablement en raison d'une forte induction d'USP18 (Ubiquitin Specific Peptidase 18), un ISG inhibant la sensibilité des cellules à l'IFN- α et surexprimée par les patients non répondants (Dill et al., 2012; Francois-Newton et al., 2011). L'IFN- λ possédant des propriétés proches de celles de l'IFN- α , une étude clinique de phase 1 fut rapidement lancée. Ainsi, dès 2010, il apparut qu'une administration d'IFN- λ_1 pégylé, en combinaison ou non avec la ribavirin, permettait d'obtenir une réponse antivirale significative chez des patients atteints d'hépatite C chronique avec des effets secondaires modérés (Muir et al., 2010).

3) Activité anti-tumorale

a) Activité antiproliférative et pro-apoptotique

Les premières études sur l'activité antiproliférative des IFN- λ furent menées sur la lignée Daudi, exprimant faiblement l'IFN- λR_1 , et laissèrent penser que les interférons de type III n'inhibent pas la prolifération cellulaire (Sheppard et al., 2003). Cependant, d'autres travaux effectués sur une lignée de lymphome BWLICR2, transfectée de manière à exprimer fortement l'IFN- λR_1 , montrèrent par la suite que l'IFN- λ_1 possède une activité antiproliférative significative lorsque le niveau d'expression du récepteur est suffisant (Dumoutier et al., 2004). Cette observation fut vérifiée sur les lignées de gliome LN319 et de carcinome colorectal HCT116 et HT29 (Brand et al., 2005a; Meager et al., 2005). Cet effet antiprolifératif résulte d'une activation combinée de la voie des MAPK et de la voie de la PI3K par l'IFN- λ , aboutissant à la phosphorylation de différentes molécules impliquées dans le contrôle de la traduction dont p21 (Figure 7). Plus précisément, l'IFN- λ induit la phosphorylation d'ERK, de mTOR et de deux autres protéines essentielles situées en aval de ces voies de transduction, RSK1 (Ribosomal S6 Kinase 1) et 4E-BP1. Il en résulte

une dissociation du complexe 4E-BP-1/RSK-1 et un recrutement du complexe eIF4F, au niveau de l'ARN messager permettant l'initiation de la traduction de la protéine p21 impliquée dans l'arrêt des cellules en phase G₁ (Fujie et al., 2011; Kroczyńska et al., 2011; Li et al., 2010). La protéine du rétinoblastome, régulant aussi le cycle cellulaire, peut également être surexprimée en présence d'IFN-λ (Li et al., 2010). Cependant, l'activation de ces voies de transduction n'est pas retrouvée dans tous les types cellulaires et pourrait être restreinte à certaines lignées.

Un traitement prolongé avec de l'IFN-λ de certaines lignées cellulaires issues de tumeurs humaines ou murines peut également induire leur apoptose (Li et al., 2010; Li et al., 2008; Sato et al., 2006). Cet effet est dépendant du niveau d'expression de l'IFNLR par les cibles cellulaires et est associé à une hausse de l'expression du CMH de classe I, de STAT-1, des ISG et des caspases 3 et 7 (Li et al., 2010; Zitzmann et al., 2006). Cette apoptose peut être contrecarrée en inhibant les protéines JAK, partenaires bien connus des protéines STAT, ou à l'inverse être potentialisée par l'IFN-γ (Li et al., 2008). Il a aussi été montré que l'IFN-λ potentialise la mort cellulaire induite par certains traitements anticancéreux comme le 5-Fluorouracil et le cisplatine (Li et al., 2010).

b) *Inhibition de la croissance tumorale : action sur le système immunitaire*

Chez la souris, deux études utilisant les lignées B16 et B16/F10, issues de mélanome, ont obtenu des résultats contradictoires concernant l'inhibition de leur prolifération par l'IFN-λ, *in vitro* (Lasfar et al., 2006; Sato et al., 2006). Ces travaux s'accordent néanmoins sur une inhibition de la croissance tumorale lorsque ces lignées sont implantées *in vivo* en présence d'IFN-λ selon un mécanisme d'action indirect nécessitant les cellules NK mais n'induisant pas de réponse immunitaire mémoire. Ce résultat est inattendu car l'IFN-λ induit parallèlement l'expression du CMH de classe I à la surface des cellules B16. L'une de ces études révèle également une inhibition du pouvoir métastatique des cellules B16/F10 lorsque l'IFN-λ est délivré à proximité du site tumoral. Des résultats similaires, en termes de contrôle de la croissance tumorale et de réduction du nombre de métastases, ont également été obtenus avec une lignée de fibrosarcome MCA205 et une lignée d'hépatome BNL (Abushahba et al., 2010; Numasaki et al., 2007). Le modèle de fibrosarcome a également permis de mettre en évidence le rôle des lymphocytes T CD8 dans l'inhibition de la croissance tumorale par l'IFN-λ. Bien que présents en plus grand nombre au niveau de la tumeur en présence d'IFN-λ, les lymphocytes T CD8 ne sont recrutés directement par cette cytokine. L'injection d'IFN-λ chez les souris induit également une légère augmentation du nombre de cellules NK dans la rate. La sécrétion d'IFN-γ et l'activité cytolytique des lymphocytes T CD8 et des cellules NK ne sont quant à elles pas modulées *in vitro* par l'IFN-λ. Enfin, l'IL-12 et l'IFN-λ sont capables de collaborer pour induire une meilleure réponse des cellules NK et des lymphocytes T CD8 via un mécanisme qui reste à élucider (Numasaki et al., 2007). Dans le

modèle d'hépatome, l'induction par l'IFN- λ d'une sécrétion rapide d'IL-12 (<24h) puis d'IFN- γ (96h) par les splénocytes est associé à une réponse cytotoxique médiée par les cellules NK. Les auteurs de ces travaux émettent l'hypothèse selon laquelle, l'IFN- λ induit cette réponse par l'intermédiaire des pDC et des cDC car les autres splénocytes sont incapables de répondre directement aux interférons de type III. Cependant, d'autres travaux montrent que l'activation des cellules NK peut également se faire indirectement par une induction de la sécrétion d'IL-12 par les MDM (de Groen et al., 2015), et très récemment l'utilisation de souris déficientes pour l'IL-28R a permis de démontrer que l'IFN- λ contribue au contrôle de la croissance tumorale via une action directe sur les cellules NK (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2015).

4) Immunorégulation

Outre leur action directe à l'encontre des cellules infectées ou tumorales, l'IFN- λ est aussi impliqué dans la modulation des réponses immunitaires innée et adaptative comme nous l'avons vu dans le cas de tumeurs implantées chez des souris. Un traitement des DC murines immatures avec de l'IFN- λ induit leur maturation et leur migration jusqu'aux organes lymphoïdes. Cependant, chez l'homme, la maturation des MoDC et des pDC en présence d'IFN- λ_1 ne semble pas totale. En effet, l'IFN- λ_1 induit l'expression des CMH de classe I et de classe II à la surface des DC mais d'autres marqueurs classiquement observés pour évaluer leur maturation tels que CCR7, CD40, CD62L, CD80, CD83 ou CD86 ne sont pas ou peu modulés (Megjugorac et al., 2009; Mennechet and Uze, 2006). De plus, les MoDC traitées avec de l'IFN- λ_1 conservent leur capacité d'endocytose et induisent moins efficacement la prolifération de lymphocytes T CD4 que celles traitées avec de l'IFN- β ou du LPS. Les lymphocytes issus de cette activation sont enrichis en lymphocytes T régulateurs CD25^{high} FoxP3⁺ via un mécanisme nécessitant l'IL-2 (Mennechet and Uze, 2006). D'autres résultats montrent par ailleurs que l'IFN- λ_1 induit la production d'IL-12 par les MoDC et que ces dernières induisent préférentiellement une différenciation des lymphocytes vers un profil Th1 au détriment du profil Th2 (Jordan et al., 2007). Chez la souris, l'IFN- λ_2 induit également une réponse Th1 et inhibe les réponses Th2 et Th17 (Koltsida et al., 2011).

L'IFN- λ induit également une forte expression de PD-1 (Programmed cell-Death 1) et PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), deux récepteurs immunosuppresseurs, à la surface des MoDC (Dolganiuc et al., 2012). Ces observations sont en adéquation avec des travaux menés *in vivo* montrant que les IFN- λ régulent la réponse T effectrice et mémoire en cas d'infections aiguës par LCMV (Lymphocytic choriomeningitis virus). Lors d'infections persistantes, les IFN- λ permettent au contraire de maintenir une réponse immunitaire adaptative (Misumi and Whitmire, 2014). Les IFN- λ induisent par ailleurs l'expression d'ISG par les MDM, via la voie JAK-STAT, ainsi que le TLR3, Myd88, TRIF et IRF7 leur permettant ainsi de contrôler l'infection par HIV (Hou et al., 2009). Les IFN- λ sensibilisent aussi les MDM à leur action en induisant l'expression des deux sous unités du

récepteur à l'IFNLR. A dose égale, il apparaît que l'IFN- λ_3 est l'interféron de type III le plus efficace pour induire une activité antivirale dirigée contre HIV (Liu et al., 2012).

Chapitre II : Système immunitaire et tumeurs : focus sur les cellules dendritiques

La capacité du système immunitaire à lutter contre les tumeurs fut décrite pour la première fois par William B. Coley qui observa au dix-neuvième siècle, chez des patients souffrant de sarcome, une régression tumorale après leur avoir injecté des toxines bactériennes. Macfarlane Burnet et Lewis Thomas évoquèrent à nouveau l'importance du système immunitaire en formulant, en 1957, l'hypothèse selon laquelle l'apparition de nouveaux antigènes suite à l'accumulation de mutations au sein des cellules tumorales pourrait induire une réponse immunitaire conduisant à l'élimination des tumeurs naissantes. Cette hypothèse introduisit le concept d'immunosurveillance des cancers mais par manque de preuves concrètes l'immunothérapie mit encore du temps à émerger comme une alternative thérapeutique crédible. En effet, en l'an 2000, le système immunitaire n'était toujours pas évoqué comme facteur limitant ou favorisant le développement tumoral lorsqu'un article paru dans le journal *Cell* répertoria les caractéristiques du cancer (Hanahan and Weinberg, 2000). Ce n'est qu'en 2011 que la communauté scientifique, hors immunologistes, adjoignit aux précédentes caractéristiques l'inflammation et l'échappement au système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011). Suites aux récentes avancées, l'immunothérapie fut finalement déclarée percée scientifique de l'année en 2013 dans le journal *Science* (Couzin-Frankel, 2013). En effet, l'idée de cibler le système immunitaire avait refait surface deux décennies auparavant grâce à des travaux chez la souris montrant qu'il était possible d'induire une régression tumorale en inhibant CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4), un récepteur inhibant la réponse des lymphocytes T (Leach et al., 1996). Ces résultats menèrent à un essai clinique montrant que le blocage de ce récepteur par l'Ipilimumab, un anticorps thérapeutique, permet d'augmenter significativement la survie de patients atteints de mélanomes avancés, apportant un réel gain dans ces pathologies sans options thérapeutiques jusqu'alors (Hodi et al., 2010). De la même manière, le blocage de PD-1, un autre récepteur bloquant la réponse immune et dont le ligand est surexprimé par les tumeurs, permet de prolonger encore un peu plus la survie des patients atteints de mélanome (Wolchok et al., 2013). Dans les lymphomes, des résultats cliniques positifs furent également obtenus quelques années auparavant grâce à des administrations répétées de rituximab, un anticorps dirigé contre CD20 (McLaughlin et al., 1998).

En parallèle de ces travaux, de nombreux résultats déterminants ont été obtenus au cours des deux dernières décennies, grâce à l'amélioration des outils techniques et des modèles murins (Vesely et al., 2011). Ceux-ci ont permis de faire émerger le concept « d'immunoediting » selon lequel le développement tumoral est associé à trois phases. Tout d'abord la phase d'élimination durant laquelle la majorité des cellules tumorales sont détruites par le système immunitaire, suivie d'une phase d'équilibre au cours de laquelle les rares cellules tumorales ayant échappées à cette destruction s'adaptent avant de proliférer durant la phase d'échappement, tout en établissant un microenvironnement

inhibant le système immunitaire (Mittal et al., 2014; Schreiber et al., 2011). L'origine du concept d'immunoediting vient d'observations effectuées chez des souris RAG2^{-/-}, déficientes en lymphocytes T, B et NKT. D'une part, ces souris développent plus de tumeurs épithéliales spontanées démontrant que les lymphocytes contrôlent le développement de tumeurs. D'autre part, des tumeurs provenant de ces souris sont moins agressives que celles provenant de souris sauvages lorsqu'elles sont réimplantées chez de nouveaux hôtes. Il apparaît ainsi que le système immunitaire contrôle la croissance tumorale mais induit également une adaptation des cellules survivantes vers un phénotype plus agressif (Shankaran et al., 2001; Shinkai et al., 1992). Plus tard, il fut également démontré que les lymphocytes T sont essentiels durant la phase d'équilibre (Koebel et al., 2007). Outre les lymphocytes, de nombreuses autres populations immunitaires telles que les cellules NK, les macrophages, les granulocytes, les MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells) et les DC ont également été étudiées dans le contexte tumoral (Mittal et al., 2014) mais nous ne nous intéresserons ici qu'aux DC.

I. Mise en évidence des cellules dendritiques dans les tumeurs solides

A. Présence des cellules dendritiques dans les tumeurs

En raison de leur rôle clé dans l'initiation de la réponse immunitaire, la présence des DC associées aux tumeurs fut rapidement évaluée. Des cellules de Langerhans furent ainsi observées dès 1983 parmi les cellules immunitaires infiltrant les mélanomes (Poppema et al., 1983). Les premières études s'appuyèrent sur l'expression de la protéine S-100 pour caractériser les cellules myéloïdes sans distinguer les différentes sous populations. La présence de DC fut ainsi validée dans les cancers du sein (Lespagnard et al., 1999), colorectal (Dadabayev et al., 2004), du poumon (Inoshima et al., 2002), de l'ovaire (Bethwaite et al., 1996), du rein (Kobayashi et al., 2007), de la tête et du cou (Reichert et al., 2001) ou gastrique (Tsujitani et al., 1990). Ces études permirent également de montrer que les DC sont aussi bien localisées en zone péri-tumorale qu'en zone intra-tumorale. Par la suite, des marqueurs supplémentaires ou complémentaires tels que CD83, DC-LAMP (Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein) ou CD1a permirent de distinguer les DC matures et immatures dans ces cancers (Bell et al., 1999; Kobayashi et al., 2007; Suzuki et al., 2002). Il apparut alors que les DC infiltrant les tumeurs du sein et les tumeurs colorectales sont généralement plus immatures que celles situées dans la zone péri-tumorale ou la marge invasive (Bell et al., 1999; Suzuki et al., 2002). Des études plus récentes se sont également intéressées aux différentes sous populations de DC infiltrant les tumeurs. Ainsi, à l'aide des marqueurs CD123 ou Clec4C, la présence de pDC a été mise en évidence dans les cancers du sein (Treilleux et al., 2004), colorectal (Nagorsen et al., 2007), du poumon (Tabarkiewicz et al., 2008), de l'ovaire (Labidi-Galy et al., 2011), de la tête et du cou (Hartmann et al., 2003) et les mélanomes (Salio et al., 2003). Une autre étude révéla que les cellules de Langerhans et les pDC se situent en zone péri-tumorale alors que les DC de type dermique sont aussi bien situées

aux pourtours ou au sein des mélanomes (Vermi et al., 2003). Enfin, très récemment, des DC BDCA1⁺ et des DC BDCA3^{high} ont été mise en évidence par cytométrie en flux au sein de métastases de mélanomes malgré leur rareté (Broz et al., 2014). L'identité des DC BDCA3^{high} n'a cependant pas été confirmée avec d'autres marqueurs dans cette étude. Les auteurs se sont en revanche appuyés sur TCGA (The Cancer Genome Atlas) qui est une base de données collaborative regroupant les résultats de séquençages de nombreux cancers. A partir des données du TCGA, ils ont montré un enrichissement en gènes spécifiques des DC BDCA3^{high} tels qu'IRF8, Batf3 ou Clec9A vis-à-vis d'autres gènes spécifiques du lignage myéloïde dans des cancers du poumon, de la tête et du cou ainsi que dans des mélanomes. Cet enrichissement en gènes spécifiques des DC BDCA3^{high} est associé à un meilleur pronostic dans ces cancers (Broz et al., 2014).

Il apparaît donc que toutes les populations de DC peuvent être présentes au sein ou en bordure des sites tumoraux.

B. Corrélation entre maturité des cellules dendritiques et bon pronostic

L'impact pronostic des DC dépend de différents facteurs dont leur niveau d'infiltration et leur état de maturation. En effet, un infiltrat en DC matures impacte positivement la survie de patients atteints de mélanomes et négativement le développement de métastases dans les ganglions drainant le site tumoral (Ladanyi et al., 2007; Movassagh et al., 2004). Il semble donc que les DC matures soient fonctionnelles et possèdent des propriétés anti-tumorales. Notons que la corrélation entre infiltrat en DC matures et survie des patients se vérifie également dans d'autres cancers tels ceux du sein (Iwamoto et al., 2003) et du rein (Kobayashi et al., 2007). Par ailleurs, certaines tumeurs comportent des zones particulières dont la structure est proche de celle des organes lymphoïdes. Ces structures appelées « lymphoïdes tertiaires », sont riches en lymphocytes T, en lymphocytes B et en DC matures, et ont notamment été observées dans le cancer du poumon où leur présence est associée à une signature immunitaire Th1/cytotoxique ainsi qu'à une meilleure survie à long terme des patients (Dieu-Nosjean et al., 2008; Goc et al., 2014). Outre le poumon, des zones riches en lymphocytes et en DC matures ont par ailleurs été observées dans les cancers du sein, du rein, du colon ainsi que dans les mélanomes et les métastases associées à ces cancers et sont à chaque fois associés à un bon pronostic (Dieu-Nosjean et al., 2014; Goc et al., 2013). Dans le cancer du rein, la localisation des DC matures influe particulièrement sur la survie des patients puisque la présence de DC matures, DC-LAMP⁺, dans les structures lymphoïdes tertiaires est associée à un bon pronostic alors que leur présence en dehors de ces structures est associée à un mauvais pronostic (Giraldo et al., 2015).

Notons que la présence de TGF- β (Transforming growth factor beta) dans les tumeurs du sein et de l'estomac corrèle avec la présence de cDC immatures et un mauvais pronostic (Ananiev et al., 2011; Iwamoto et al., 2003).

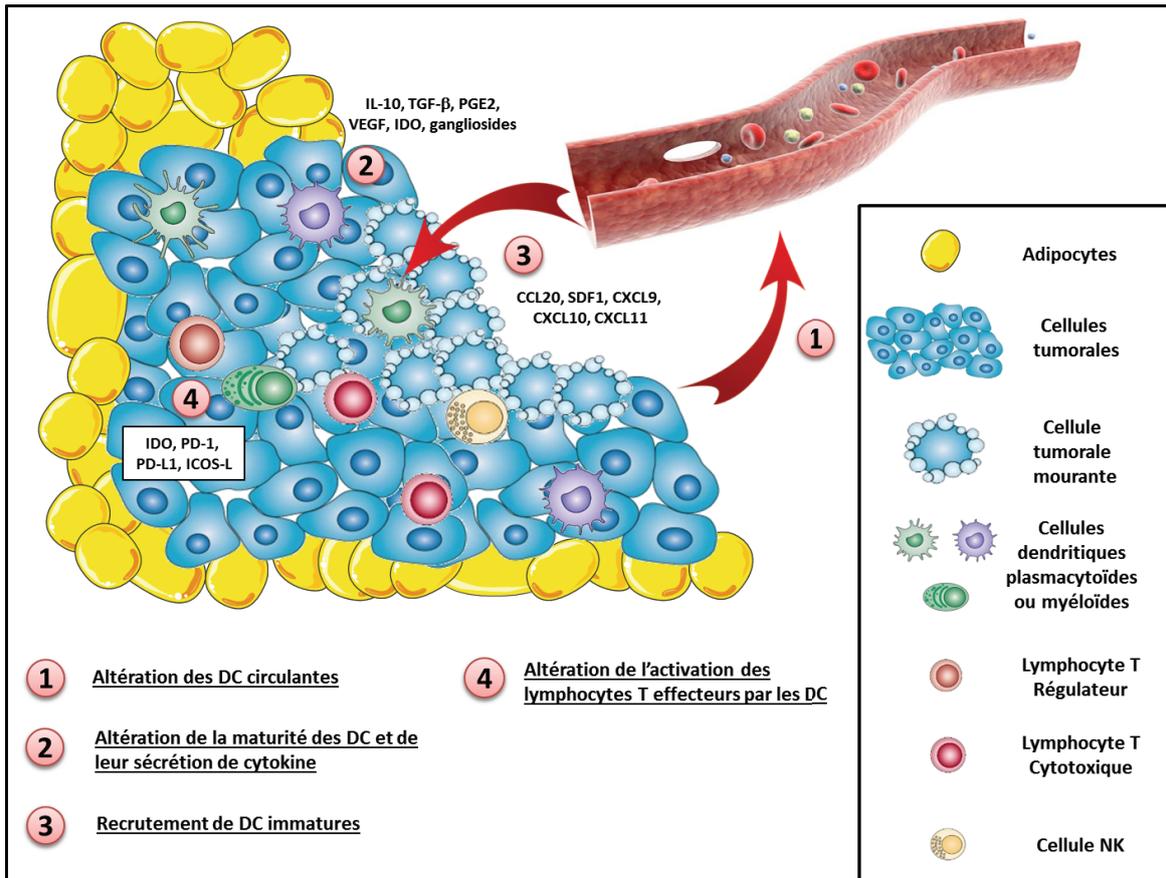


Figure 8 : Schéma des mécanismes d'immunoéchappement tumoraux liés à une altération des cellules dendritiques. Les cellules tumorales 1) altèrent le nombre et la qualité des DC circulantes, 2) altèrent la maturité des DC infiltrant la tumeur ainsi que leur sécrétion de cytokine, 3) recrutent des DC immatures et inhibent leur migration vers les organes lymphoïdes et 4) altèrent l'activation de lymphocytes T effecteurs par les DC.

C. Recrutement des cellules dendritiques

L'une des premières observations laissant envisager un recrutement actif des DC au niveau du site tumoral découle de l'étude d'une cohorte de patientes atteintes de cancer de sein montrant que la densité des DC infiltrantes augmente avec le grade et la taille des tumeurs. Dans cette étude le nombre de DC n'est cependant pas corrélé à la survie des patientes (Lespagnard et al., 1999). Ce recrutement se fait par l'intermédiaire de différentes chimiokines. En particulier, les cellules de mélanomes produisent CCL20 permettant le recrutement des DC circulantes surexprimant CCR6 chez les patients (Charles et al., 2010; Movassagh et al., 2004). SDF1 (Stromal cell-Derived Factor 1) a également été observé dans les mélanomes et les cancers de l'ovaire et permet le recrutement de pDC immatures via CXCR4 (Vermi et al., 2003; Zou et al., 2001) dont l'expression est notamment induite par le TGF- β et PGE2 (Prostaglandine E2) (Bekeredjian-Ding et al., 2009). Ce recrutement pourrait enfin être potentialisé en présence de ligands de CXCR3, qui ont été montré comme étant surexprimés dans certains cancers tels que les carcinomes basocellulaires ou dans le sérum de patients atteints de cancers gastriques (Lo et al., 2010; Rajkumar et al., 2010; Vanbervliet et al., 2003). Dans ces derniers, MIG (CXCL9) et IP-10 (CXCL10) semblent provenir des cellules endothéliales, des macrophages et des DC et sont également associés à la présence de lymphocytes infiltrants exprimant CXCR3 (Eck et al., 2003; Ohtani et al., 2009). De manière intéressante, l'IFN- λ induit d'ailleurs l'expression de MIG, IP-10 et I-TAC, les trois ligands de CXCR3 (Pekarek et al., 2007). A l'inverse, la migration des pDC vers les ganglions lymphatiques est inhibée par les tumeurs qui inhibent leur expression de CCR7 (Bekeredjian-Ding et al., 2009).

II. Mécanismes d'échappement aux cellules dendritiques

Si la présence de DC matures ou de certaines sous populations corrèle généralement avec un bon pronostic, l'inverse est également vrai. Ainsi, différents mécanismes d'échappement à la surveillance par les cellules immunitaires sont mis en place au sein du microenvironnement tumoral. Nous allons maintenant détailler ceux visant les DC et leurs fonctions principales (Figure 8).

A. Altérations des cellules circulantes

Les DC circulantes de patients ont été étudiées dans différents cancers. Le sang étant un compartiment facilement accessible, il est possible de comparer les cellules y circulant chez les patients et des donneurs sains. Il apparaît ainsi que le nombre de cDC circulantes est réduit chez les patients atteints de cancers de la tête et du cou, tout comme le nombre de pDC chez ceux atteints de cancers pancréatiques. Après résection, le nombre de DC est cependant restauré dans ces deux types de cancers (Hoffmann et al., 2002; Tjomsland et al., 2010). Ceci révèle la faculté des tumeurs à altérer les DC circulantes à distance via des facteurs solubles. Cette altération peut également être fonctionnelle. Il

a par exemple été montré que les DC issues de sang de patientes atteintes de cancer du sein sécrètent moins d'IL-12p40 en présence de LPS (Della et al., 2003). Plus récemment, une étude menée chez des patients atteints de cancer du rein a également révélé une forte altération du profil transcriptomique des monocytes circulants caractérisé par une surexpression de gènes pro-tumoraux (Chittezhath et al., 2014). L'altération des cellules circulantes est donc profonde et des monocytes issus de patientes atteintes de cancer du sein se différencient notamment en DC ayant un profil immunosuppresseur en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Ramos et al., 2012).

B. Induction de l'apoptose

Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, les cellules tumorales peuvent également induire l'apoptose des DC, pour se prémunir de leur surveillance. Cette apoptose a été pour la première fois visualisée directement sur des coupes de mélanomes et de tumeurs d'ovaire par marquage TUNEL et *in vitro* en co-cultivant directement des DC avec des cellules tumorales (Esche et al., 1999a). Cette étude révéla que l'apoptose des DC est induite à la fois par des facteurs solubles et par des interactions cellulaires directes. Par la suite, les gangliosides GM3 et GD3 dérivés de mélanomes ont été décrits comme induisant l'apoptose des DC en activant les caspases et ceci de façon dépendante des ROS (Reactive Oxygen Species) pour GD3 (Bennaceur et al., 2006; Peguet-Navarro et al., 2003). D'autres facteurs tels que l'oxyde nitrique et la mucine 2 ont également été décrits pour induire l'apoptose des DC (Ishida et al., 2008; Ma et al., 2013).

Cette apoptose est prévenue par stimulation de CD40 par son ligand, CD40L, ou en présence d'IL-12 ou d'IL-15 (Esche et al., 1999b; Pirtskhalaishvili et al., 2000). Ceux-ci induisent en effet l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large). De même, le TNF α protège les DC de l'apoptose en inhibant le largage de cytochrome c par les mitochondries et en induisant Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Esche et al., 2001).

C. Inhibition de la différenciation, de la maturation et de la présentation antigénique

Les tumeurs tendent à bloquer la différenciation et la maturation des DC pour favoriser la mise en place d'une réponse immunitaire tolérogène et limiter l'activation de lymphocytes T suite à la présentation des Ag tumoraux.

L'inhibition de la différenciation des DC a tout d'abord été observée en présence de lignées cellulaires de carcinome rénal. Celles-ci produisent abondamment de l'IL-6 et du M-CSF capables de bloquer la différenciation des progéniteurs CD34⁺ en DC (Menetrier-Caux et al., 1998). Par la suite, la présence d'IL-6 et du VEGF dans les sérums de patientes atteintes de cancer du sein s'est également avérée être un facteur de résistance aux traitements (Bachelot et al., 2003). L'inhibition de la différenciation de progéniteurs CD34⁺ en cellules de Langerhans, a également été observée en présence de

cellules de mélanome (Berthier-Vergnes et al., 2001) et par la suite, le ganglioside GM2, présent notamment dans les cancers de la peau, s'est avéré être un facteur inhibiteur de la différenciation de monocytes en DC (Wolfl et al., 2002). Le blocage de la différenciation des DC est ainsi un mécanisme important d'échappement au système immunitaire. Par exemple, les patientes atteintes de cancers du sein avancé (stade IV) ont ainsi un nombre réduit de DC circulantes alors qu'à des stades moins avancés cette altération n'est pas observée (Pinzon-Charry et al., 2007).

Par ailleurs, les DC circulantes de patients atteints de cancers du sein ou de cancers de la tête et du cou (Gabrilovich et al., 1997; Hoffmann et al., 2002), ainsi que celles infiltrant différents cancers tels que les carcinomes basocellulaires, les tumeurs du sein, les tumeurs d'ovaire ou les mélanomes (Bell et al., 1999; Nestle et al., 1997; Vermi et al., 2003; Zou et al., 2001) sous-expriment le CMH de classe II, indiquant un défaut de maturation. Elles expriment également plus faiblement les molécules de costimulation CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) et ceci est associé à un défaut de présentation d'Ag aux lymphocytes T pour les DC circulantes (Gabrilovich et al., 1997) et à une altération d'induction de la prolifération des lymphocytes T pour les DC associées aux tumeurs d'ovaire (Zou et al., 2001). L'expression des CMH de classe I et de classe II à la surface des DC ainsi que leur capacité à présenter les Ag aux lymphocytes T CD4 et CD8 sont également altérés chez des souris implantées avec une lignée tumorale (Gabrilovich et al., 1997).

L'IL-10 a été identifié comme une cytokine jouant un rôle majeur dans l'inhibition de la présentation antigénique par les DC et sa présence dans le sérum de patients atteints de cancer est associé à un mauvais pronostic (Lippitz, 2013). L'IL-10 agit sur la signalisation des TLR en bloquant leur expression, en induisant leur dégradation ou en inhibant la transduction du signal (Mittal and Roche, 2015) et induit également la dégradation du CMH de classe II et de la molécule de costimulation CD86 via l'ubiquitine ligase March1 (Buelens et al., 1995; Caux et al., 1994). D'autres travaux menés chez la souris démontrent également un rôle du TGF- β et de PGE2 dans l'altération de la capacité des DC à activer la prolifération des lymphocytes T et dans l'inhibition de l'expression de CD40 [Scarlett, *J Exp Med* 2012]. Par ailleurs, l'absence d'oxygène au centre de la tumeur induit un stress hypoxique et l'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) permettant la mise en place d'une vascularisation. Cependant, outre cet effet proangiogénique, le VEGF altère également la maturation des DC chez la souris (Gabrilovich et al., 1998). Une corrélation inverse existe d'ailleurs entre la présence de VEGF et la quantité de DC matures dans les tumeurs de sein chez l'homme (Iwamoto et al., 2003). Par ailleurs, l'IL-10, le TGF- β , le VEGF, l'IDO (indoleamine-2,3-dioxygénase) et l'arginase sont impliqués dans l'induction de l'expression de TIM-3 (T cell Ig and mucin protein-3) à la surface des DC. TIM-3 interagit avec l'alarmine HMGB1, inhibant ainsi la détection par les DC de signaux de dangers provenant des acides nucléiques relâchés par les cellules tumorales (Chiba et al., 2012; Maurya et al., 2014).

La cinétique de recrutement des DC ainsi que leur modification de phénotype ont été étudiés en détails au cours du développement tumoral chez la souris dans des modèles de tumeurs ovariennes. Il apparaît ainsi que des DC CD11c⁺ régulatrices exprimant faiblement le CMH de classe II et le CMH de classe I et n'exprimant pas CD86, sont progressivement recrutés au sein des tumeurs (Krempski et al., 2011).

D. Altération de la production de cytokines

La production de cytokines par les DC est essentielle pour amplifier ou orienter la réponse immunitaire. Certains des facteurs précédemment décrits pour altérer la maturation et la présentation antigénique des DC inhibent ainsi également leur production de cytokine.

L'IL-10 joue encore une fois un rôle majeur en inhibant la production de différentes cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-12, l'IL-1 ou l'IL-6 et en induisant l'expression de SOCS1 et SOCS3 bloquant la signalisation des interférons (Mittal and Roche, 2015). Le VEGF, tout comme les chimiokines CCL2, CXCL1 et CCL5, ou les gangliosides dérivés de mélanomes inhibent également la sécrétion d'IL-12p70 par les DC (Michielsen et al., 2011; Peguet-Navarro et al., 2003). Cette inhibition n'est pas anodine puisqu'il a été montré chez la souris qu'elle empêche la mise en place d'une réponse T cytotoxique efficace (Ruffell et al., 2014). Les gangliosides tumoraux, tout comme le surnageant de tumeurs colorectales, favorisent également la production d'IL-10 par les DC, renforçant probablement l'inhibition de la production d'IL-12 (Michielsen et al., 2011; Peguet-Navarro et al., 2003). Ces résultats sont vérifiés chez la souris dont les DC, au cours du développement tumoral, sont progressivement altérées pour leur production d'IL-12 alors qu'elles produisent plus d'IL-10, d'IL-6 et de G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) (Krempski et al., 2011).

Les pDC peuvent également être altérées. Dans les cancers du sein et de l'ovaire, notre équipe a ainsi démontré l'impact négatif des pDC sur l'évolution clinique des patientes (Labidi-Galy et al., 2011; Treilleux et al., 2004). Ce mauvais impact pronostic est associé à une altération de leur capacité à produire de l'IFN- α les rendant tolérogènes vis-à-vis de la tumeur. Le TGF- β agit en synergie avec la PGE2 afin d'inhiber la production d'IFN- α et de TNF α par les pDC. PGE2 induit également la production d'IL-8 par les pDC, favorisant ainsi potentiellement l'angiogenèse (Bekeredjian-Ding et al., 2009; Hartmann et al., 2003). Dans le cancer du sein, notre équipe a également montré qu'en plus du TGF- β , le TNF α participe à l'altération de la sécrétion d'IFN- α par les pDC (Sisirak et al., 2013).

E. Altération des lymphocytes T

Les tumeurs vont également induire l'expression de molécules immunosuppressives par les DC, favorisant le recrutement de Treg ou l'induction de la mort des lymphocytes effecteurs.

Le traitement de DC avec de l'IL-10 induit l'anergie de lymphocytes surexprimant CTLA-4 et régulant l'activation d'autres lymphocytes T de manière antigène spécifique (Steinbrink et al., 1999; Steinbrink et al., 2002).

Par ailleurs, des DC IDO⁺ ont été observée dans les tumeurs et corrélient dans les cancers de la peau avec la masse tumorale (Kuales et al., 2011; Lee et al., 2011). IDO est une enzyme impliquée dans la dégradation du tryptophane dont la présence est nécessaire à la survie des lymphocytes T (Platten et al., 2014) et favorise également l'expansion des Treg (Fallarino et al., 2006). La production d'IDO par les DC peut faire suite à différentes stimulations telles qu'une activation par l'IFN- γ (Hwu et al., 2000; von et al., 2004), par PGE₂ (Braun et al., 2005), ou à une activation du récepteur AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) (Nguyen et al., 2010). La présence de DC péri-tumorales exprimant IDO a d'ailleurs été associée à l'expression de PGE₂ dans des cancers de l'estomac (von Bergwelt-Baildon et al., 2006). Plus récemment, dans les hépatocarcinomes, il a également été montré que la production d'IDO et d'IL-10 par les DC CD14⁺ nécessite l'expression de PD-1 et de CTLA-4 par ces cellules indiquant une association entre ces différents mécanismes suppressifs (Han et al., 2014). Le ciblage thérapeutique d'IDO a de plus démontré son efficacité chez des patientes atteintes de tumeurs gynécologiques en permettant d'induire des DC activant plus efficacement les lymphocytes T et permettant d'obtenir une réponse immunitaire avec des effets cliniques significatifs chez les patientes (Sioud et al., 2013).

D'autres molécules immunosuppressives sont également induites au cours du développement tumoral à la surface des DC. Chez la souris, il a été montré qu'elles acquièrent progressivement l'expression de PD-1, favorisant la croissance tumorale *in vivo* (Krempski et al., 2011), ainsi que celle de PD-L1 (Scarlett et al., 2012). Le TGF- β et PGE₂ pourraient être impliqués dans l'augmentation de PD-L1 à la surface des DC (Scarlett et al., 2012). L'interaction entre PD-1 et PD-L1 est connue pour inhiber la prolifération, la survie et les fonctions effectrices des lymphocytes T et promouvoir la différenciation de Treg (Zitvogel and Kroemer, 2012). Le blocage de PD-1 ou PD-L1 permet ainsi de limiter la progression tumorale en agissant au moins partiellement sur les DC (Curiel et al., 2003; Krempski et al., 2011). Chez l'homme, l'utilisation d'anticorps dirigés contre PD-1 ou PD-L1 permet également d'augmenter la survie de patients atteints de mélanomes, de tumeurs rénales et de tumeurs pulmonaires (Brahmer et al., 2012; Garon et al., 2015; Wolchok et al., 2013). Ces deux récepteurs, exprimés notamment pas les DC, jouent donc un rôle primordial lors du développement tumoral. Notons également que PD-1 possède un deuxième ligand, PD-L2, restreint aux macrophages et aux DC. L'efficacité légèrement supérieure des traitements bloquant PD-1 vis-à-vis de ciblant PD-L1 vient probablement de là (Zitvogel and Kroemer, 2012).

Notre équipe a également montré que la présence de pDC altérées participe au recrutement de lymphocytes T régulateurs (Sisirak et al., 2012). D'autres éléments viennent corroborer cette tolérogénicité des pDC associées aux tumeurs. En effet, dans

les ganglions lymphatiques drainant les mélanomes, il s'avère que les pDC sont les principales cellules productrices d'IDO (Gerlini et al., 2010) et que les pDC infiltrant les tumeurs de sein expriment ICOS-L (Inducible Costimulatory Molecule Ligand) qui leur permet d'interagir avec, et de recruter, les Treg via une interaction avec ICOS (Faget et al., 2012).

III. Mécanismes d'immunosurveillance

Les cancers sont diagnostiqués lorsqu'ils ont une taille et des effets biologiques détectables lors d'un examen clinique. A ce stade, les tumeurs ont généralement échappées à la réponse immunitaire. Ainsi, la plupart des résultats concernant l'immunosurveillance présentés par la suite ont été obtenus chez la souris.

1) Rôle de l'interféron de type I et des pDC ?

Les premiers éléments indiquant de façon indirecte un rôle potentiel des DC, dans le contrôle de la croissance tumorale viennent de travaux montrant que le blocage des interférons de type I, à l'aide d'anticorps neutralisants, favorise le développement de tumeurs implantées chez des souris immunocompétentes (Gresser et al., 1983). De manière similaire, l'inhibition d'IFNAR favorise la croissance d'une lignée de sarcome implantée chez des souris immunocompétentes et des souris IFNAR1^{-/-} ou IFNAR2^{-/-} sont plus sensibles à l'induction de tumeur par MCA (3'-methylcholanthrene), un agent chimique carcinogène (Dunn et al., 2005; Swann et al., 2007). Enfin, la pousse de carcinomes pulmonaires est plus agressive chez des souris IFN-β^{-/-} (Deonarain et al., 2003). L'ensemble de ces résultats démontrent le rôle essentiel des interférons de type I dans la protection anti-tumorale *in vivo*. Notons cependant que la source des interférons de type I dans ces modèles n'a pas été déterminée.

L'action anti-tumorale des interférons de type I passe principalement par les cellules hématopoïétiques des souris hôtes plutôt que par un effet direct sur les cellules tumorales (Deonarain et al., 2003; Dunn et al., 2005; Gresser et al., 1983). La nature des cellules immunes ciblées par les interférons de type I semble dépendre du modèle utilisé. La lignée RMA-S, issue de thymome, exprime très faiblement le CMH de classe I la rendant particulièrement sensible à la lyse par les cellules NK. Les interférons de type I joue un rôle essentiel dans le rejet de cette lignée en préservant le nombre de cellules NK et en participant, de façon précoce, à leur cytotoxicité induite par l'IL-2 sans affecter celle induite par d'autres interleukines telles que l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-21 (Swann et al., 2007). L'élimination de tumeurs du rein suite à un traitement combinant CpG et un adénovirus codant pour TRAIL nécessite la présence des pDC et des DC CD8α⁺. Leur absence entraîne en effet une moindre production d'interférons de type I et une altération du recrutement des lymphocytes T CD8 (James et al., 2014).

2) Rôle des cellules dendritiques CD8α⁺ ?

Les souris $Batf3^{-/-}$ sont, comme nous l'avons vu précédemment, spécifiquement dépourvues de DC $CD8\alpha^{+}$ et de DC $CD103^{+}$ essentielles pour l'activation des lymphocytes T CD8 par présentation croisée d'Ag. Cette déficience rend les souris $Batf3^{-/-}$ incapables d'endiguer la croissance tumorale après injection d'une lignée de fibrosarcome. Ces résultats sont sensiblement comparables à ceux observés pour des souris $RAG2^{-/-}$ dépourvues de lymphocytes. Les tumeurs de souris $Batf3^{-/-}$ sont également moins infiltrées en lymphocytes T CD8. L'induction d'une réponse CTL spécifique de la tumeur peut être restaurée en injectant une plus grande quantité de cellules tumorales, ce qui permet aux DC encore présentes chez les souris $Batf3^{-/-}$ d'activer les lymphocytes T CD8 malgré leur moindre faculté pour la présentation croisée d'Ag (Hildner et al., 2008). Un autre modèle de sarcome a permis de montrer que l'action des interférons de type I est médiée par les DC et non par les cellules NK. Les auteurs ne se sont pas intéressés aux pDC mais il apparaît que la présentation croisée d'Ag des DC $CD8\alpha^{+}$ est induite par les interférons de type I (Diamond et al., 2011). Un dernier modèle de mélanome a enfin permis de révéler que les interférons de type I induisent aussi le recrutement des DC $CD8\alpha^{+}$ dont la présence est encore une fois essentielle à l'élimination de la tumeur (Fuertes et al., 2011).

Rationnel et objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu dans l'**introduction**, de nombreuses études, en particulier chez la souris, indiquent que le système immunitaire participe au contrôle de la progression tumorale. Cependant, dans de nombreux cas, la tumeur échappe à cette réponse immune. Ainsi, il nous paraît essentiel de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cancer du sein et de l'ovaire pour réactiver une immunité anti-tumorale efficace. Chez la souris, différents travaux ont montré qu'il est possible de cibler des Ag tumoraux vers les DC CD8 α ⁺ spécialisées dans la présentation d'Ag exogènes aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, et d'induire de cette manière une régression tumorale. Cette stratégie instaure une mémoire immunitaire essentielle pour une protection à long terme contre les tumeurs. Des données publiées peu de temps avant le début de ma thèse ont montré que les DC humaines BDCA3^{high} possèdent la capacité d'activer des CTL par présentation croisée d'Ag et ce, de façon plus efficace que les autres populations de DC du sang, dans le cas d'Ag solubles ou cellulaires (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010; Poulin et al., 2010). Ainsi, les DC BDCA3^{high} humaines semblent être des cibles idéales pour une réactivation de l'immunité anti-tumorale. Néanmoins, les mécanismes associés à la présentation croisée d'Ag restent très peu connus tout autant que les paramètres qui pourraient moduler l'efficacité de cette voie, en particulier en contexte tumoral, que ce soit en termes de forme d'Ag, de type d'adjuvant ou d'interactions des DC BDCA3^{high} avec d'autres cellules du système immunitaire.

Par ailleurs, les DC BDCA3^{high} produisent de grandes quantités d'IFN- λ aux propriétés potentiellement intéressantes. En effet, chez la souris, l'IFN- λ possède une activité anti-tumorale via le recrutement de cellules lymphocytaires, parmi lesquelles les cellules NK jouent un rôle majeur (Sato et al., 2006). Les cellules NK sont capables de reconnaître les cellules tumorales exprimant faiblement le CMH de classe I et de les éliminer. Elles expriment également le récepteur membranaire CD16 leur permettant de fixer la région Fc d'anticorps liés à la surface de cellules. Ceci leur permet de lyser les cellules opsonisées par un processus appelé « antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity » (ADCC). Dans le cadre de cancers, ce processus peut être activé à l'aide d'anticorps ciblant des protéines mutées ou surexprimées à la surface des cellules tumorales. L'efficacité de ces traitements a clairement été démontrée en clinique (anti-CD20, anti-HER2) et de nombreux anticorps sont aujourd'hui en cours de développement. Outre leur activité cytolytique, les cellules NK semblent également jouer un rôle fondamental dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative CD4 et CD8, notamment via leurs interactions avec les DC. Chez la souris, il est désormais bien établi qu'il existe une coopération entre cellules NK et DC. Chez l'homme, cette coopération a également été démontrée dans une étude montrant qu'un traitement de patients avec du cetuximab (anticorps monoclonal spécifique de l'EGFR) induit une maturation des DC et augmente leur capacité à présenter un Ag tumoral grâce à l'activation des cellules NK (Stephenson et al., 2013). Ces résultats viennent compléter de nombreux travaux menés

in vitro chez l'homme ayant décrit des modulations fonctionnelles entre les cellules NK et les DC, amenant notre équipe à s'intéresser au rôle du dialogue NK-DC pour l'induction d'une réponse CTL anti-tumorale.

A l'aide d'un modèle *in vitro* utilisant des DC dérivées de monocytes (MoDC), notre équipe, et plus précisément Florence Deauvieu, a pu mettre en évidence l'importance des cellules NK, et en particulier de l'IFN- γ et du TNF α , dans l'induction de la présentation croisée d'Ag cellulaire. Dans la continuité de ces résultats, j'ai montré que ceci était également transposable aux DC BDCA3^{high}. Ainsi, j'ai généré les résultats permettant l'élaboration des Figure 6, S3 et S4 (Article 3 de la partie **résultats**). Ces observations, associées aux données de la littérature, nous ont permis de proposer que l'optimisation du dialogue NK-DC pourrait être essentielle pour rétablir une immunité anti-tumorale adaptative.

L'utilisation de DC BDCA3^{high} obtenues *in vitro*, en raison de leur rareté *in vivo*, nécessitait de les caractériser au mieux pour nous assurer de leur homologie avec les DC BDCA3^{high} circulantes. Dans ce contexte l'équipe de Marc Dalod avait préalablement obtenu des données transcriptomiques et phénotypiques indiquant que les DC BDCA3^{high} obtenues *in vitro* étaient d'une grande similarité avec celles du sang. Pour ma part, j'ai contribué à montrer que les DC BDCA3^{high} obtenues *in vitro* répondaient efficacement en présence de polyI:C et de R848, en particulier en terme d'expression de molécules de costimulation (CD40 par exemple). Par ailleurs, à l'aide du modèle de présentation croisée mis en place par Florence Deauvieu, j'ai pu générer des résultats qui ont permis d'établir que la présentation croisée d'Ag cellulaire par les DC BDCA3^{high} est induite par polyI:C et R848 (Article 2 de la partie **résultats**).

Enfin, l'infiltrat immunitaire au sein des tumeurs étant un facteur de pronostic important dans de nombreux cancers (Galon et al., 2006), une grande part de mon travail a consisté à mieux définir les fonctions spécifiques des DC BDCA3^{high}, d'analyser leur contribution à l'immunité cellulaire anti-tumorale, et d'évaluer leur compétence fonctionnelle et la valeur pronostic de leur présence dans des tumeurs primaires d'ovaire ou de sein. Les objectifs poursuivis ici étaient de caractériser la fréquence, le phénotype et les fonctions des DC BDCA3^{high} dans des cohortes prospectives de patientes atteintes de cancer du sein ou d'ovaire et d'analyser la fréquence des DC BDCA3^{high} dans des cohortes rétrospectives en corrélation avec l'évolution clinique des patientes. Je n'ai malheureusement pas pu atteindre tous ses objectifs. Les résultats obtenus seront cependant présentés sous la forme d'un article en préparation, montrant que les DC BDCA3^{high} sont présentes dans les tumeurs, sont moins fonctionnelles que celles du sang, et pourraient potentiellement être réactivées (Article 1 de la partie **résultats**). Pour être plus précis, mon travail a permis de générer les résultats des Figures 1, et 2 ainsi que des Supplementary.

Résultats

Résultats

Article 1 (en préparation)

Hypothèses de travail et objectifs

La découverte des DC est relativement récente dans l'histoire des Sciences mais leur rôle essentiel dans l'initiation des réponses anti-tumorales est aujourd'hui bien caractérisé chez la souris. Chez l'homme, il existe également de nombreuses évidences concernant leur présence dans les tumeurs et des études de corrélations montrent que la présence de DC matures corrèle avec un bon pronostic pour les patients. Dans les tumeurs de sein, une forte infiltration en pDC est par ailleurs associée à un mauvais pronostic clinique en raison de l'altération de leur sécrétion d'IFN- α par des facteurs solubles présents en forte concentration dans le microenvironnement tumoral, tels que par exemple le TGF- β et la PGE₂.

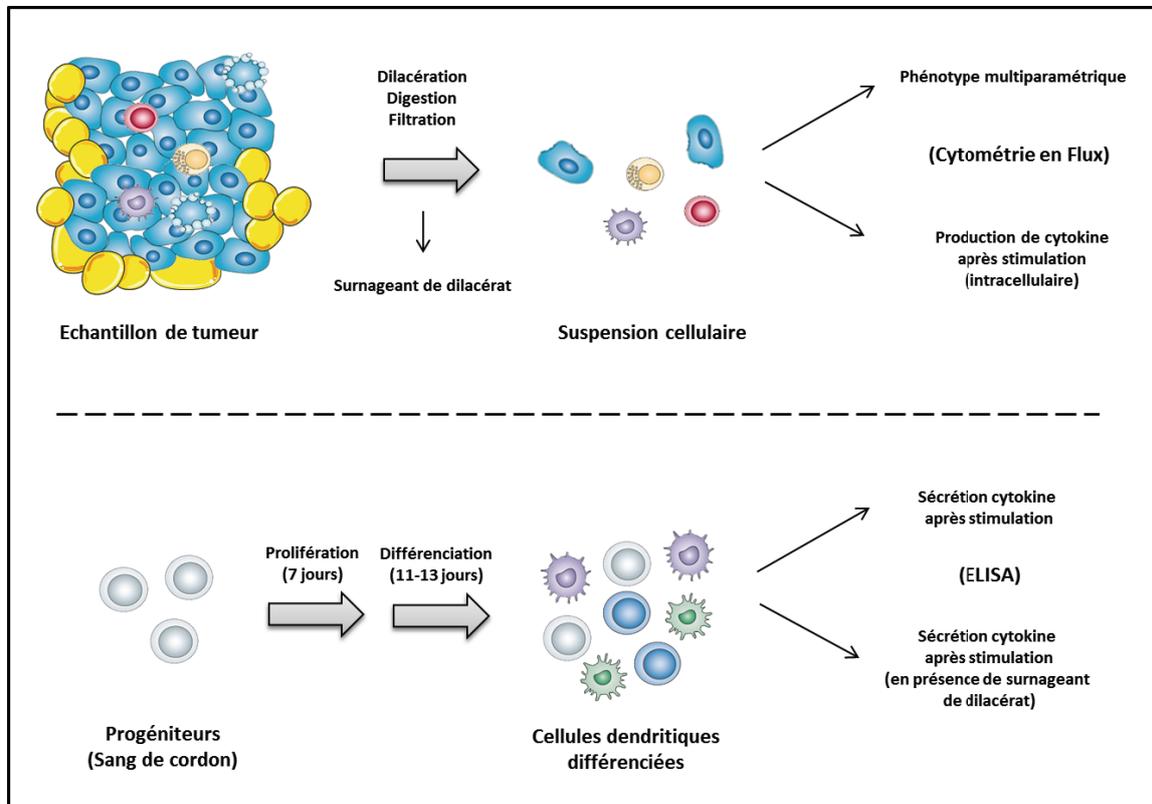
Chez la souris, les DC CD8 α^+ jouent un rôle majeur dans l'immunité anti-tumorale en initiant une réponse T cytotoxique spécifique de l'Ag via le processus de présentation croisée. Des travaux parus peu de temps avant le début de ma thèse, basés sur l'analyse du transcriptome des DC humaines et murines, révélèrent de fortes homologues entre les DC BDCA3^{high} et les DC CD8 α^+ . Ces DC conservent spécifiquement l'expression de marqueurs tels que XCR1 et Clec9A et sont également très douées pour la présentation croisée d'Ag. Au contraire des pDC, la présence des DC BDCA3^{high} et leur impact pronostic n'avait jamais été étudié jusqu'à très récemment et la publication d'un papier évoquant la présence de DC exprimant fortement le récepteur BDCA3 dans les mélanomes. L'analyse phénotypique de ces DC est cependant réduite et ne s'appuie pas sur l'expression de Clec9A ou de XCR1 pour valider leur identité. Malgré tout, en s'appuyant sur l'analyse du TCGA, les auteurs montrent qu'un enrichissement en gènes caractéristiques des DC BDCA3^{high} vis-à-vis des autres gènes du lignage myéloïde et un facteur de bon pronostic.

Dans ce contexte, il nous a paru opportun d'approfondir la caractérisation des DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs, d'évaluer leur réponse fonctionnelle après stimulation et d'étudier plus précisément leur impact sur le pronostic clinique de patientes atteintes de cancer de sein.

Matériels et outils

Notre collaboration avec le service d'anatomopathologie du Centre Léon Bérard nous a permis d'accéder à des échantillons de tumeurs de sein et à des prélèvements de sang de patientes. Afin d'évaluer l'infiltration des tumeurs par les DC BDCA3^{high}, nous avons dilacéré mécaniquement puis digéré les tumeurs afin d'obtenir une suspension cellulaire contenant un mélange de cellules tumorales et de cellules immunitaires. Cette suspension a ensuite été marquée à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes pour caractériser le pourcentage de DC parmi les cellules immunitaires et évaluer leur réponse fonctionnelle après stimulation par R848 et polyI:C. En parallèle, en raison de leur rareté

in vivo, nous avons utilisé un modèle permettant la différenciation des DC BDCA3^{high} *in vitro* afin de quantifier par ELISA leur production de cytokines après stimulation, en présence ou en absence de surnageant de dilacérât de tumeurs. Ces protocoles sont schématisés ci-dessous.



Résumé des résultats

Nous avons ainsi pu démontrer la présence de DC BDCA3^{high}, exprimant XCR1, dans les tumeurs de sein. L'infiltration est variable d'une tumeur à une autre, mais les DC BDCA3^{high} sont présentes dans la grande majorité des tumeurs collectées. Ces dernières produisent moins de TNF α que les DC BDCA3^{high} du sang. La même observation est également vérifiée pour les DC BDCA1⁺ et les pDC. Par ailleurs, les DC BDCA3^{high} produisent moins d'IFN- λ en réponse à des ligands de TLR lorsqu'elles proviennent de tumeurs. Cependant, elles en produisent encore au contraire des pDC associées aux tumeurs qui sont incapables de produire de l'IFN- α ou de l'IFN- λ après stimulation. Enfin, notre modèle *in vitro* nous a permis de suggérer la présence de facteurs solubles inhibiteurs de la sécrétion d'IFN- λ dans le surnageant de tumeurs.

Ces résultats ne sont toujours pas soumis en raisons d'éléments clés n'ayant toujours pas été évalués. Il serait en effet intéressant d'étudier l'effet des surnageants de tumeurs sur la présentation croisée d'Ag par les DC BDCA3^{high} et d'identifier les facteurs solubles impliqués dans l'inhibition de leur sécrétion d'IFN- λ . Par ailleurs, des difficultés techniques nous ont ralenti dans l'identification des DC BDCA3^{high} sur coupes de tumeurs. Celle-ci nous permettrait à la fois de valider nos résultats obtenus par

cytométrie en flux et de définir leur localisation intra ou péri-tumorale. Enfin, nous avons mis au point une méthode permettant de trier les différentes populations de DC infiltrant les tumeurs. Nous envisageons ainsi à plus long terme de comparer le transcriptome des DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs à celles du sang par RNA Sequencing, afin de valider leur identité et d'identifier des voies de signalisation altérées dans les tumeurs.

Ces travaux seront toutefois présentés sous forme d'article, malgré des résultats encore en cours d'élaboration.

Human Breast Cancers Are Infiltrated By BDCA3^{high} Dendritic Cells Functionally Altered By Tumor Microenvironment

Vincent OLLION^{1,2,3,4,5,6}, Margaux HUBERT^{1,2,3,4,5}, Anne-Claire DOFFIN^{1,2,3,4,5}, Isabelle DURAND^{1,2,3,4,5}, Estelle VERRONESE^{1,2,3,4,5}, Franceline GUILLOT^{1,2,3,4,5}, Christophe CAUX^{1,2,3,4,5,6}, Jenny VALLADEAU-GUILEMOND^{1,2,3,4,5,6}

¹ Inserm UMR-S1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

² CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

³ UNIV UMR1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

⁴ Université de Lyon, Lyon, France

⁵ Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁶ LabEx DEVweCAN, Lyon, France

Abstract

Dendritic cells (DC) are key cellular players in the induction of antigen-specific anti-tumoral immunity. BDCA3^{high} DC are homologous to mouse CD8α⁺ DC and specialized for Ag cross-presentation. Interestingly, they are also the main producers of interferon-λ (IFN-λ), a recently discovered cytokine with antiviral, anti-proliferative and anti-tumoral properties. In this study, we first demonstrated by multiparametric flow cytometry that BDCA3^{high} DC are present in breast tumors. Secondly, we observed that IFN-λ synthesis upon TLR3 activation is reduced compared to their blood counterparts. Finally, using *in vitro* BDCA3^{high} DC generated from CD34⁺ cord blood progenitors, we revealed that tumor derived soluble factors are able to inhibit IFN-λ and TNFα production. This study shows for the first time infiltration of solid tumors by this DC subset and highlights a functional DC alteration which has to be taken into account in the design of new anti-tumoral immunotherapeutic strategies.

Introduction

Cancers are complex structures composed by a mix of transformed, stromal and immune cells. The latter have been reported in numerous human solid tumors as a potent predictor of clinical outcome (Fridman et al., 2012). Especially, high density of infiltrating T-helper1 (Th1) or cytotoxic T cells is associated with a better clinical outcome (Galon et al., 2006; Goc et al., 2014). In addition to T cells, dendritic cells (DCs) represent another major component of the immune infiltrate. DCs are professional antigen presenting cells subdivided in subpopulations particularly efficient in priming naive T cells (Banchereau and Steinman, 1998). The presence of mature infiltrating DCs is generally considered as a good prognosis factor (Dieu-Nosjean et al., 2008; Iwamoto et al., 2003; Kobayashi et al., 2007; Ladanyi et al., 2007; Movassagh et al., 2004). Unfortunately, advanced cancers often develop mechanisms subverting the immune system and in particular DCs. Interferon- α (IFN- α) production by plasmacytoid DCs (pDCs) is for instance altered by TGF- β and TNF α in breast and ovarian tumors (Sisirak et al., 2013).

Besides pDC, two myeloid DC (mDC) subsets have been described in human blood and lymphoid organs: BDCA1⁺ (CD1c⁺) and BDCA3⁺ (CD141^{high}) DCs (Dzionek et al., 2000). Following transcriptomic and functional analysis, BDCA3^{high} DCs are nowadays considered as homologous to mice CD8 α ⁺ DCs and CD103⁺ DCs (Lauterbach et al., 2010; Poulin et al., 2010; Robbins et al., 2008). In particular, they share expression of surface receptors such as the chemokine receptor XCR1 and the C-type lectin Clec9A, allowing them to efficiently cross-present Ag from dying tumor cells (Croizat et al., 2010; Jongbloed et al., 2010; Sancho et al., 2009). Moreover, in presence of virus or TLR3 activators, BDCA3^{high} DCs are potent producers of IFN- λ , a cytokine described in mice to inhibit tumor growth (Lauterbach et al., 2010). Altogether, those characteristics make them potential key players in human cancers. However, very few evidence exist concerning their presence in tissues except some data describing BDCA3^{high} DCs expressing XCR1 mRNA in human skin, lung and liver (Haniffa et al., 2012). In tumors, only recently, one paper described a CD103⁺ DC gene signature associated with a good prognosis in human melanoma, head and neck cancers and lung cancers (Broz et al., 2014). Here, we show that a BDCA3^{high} DC subset is present in human breast cancers and that IFN- λ production is altered by soluble factors from tumor microenvironment.

Results

A rare CD141^{high} DC subset is found in primary breast tumors

Using a multiparametric flow cytometry analysis, we evaluated the presence of pDCs (CD11c⁻ BDCA2⁺), BDCA1⁺ DCs (CD11c⁺ CD1c⁺) and BDCA3^{high} DCs (CD11c⁺ CD141^{high}) both in patients' blood and breast tumors (Fig. 1A). BDCA3^{high} DCs were present in most tumors, independently of their histologic classification, their SBR (Scarff-Bloom-Richardson) grade and their hormone receptor or Her2 expression (Fig. S1A; Fig. S1B). However, tumor-associated (TA) BDCA3^{high} DCs remained the scarcest subset (median = 0,15% of CD45⁺ cells) as in healthy donors and patients' blood (median = 0,01-0,05%) (Fig. 1B). We also assessed Clec9A and XCR1 surface expression on those cells. Indeed, they are known to be more specific markers than BDCA3. Moreover we monitored SIRP α and CD11b that we knew to be differentially expressed by blood BDCA1⁺ and BDCA3^{high} DCs. We observed a specific expression of XCR1 by a small subset of TA-BDCA3^{high} DCs whereas SIRP α and CD11b were expressed only by TA-BDCA1⁺ DCs and/or TA-pDCs (Fig. 1C). However, we did not observed Clec9A expression on BDCA3^{high} DCs in tumors. Comparing dilacerated and digested tonsils, we observed a loss of Clec9A after digestion suggesting that the absence of Clec9A expression in tumors may be due to its degradation by the enzymatic digestion necessary in tumors (Fig. S2). Altogether, those results demonstrate the presence of a BDCA3^{high} DC subset in primary breast tumors that have phenotypic similarities with circulating BDCA3^{high} DCs.

Tumor-associated DCs produce less IFN- λ and TNF α than circulating DCs after TLR3 and TLR8 stimulation

Defects in cytokine secretion and T cell priming were previously observed for TA-DCs in numerous tumors. Thus we wondered whether breast TA-BDCA3^{high} DCs were altered for cytokine production compared to blood BDCA3^{high} DCs. Due to their small number and because a high variability exists in cytokine response to stimulation, we chose to evaluate the percentage of cytokine producing cells after stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or cell suspension from digested tumors *ex vivo*. Previous works studied cytokine production by circulating DCs after TLR4 stimulation with LPS in patients (Caras et al., 2004; Della et al., 2003) and our team also assessed cytokine production by circulating immune cells after TLR7/8 stimulation with R848 during breast cancer progression (Personal Communication). Here we chose to stimulate cells with R848 to activate all DC subsets simultaneously and a TLR3 ligand (PolyI:C) to induce IFN- λ production by BDCA3^{high} DCs. Compared to DCs coming from healthy donors, patient's circulating DCs produced smaller level of IFN- λ and TNF α (Fig. 2A, B, C). In contrast, all TA-DC subsets were producing less TNF- α than their blood counterparts after stimulation (Fig. 2A). We also confirmed previous observations made by our group (Sisirak et al., 2013) that were describing an impairment of IFN- α production by TA-pDC (Fig. 2B). Finally, we evaluated IFN- λ production by DCs because of its potential

anti-tumoral properties. As previously shown, both blood pDCs and BDCA3^{high} DCs but not BDCA1⁺ DCs were producing IFN- λ in response to PolyI:C and R848 (Fig. 2C), nonetheless, CD141^{high} DC were better responders than pDC. Moreover, as observed for TNF- α and IFN- α , IFN- λ production was lower for TA-DCs compared to blood DCs. In particular, no TA-pDCs produced IFN- λ after TLR stimulation in contrast to TA-BDCA3^{high} DCs which responded partially to this stimulation. Here, we showed that TA-DCs were impaired for cytokine production and that TA-BDCA3^{high} DCs from primary breast tumors were still producing small amount of IFN- λ whereas pDCs were totally impaired for IFN α and IFN- λ production.

IFN- λ production by BDCA3^{high} DCs is altered by tumor microenvironment soluble factors

To determine whether tumor microenvironment would alter BDCA3^{high} DCs responsiveness, we used an *in vitro* differentiation protocol, which allows the differentiation of cord blood progenitors into blood BDCA3^{high} DCs equivalent (Balan et al., 2014; Poulin et al., 2010). Those CD34-derived DCs were activated and exposed to supernatants of dilacerated primary breast tumors, to mimic inhibitory effects of the tumor microenvironment. All tumor supernatants impaired IFN- λ 1, IFN- λ 2 and TNF α secretion with variable percentage of inhibition (Fig. 3A; Fig. 3B). Luminex are now in progress to determine which soluble factors may be implicated.

Discussion

In this paper, we report the presence of a BDCA3^{high} DC subset in breast primary tumors that can be distinguished from BDCA1⁺ DCs mainly because they are DCs (HLA-DR⁺ CD11c⁺) which do not express SIRP α and CD11b. XCR1 is only expressed in a small subset of BDCA3^{high} DCs. The dichotomous expression of XCR1 among BDCA3^{high} DCs in tumors may be explained by the presence of two distinctive DC subsets or by a downregulation of this receptor with its ligands. This second hypothesis was not tested yet for XCR1 but was previously observed for other receptors such as ICOS-L (Faget et al., 2012). TA-BDCA3^{high} DCs were also slightly or not expressing Clec9A. We observed that the digestion step could be in part responsible for the absence of Clec9A expression but we cannot exclude a lower protein expression level in tumors despite a high transcriptomic expression as it was previously described in skin and lung (Haniffa et al., 2012). In that case, the efficiency of Clec9A targeting based therapy developed in mice could be inefficient for human tumors (Caminschi et al., 2008; Picco et al., 2014; Sancho et al., 2008). As many lectins, Clec9A is also downregulated with DC maturation and this mainly explains its lower expression in tumors (Sallusto et al., 1995; Schreiber et al., 2012).

We assessed cytokine production by DCs, from patient's blood and breast tumors, in response to a combination of TLR3 and TLR8 ligands. DCs from blood patients were not altered compared to DCs from healthy donors suggesting that in contrast to some systemic modifications observed for monocytes, for example in renal cell carcinoma (Chittezhath et al., 2014), DCs are not altered in periphery. However, transcriptomic dysregulations of monocytes were observed in advanced renal cell carcinoma. In the same manner, reduction of DC number was previously observed in advanced breast cancer (Pinzon-Charry et al., 2007). Thus, the absence of blood DC alterations could probably be explained by our choice to mainly select non metastatic primary breast tumors. In contrast, all DC subsets were producing less TFN α , IFN- α or IFN- λ when they were isolated from tumors. Interestingly, blood and TA-BDCA3^{high} DCs were producing more IFN- λ than pDCs. This is in accordance with previously results showing that blood BDCA3^{high} DCs were better IFN- λ producers than pDCs in response to PolyI:C or HCV (Hepatitis C Virus) (Yoshio et al., 2013). But here, we showed for the first time that BDCA3^{high} DCs are the only IFN- λ producing DCs in primary breast tumors. The absence of IFN- λ production by TA-pDCs can be due to similar inhibitory factors as those observed for IFN- α inhibition because molecular pathways regulating those two cytokines are very similar (Osterlund et al., 2007; Sisirak et al., 2013). IFN- λ and IFN- α activate the same transduction pathways in target cells but contrary to the IFN- α receptor, IFN- λ receptor is not expressed by all cells. Thus, activation of IFN- λ secretion by BDCA3^{high} DCs in tumor could probably partially, but not totally, replace IFN- α antitumoral effects by recruiting effector cells or reducing tumor cells proliferation. Finally, we determined whether TA-DCs were altered by tumor microenvironment using an *in vitro* model allowing us to test the effects of tumor supernatant on cytokine production. Thanks to this model we observed

an inhibition of IFN- λ and TNF- α production by all tumor supernatants. Previous works highlighted the role of IL-10, TGF- β , VEGF, TNF α or PGE-2 in the inhibition of cytokine secretion by DCs (Bekeredjian-Ding et al., 2009; Hartmann et al., 2003; Michielsen et al., 2011; Mittal and Roche, 2015; Sisirak et al., 2013). Using luminex technology we will now assess the presence of a wide range of cytokines in tumor supernatant with the aim to identify factors involved in the inhibition of DCs IFN- λ production. To confirm our results, neutralizing monoclonal antibodies may be also used to reverse the inhibitory effect of tumor supernatant.

We obtained some evidences of BDCA3^{high} DCs presence in breast tumors. However, their homologies with circulating BDCA3^{high} DCs have to be confirmed by other approaches. In particular, the dichotomous expression of XCR1 questions the homogeneity of the BDCA3^{high} DCs in tumors. Transcriptomic analysis of DCs isolated from tissue is usually done to confirm their singularities (Haniffa et al., 2012; Watchmaker et al., 2014; Marquet et al., 2014). Thus gene expression profile of TA-DCs and blood DCs will be done to validate their homology. Moreover it could potentially reveal other unexpected altered pathways such as those involved in cross-presentation or to explain their recruitment in tumors. We observed for instance that in addition to XCR1, *in vitro*-derived BDCA3^{high} DC express CXCR3 and CXCR4 (data not shown). The expression of those receptors by TA-BDCA3^{high} DCs could be interesting. Indeed, CXCR3 and CXCR4 are known to be involved in DCs recruitment by tumors (Lo et al., 2010; Rajkumar et al., 2010; Vanbervliet et al., 2003; Vermi et al., 2003; Zou et al., 2001). XCL1 and XCL2 are also known to induce BDCA3^{high} DCs migration and thus XCR1 could potentially be involved in their recruitment (Crozat et al., 2010). Those two chemokines were detected in ovarian cancers but were not observed yet in breast tumors (Kim et al., 2012).

Various studies revealed the importance of TA-DCs localization and maturation for patient's prognosis (Iwamoto et al., 2003; Kobayashi et al., 2007; Ladanyi et al., 2007; Movassagh et al., 2004). Recent studies also described the presence of tertiary lymphoid structures (TLS) in various cancers, enriched in lymphocytes and mature DCs, that correlate with a better patient survival and Th1 responses (Goc et al., 2014). On the contrary, presence of mature DCs outside of those structures was associated with a bad survival in renal cancer (Giraldo et al., 2015). Thus, staining on tumor sections to define the precise localization and maturation of BDCA3^{high} DCs in primary breast tumors will be necessary. We also have to use additional markers such as DC-LAMP, CD80 or CD86 to establish their maturation state as well as T and B cells specific markers to determine the concomitant presence of TLS in tumor sections. Moreover, it would be interesting to screen T cells, NK cells, macrophages colocalization as they could collaborate and impact differentially the prognosis (Bindea et al., 2014; Deauvieau et al., 2015; Yamazaki et al., 2010). Indeed infiltration with BDCA3^{high} DCs may be not predictive if the tumor is also highly infiltrated by regulatory T cells for example. Combining those results with retrospective clinical data should allow us to determine whether the presence, the

maturation or the localization of TA-BDCA3^{high} DCs impact patient's survival. Those results should strengthen, but could also contradict, previous data obtained by TCGA analysis showing an association between the presence of those cells compared to other myeloid cells and a good prognosis in human melanoma, head and neck cancers and lung cancers (Broz et al., 2014).

In summary, our results demonstrated the presence of BDCA3^{high} DCs in primary breast tumors impaired for cytokine production compared with blood DCs. In particular, IFN- λ appeared to be inhibited by soluble factors present in the tumor microenvironment. The impact of this alteration on patient's survival needs further investigation to improve our understanding of molecular mechanisms involved in tumor progression. Nevertheless, TA-BDCA3^{high} DCs are still able to produce some cytokines in response to TLR ligands. This indicates that reactivation of this DC subset by appropriate therapeutic strategies needs to be evaluated.

Materials & Methods

Patients, human tissue samples and blood

Fresh tumor and blood samples (collected on CTAD anticoagulant) from patients diagnosed with primary breast carcinoma were obtained before any treatment from the Centre Léon Bérard (CLB) tissue bank after patient informed consent. The study was reviewed and approved by the Institutional Review Board of CLB. Discarded human tonsil material was obtained anonymously according to the institutional regulations in compliance with French law. Healthy human blood was obtained anonymously from the Établissement Français du Sang (Lyon, France). Written informed consent was obtained from all study participants in accordance with the Declaration of Helsinki.

Preparation of single cell suspensions and peripheral blood mononuclear cells

Tonsils or sections of the resected tumor area selected by the pathologist were placed in RPMI 1640 medium with 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen). After mechanical dilacerations, tissues were digested for 45 min at 37°C in RPMI 1640 medium (Life Technologies) with antibiotics, 1 mg/ml collagenase IA and 20 µg/ml DNase I (Sigma Aldrich). Then, digested samples were filtered on 70µm cell strainer and resuspended in medium supplemented with 10% FCS (cRPMI) for further analyses. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from blood samples using lymphocytes separation medium (Eurobio).

Flow cytometry and cell staining

All flow cytometry acquisitions were done using LSRFortessa Cell Analyzer (BD Biosciences) and analyses were conducted on FlowJo 9 Software. See supplementary Table S1 for antibody list. Dying cells were excluded by DAPI or Live and Dead Yellow staining (Life Technologies).

***In vitro* culture assays**

Cord blood progenitors were differentiated into DC as previously reported (Poulin et al., 2010). Cord blood CD34⁺ cells were cultured at 5 x 10⁴ cells/ml for 7 days in StemSpan serum free medium (StemCell Technologies) with penicillin, streptomycin, 100 ng/ml SCF, 20 ng/ml IL-6 (R&D Systems), 100 ng/ml Flt3L and 20 ng/ml IL-3 (Peprotech). Expanded cells were then plated at 6.25 x 10⁴ cells/ml in RPMI 1640 medium with penicillin, streptomycin, 10% heat-inactivated fetal calf serum (Eurobio), 20 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4 (from Schering Plough), 20 ng/ml SCF and 100ng/ml Flt3L. Cytokines were replenished after 6 days and cultures were harvested after 11-13 days.

***Ex vivo* and *in vitro* DCs stimulation**

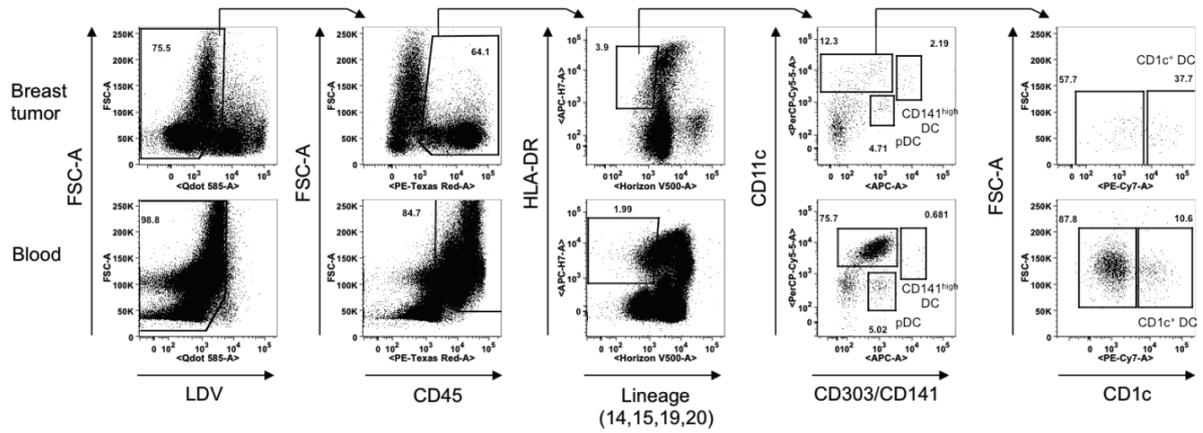
Tumor digested samples and PBMC were cultured at 1 X 10⁶ cells/ml for 5h in cRPMI with 5µg/ml R848 (Invivogen) and 30µl/ml PolyI:C (Invivogen). GolgiPlug (BD Biosciences) was added after 1h. At the end of the activation, harvested cells were stained, fixated in PBS

2% formaldehyde, permeabilized in PBS 3% SVF 0,5% saponine and intracellular stained with antibodies directed against each cytokines.

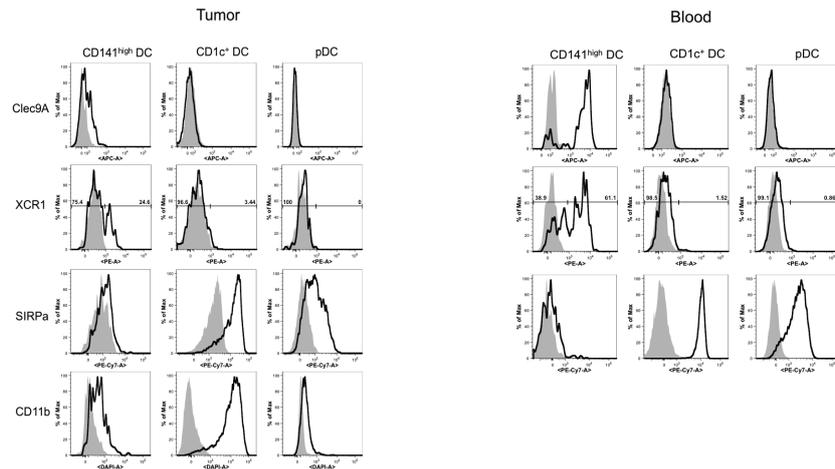
In vitro CD34-derived DC were cultured at 2×10^5 cells/ml for 48h, in 96 well round bottom plates, in cRPMI with 10µg/ml PolyI:C alone or with 5µg/ml R848 and 10µg/ml PolyI:C and completed with 25% tumor supernatant. Cytokines (IL-29, IL-28A, TNFα) secretions were quantified in supernatant culture medium by specific ELISA according to manufacturers' instructions (R&D Systems).

Figures

A



B



C

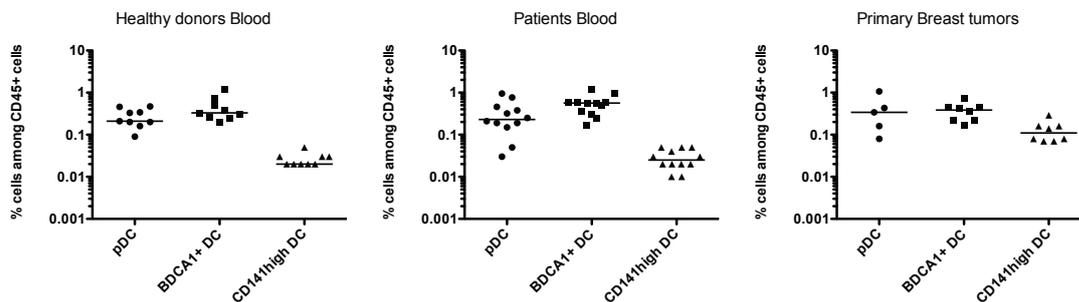


Figure 1: BDCA3^{high} DCs are present in primary breast tumors. A) Gating strategy used to identify BDCA3^{high} DCs (CD141^{high}) and BDCA1⁺ (CD1c⁺) DCs in breast tumor and healthy donor or patients' blood. B) Clec9A, XCR1, SIRP α and CD11b surface expression (black thick lines) and corresponding isotype controls (grey full histograms) of TA-DC or circulating DC, representative of 3-5 experiments. C) Percentage of pDCs, BDCA1⁺ DCs and BDCA3^{high} DCs among hematopoietic cells (CD45⁺) in healthy donor (HD) blood, patients' blood and primary breast tumors. Each point represents one donor.

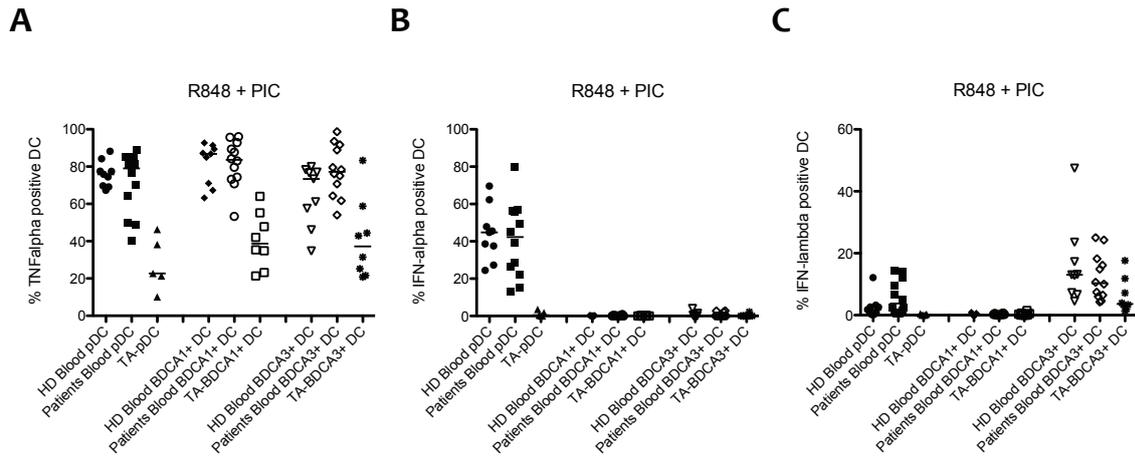


Figure 2: Cytokine production of circulating and tumor-associated (TA) DCs after ex vivo activation. Percentage of TNF α (A), IFN α (B) or IFN- λ (C) positive pDCs, BDCA1⁺ DCs and BDCA3^{high} DCs were evaluated following 5 hours of R848 + PolyI:C stimulation. Each point represents one donor.

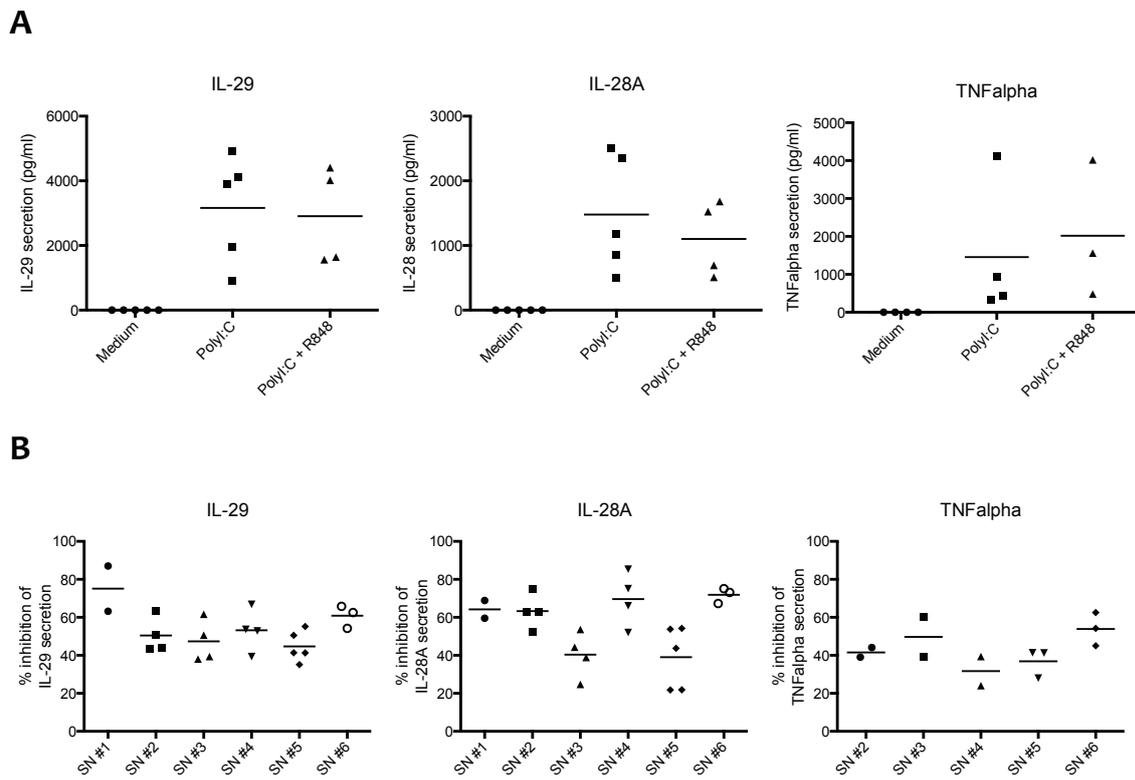


Figure 3: IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A) and TNF α secretion by cord blood derived DC are inhibited by all tumor supernatants tested. A) IFN- λ 1, IFN- λ 2 and TNF α secretions were assessed by ELISA. B) Percentage of cytokine secretion inhibition after PolyI:C stimulation with 6 different tumor supernatants (SN). Each point represents independent experiments with different cord blood donors.

Supplementary figures

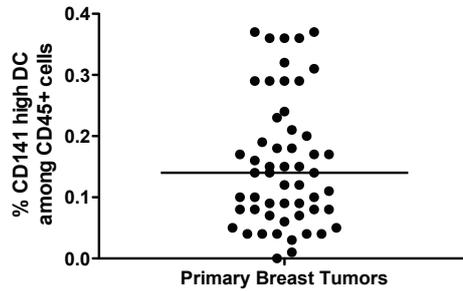


Figure S1A: Percentage of BDCA₃^{high} DCs among hematopoietic (CD45⁺) cells in all primary breast tumors collected.

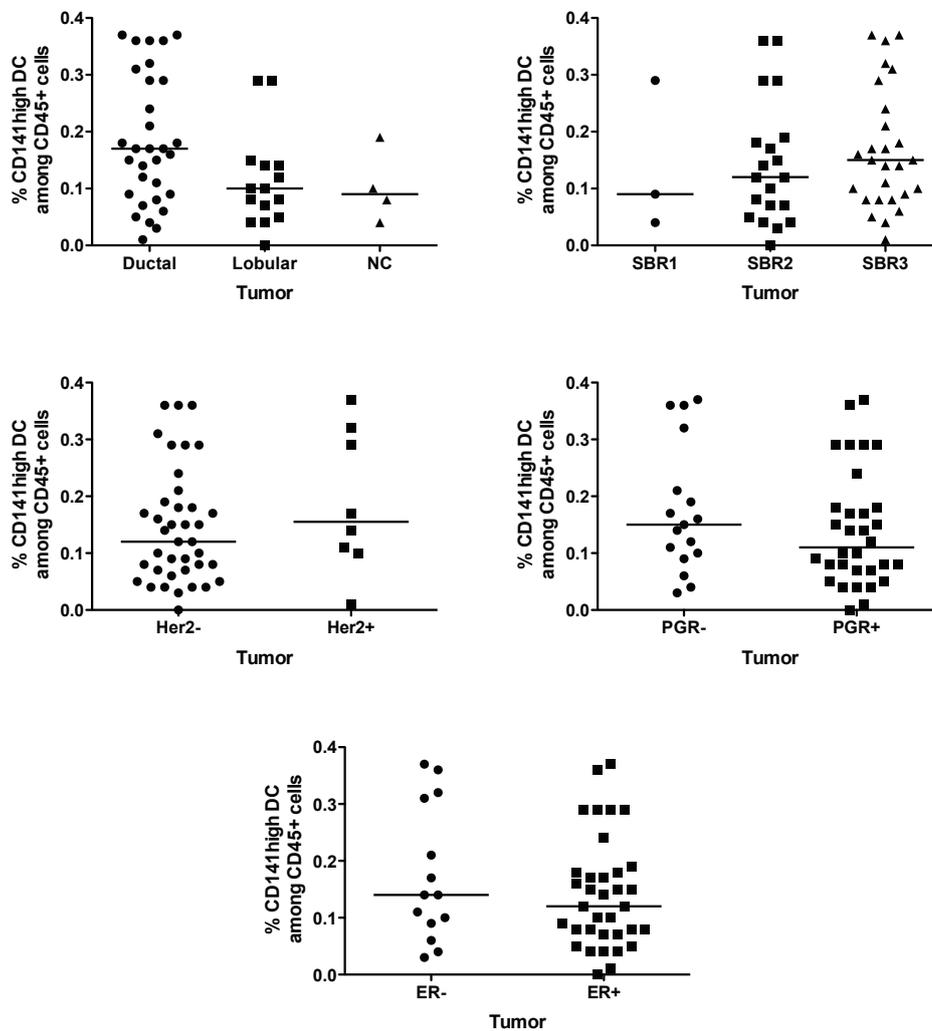


Figure S1B: Percentage of BDCA₃^{high} DCs among hematopoietic cells depending on their histological (Ductal, Lobular or Not Classified) classification, their SBR grade (SBR1, SBR2, SBR3), and their Her2 or hormone receptor expression (Progesterone Receptor: PGR; Estrogen Receptor: ER)

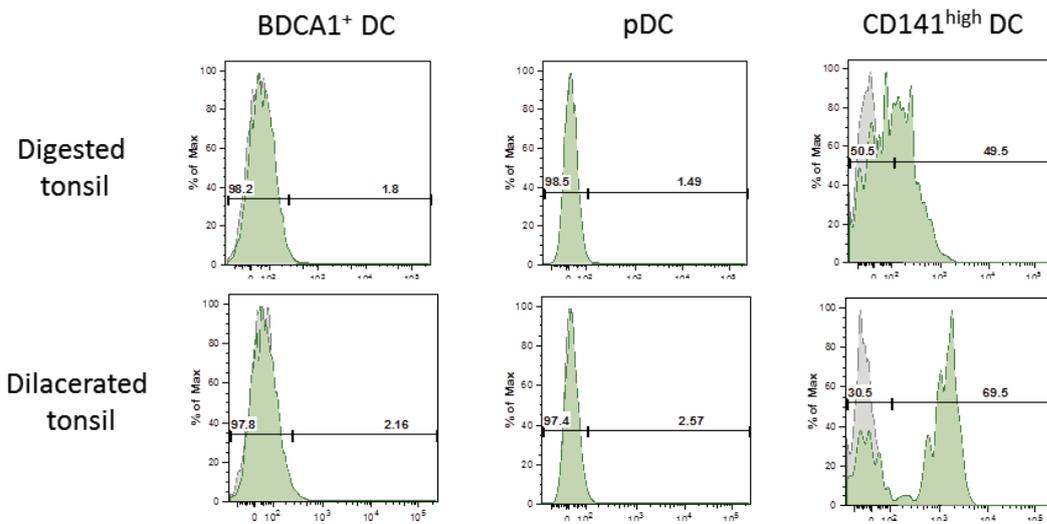


Figure S2: Clec9A expression on BDCA1⁺ DCs, pDCs or BDCA3^{high} DCs extracted from tonsil with mechanical dilaceration following (bottom) or not (top) by a digestion step.

Antigen	Fluochrome	Clone	Suppliers
CD3	Horizon V500	UCHT1	BD Biosciences
CD14	Horizon V500	MSE2	BD Biosciences
CD15	Horizon V500	HI98	BD Biosciences
CD19	Horizon V500	HIB19	BD Biosciences
CD11b	FITC	M1	Miltenyi
CD11b	Brilliant Violet 421	ICRF44	Biolegend
CD11c	PerCPCy5.5	Bu15	Biolegend
CD45	PE-Texas Red	J.33	Beckman Coulter
HLA-DR	APC-H7	G46-6	BD Biosciences
BDCA1/CD1c	PE-Cy7	L161	Biolegend
BDCA2	APC	AC144	Miltenyi
BDCA3/CD141	APC	AD5	Miltenyi
IFN-alpha	FITC	LT27:295	Miltenyi
IFN-lambda	Conjugated with CF568	247801	R&D
TNF-alpha	Alexa Fluor 700	Mab11	BD Biosciences
Clec9A	APC	8F9	Miltenyi
SIRPalpha	PE-Cy7	SE5A5	Biolegend
XCR1	Strep-Tactin PE		In collaboration with Richard A. KroczeK

Table S1: Antibodies and other reagents used for flow cytometry stainings

References

- Balan,S., Ollion,V., Colletti,N., Chelbi,R., Montanana-Sanchis,F., Liu,H., Vu Manh,T.P., Sanchez,C., Savoret,J., Perrot,I., Doffin,A.C., Fossum,E., Bechlian,D., Chabannon,C., Bogen,B., Asselin-Paturel,C., Shaw,M., Soos,T., Caux,C., Valladeau-Guilemond,J., and Dalod,M. (2014). Human XCR1+ dendritic cells derived in vitro from CD34+ progenitors closely resemble blood dendritic cells, including their adjuvant responsiveness, contrary to monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* *193*, 1622-1635.
- Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.
- Bekeredjian-Ding,I., Schafer,M., Hartmann,E., Pries,R., Parcina,M., Schneider,P., Giese,T., Endres,S., Wollenberg,B., and Hartmann,G. (2009). Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* *128*, 439-450.
- Bindea,G., Mlecnik,B., Angell,H.K., and Galon,J. (2014). The immune landscape of human tumors: Implications for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* *3*, e27456.
- Blazek,K., Eames,H.L., Weiss,M., Byrne,A.J., Perocheau,D., Pease,J.E., Doyle,S., McCann,F., Williams,R.O., and Udalova,I.A. (2015). IFN-lambda resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1beta production. *J. Exp. Med.* *212*, 845-853.
- Broz,M.L., Binnewies,M., Boldajipour,B., Nelson,A.E., Pollack,J.L., Erle,D.J., Barczak,A., Rosenblum,M.D., Daud,A., Barber,D.L., Amigorena,S., Van't Veer,L.J., Sperling,A.I., Wolf,D.M., and Krummel,M.F. (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell* *26*, 638-652.
- Caminschi,I., Proietto,A.I., Ahmet,F., Kitsoulis,S., Shin,T.J., Lo,J.C., Rizzitelli,A., Wu,L., Vremec,D., van Dommelen,S.L., Campbell,I.K., Maraskovsky,E., Braley,H., Davey,G.M., Mottram,P., van,d., V, Jensen,K., Lew,A.M., Wright,M.D., Heath,W.R., Shortman,K., and Lahoud,M.H. (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* *112*, 3264-3273.
- Caras,I., Grigorescu,A., Stavaru,C., Radu,D.L., Mogos,I., Szegli,G., and Salageanu,A. (2004). Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* *53*, 1146-1152.
- Chittezhath,M., Dhillon,M.K., Lim,J.Y., Laoui,D., Shalova,I.N., Teo,Y.L., Chen,J., Kamaraj,R., Raman,L., Lum,J., Thamboo,T.P., Chiong,E., Zolezzi,F., Yang,H., Van Ginderachter,J.A., Poidinger,M., Wong,A.S., and Biswas,S.K. (2014). Molecular profiling reveals a tumor-promoting phenotype of monocytes and macrophages in human cancer progression. *Immunity.* *41*, 815-829.
- Crozat,K., Guiton,R., Contreras,V., Feuillet,V., Dutertre,C.A., Ventre,E., Vu Manh,T.P., Baranek,T., Storset,A.K., Marvel,J., Boudinot,P., Hosmalin,A., Schwartz-Cornil,I., and Dalod,M. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1283-1292.
- Deauvieau,F., Ollion,V., Doffin,A.C., Achard,C., Fonteneau,J.F., Verronese,E., Durand,I., Ghittoni,R., Marvel,J., Dezutter-Dambuyant,C., Walzer,T., Vie,H., Perrot,I., Goutagny,N., Caux,C., and Valladeau-Guilemond,J. (2015). Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells. *Int. J. Cancer* *136*, 1085-1094.

Della,B.S., Gennaro,M., Vaccari,M., Ferraris,C., Nicola,S., Riva,A., Clerici,M., Greco,M., and Villa,M.L. (2003). Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* 89, 1463-1472.

Dickensheets,H., Sheikh,F., Park,O., Gao,B., and Donnelly,R.P. (2013). Interferon-lambda (IFN-lambda) induces signal transduction and gene expression in human hepatocytes, but not in lymphocytes or monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 93, 377-385.

Dieu-Nosjean,M.C., Antoine,M., Danel,C., Heudes,D., Wislez,M., Poulot,V., Rabbe,N., Laurans,L., Tartour,E., de,C.L., Lebecque,S., Fridman,W.H., and Cadranel,J. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol.* 26, 4410-4417.

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

Faget,J., Bendriss-Vermare,N., Gobert,M., Durand,I., Olive,D., Biota,C., Bachelot,T., Treilleux,I., Goddard-Leon,S., Lavergne,E., Chabaud,S., Blay,J.Y., Caux,C., and Menetrier-Caux,C. (2012). ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells. *Cancer Res.* 72, 6130-6141.

Fridman,W.H., Pages,F., Sautes-Fridman,C., and Galon,J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298-306.

Galon,J., Costes,A., Sanchez-Cabo,F., Kirilovsky,A., Mlecnik,B., Lagorce-Pages,C., Tosolini,M., Camus,M., Berger,A., Wind,P., Zinzindohoue,F., Bruneval,P., Cugnenc,P.H., Trajanoski,Z., Fridman,W.H., and Pages,F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.

Giraldo,N.A., Becht,E., Pages,F., Skliris,G., Verkarre,V., Vano,Y., Mejean,A., Saint-Aubert,N., Lacroix,L., Natario,I., Lupo,A., Alifano,M., Damotte,D., Cazes,A., Triebel,F., Freeman,G.J., Dieu-Nosjean,M.C., Oudard,S., Fridman,W.H., and Sautes-Fridman,C. (2015). Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin. Cancer Res.* 21, 3031-3040.

Goc,J., Germain,C., Vo-Bourgais,T.K., Lupo,A., Klein,C., Knockaert,S., de,C.L., Ouakrim,H., Becht,E., Alifano,M., Validire,P., Remark,R., Hammond,S.A., Cremer,I., Damotte,D., Fridman,W.H., Sautes-Fridman,C., and Dieu-Nosjean,M.C. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* 74, 705-715.

Haniffa,M., Shin,A., Bigley,V., McGovern,N., Teo,P., See,P., Wasan,P.S., Wang,X.N., Malinarich,F., Malleret,B., Larbi,A., Tan,P., Zhao,H., Poidinger,M., Pagan,S., Cookson,S., Dickinson,R., Dimmick,I., Jarrett,R.F., Renia,L., Tam,J., Song,C., Connolly,J., Chan,J.K., Gehring,A., Bertoletti,A., Collin,M., and Ginhoux,F. (2012). Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity.* 37, 60-73.

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

Iwamoto,M., Shinohara,H., Miyamoto,A., Okuzawa,M., Mabuchi,H., Nohara,T., Gon,G., Toyoda,M., and Tanigawa,N. (2003). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int. J. Cancer* *104*, 92-97.

Jongbloed,S.L., Kassianos,A.J., McDonald,K.J., Clark,G.J., Ju,X., Angel,C.E., Chen,C.J., Dunbar,P.R., Wadley,R.B., Jeet,V., Vulink,A.J., Hart,D.N., and Radford,K.J. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* *207*, 1247-1260.

Kim,M., Rooper,L., Xie,J., Rayahin,J., Burdette,J.E., Kajdacsy-Balla,A.A., and Barbolina,M.V. (2012). The lymphotactin receptor is expressed in epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell migration and proliferation. *Mol. Cancer Res.* *10*, 1419-1429.

Kobayashi,M., Suzuki,K., Yashi,M., Yuzawa,M., Takayashiki,N., and Morita,T. (2007). Tumor infiltrating dendritic cells predict treatment response to immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* *27*, 1137-1141.

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

Lasfar,A., Abushahba,W., Balan,M., and Cohen-Solal,K.A. (2011). Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy. *Clin. Dev. Immunol.* *2011*, 349575.

Lauterbach,H., Bathke,B., Gilles,S., Traidl-Hoffmann,C., Lubber,C.A., Fejer,G., Freudenberg,M.A., Davey,G.M., Vremec,D., Kallies,A., Wu,L., Shortman,K., Chaplin,P., Suter,M., O'Keeffe,M., and Hochrein,H. (2010). Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *J. Exp. Med.* *207*, 2703-2717.

Lo,B.K., Yu,M., Zloty,D., Cowan,B., Shapiro,J., and McElwee,K.J. (2010). CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. *Am. J. Pathol.* *176*, 2435-2446.

Marquet,F., Vu Manh,T.P., Maisonnasse,P., Elhrouzi-Younes,J., Urien,C., Bouguyon,E., Jouneau,L., Bourge,M., Simon,G., Ezquerro,A., Lecardonnel,J., Bonneau,M., Dalod,M., Schwartz-Cornil,I., and Bertho,N. (2014). Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. *J. Immunol.* *193*, 5883-5893.

Michielsen,A.J., Hogan,A.E., Marry,J., Tosetto,M., Cox,F., Hyland,J.M., Sheahan,K.D., O'Donoghue,D.P., Mulcahy,H.E., Ryan,E.J., and O'Sullivan,J.N. (2011). Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PLoS. One.* *6*, e27944.

Mittal,S.K. and Roche,P.A. (2015). Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr. Opin. Immunol.* *34C*, 22-27.

Movassagh,M., Spatz,A., Davoust,J., Lebecque,S., Romero,P., Pittet,M., Rimoldi,D., Lienard,D., Gugerli,O., Ferradini,L., Robert,C., Avril,M.F., Zitvogel,L., and Angevin,E. (2004). Selective accumulation of mature DC-Lamp+ dendritic cells in tumor sites is associated with efficient T-cell-mediated antitumor response and control of metastatic dissemination in melanoma. *Cancer Res.* *64*, 2192-2198.

Osterlund,P.I., Pietila,T.E., Veckman,V., Kottenko,S.V., and Julkunen,I. (2007). IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J. Immunol.* *179*, 3434-3442.

Picco,G., Beatson,R., Taylor-Papadimitriou,J., and Burchell,J.M. (2014). Targeting DNGR-1 (CLEC9A) with antibody/MUC1 peptide conjugates as a vaccine for carcinomas. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1947-1955.

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

Poulin,L.F., Salio,M., Griessinger,E., Anjos-Afonso,F., Craciun,L., Chen,J.L., Keller,A.M., Joffre,O., Zelenay,S., Nye,E., Le,M.A., Faure,F., Donckier,V., Sancho,D., Cerundolo,V., Bonnet,D., and Reis e Sousa (2010). Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1261-1271.

Rajkumar,T., Vijayalakshmi,N., Gopal,G., Sabitha,K., Shirley,S., Raja,U.M., and Ramakrishnan,S.A. (2010). Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis. *Cancer Cell Int.* *10*, 45.

Robbins,S.H., Walzer,T., Dembele,D., Thibault,C., Defays,A., Bessou,G., Xu,H., Vivier,E., Sellars,M., Pierre,P., Sharp,F.R., Chan,S., Kastner,P., and Dalod,M. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* *9*, R17.

Sallusto,F., Cella,M., Danieli,C., and Lanzavecchia,A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* *182*, 389-400.

Sancho,D., Joffre,O.P., Keller,A.M., Rogers,N.C., Martinez,D., Hernanz-Falcon,P., Rosewell,I., and Reis e Sousa (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* *458*, 899-903.

Sancho,D., Mourao-Sa,D., Joffre,O.P., Schulz,O., Rogers,N.C., Pennington,D.J., Carlyle,J.R., and Reis e Sousa (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J. Clin. Invest* *118*, 2098-2110.

Sato,A., Ohtsuki,M., Hata,M., Kobayashi,E., and Murakami,T. (2006). Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J. Immunol.* *176*, 7686-7694.

Schreibelt,G., Klinkenberg,L.J., Cruz,L.J., Tacke,P.J., Tel,J., Kreutz,M., Adema,G.J., Brown,G.D., Figdor,C.G., and de Vries,I.J. (2012). The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* *119*, 2284-2292.

Sisirak,V., Vey,N., Goutagny,N., Renaudineau,S., Malfroy,M., Thys,S., Treilleux,I., Labidi-Galy,S.I., Bachelot,T., Dezutter-Dambuyant,C., Menetrier-Caux,C., Blay,J.Y., Caux,C., and Bendriss-Vermare,N. (2013). Breast cancer-derived transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha compromise interferon-alpha production by tumor-associated plasmacytoid dendritic cells. *Int. J. Cancer* *133*, 771-778.

Vanbervliet,B., Bendriss-Vermare,N., Massacrier,C., Homey,B., de,B.O., Briere,F., Trinchieri,G., and Caux,C. (2003). The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J. Exp. Med.* *198*, 823-830.

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

Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., Hadeiba, H., and Butcher, E.C. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* *15*, 98-108.

Witte, K., Gruetz, G., Volk, H.D., Looman, A.C., Asadullah, K., Sterry, W., Sabat, R., and Wolk, K. (2009). Despite IFN-lambda receptor expression, blood immune cells, but not keratinocytes or melanocytes, have an impaired response to type III interferons: implications for therapeutic applications of these cytokines. *Genes Immun.* *10*, 702-714.

Yamazaki, C., Miyamoto, R., Hoshino, K., Fukuda, Y., Sasaki, I., Saito, M., Ishiguchi, H., Yano, T., Sugiyama, T., Hemmi, H., Tanaka, T., Hamada, E., Hirashima, T., Amakawa, R., Fukuhara, S., Nomura, S., Ito, T., and Kaisho, T. (2010). Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *397*, 756-761.

Yoshio, S., Kanto, T., Kuroda, S., Matsubara, T., Higashitani, K., Kakita, N., Ishida, H., Hiramatsu, N., Nagano, H., Sugiyama, M., Murata, K., Fukuhara, T., Matsuura, Y., Hayashi, N., Mizokami, M., and Takehara, T. (2013). Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus. *Hepatology* *57*, 1705-1715.

Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselin, I., Gordon, A., Pustilnik, T., Curiel, D.T., Galanaud, P., Capron, F., Emilie, D., and Curiel, T.J. (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* *7*, 1339-1346.

L'utilisation des DC BDCA3^{high} obtenues *in vitro* selon le protocole publié par Poulin et son équipe (Poulin et al., 2010) m'a également amené à collaborer avec l'équipe de Marc Dalod (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy). En effet, l'analyse de Poulin permettait de faire ressortir des ressemblances entre les DC BDCA3^{high} issues de progéniteurs et celles du sang mais une analyse plus poussée semblait nécessaire pour confirmer cette homologie. Par ailleurs, ce protocole permettant d'obtenir deux populations de DC, les DC BDCA3^{high} exprimant XCR1 ainsi qu'une autre population BDCA3⁺ mais n'exprimant pas XCR1 il apparut intéressant de déterminer si cette population présentait aussi des homologies avec une population de DC précédemment décrite. Cette collaboration nous a permis de combiner les compétences d'analyse transcriptomique de l'équipe de Marc Dalod à notre savoir-faire pour comparer en profondeur le transcriptome, le phénotype et la fonction des DC issues de progéniteurs à celles du sang.

Nous avons ainsi validé que les DC BDCA3^{high} obtenues *in vitro* sont homologues à celles du sang. Elles possèdent tout d'abord de fortes similarités transcriptomiques, vérifiées phénotypiquement. Elles répondent également de manière similaire à une stimulation par R848 ou PolyI:C alors qu'elles sont insensibles au LPS que ce soit en terme d'expression génique ou de sécrétion de cytokines. Enfin, la présentation croisée d'Ag par les DC BDCA3^{high} obtenues *in vitro* est fortement induite par R848 ou PolyI:C. Les autres DC obtenues dans la culture sont quant à elles homologues aux MoDC. Elles sont activées en réponse au LPS ou R848 mais leur présentation croisée d'Ag n'est pas augmentée en présence de R848 contrairement à ce qui est observée pour les DC BDCA3^{high}.

L'ensemble de ces résultats nous ont ainsi permis de valider la pertinence du modèle et de l'utiliser pour le reste de nos travaux.

Human XCR1⁺ Dendritic Cells Derived In Vitro from CD34⁺ Progenitors Closely Resemble Blood Dendritic Cells, Including Their Adjuvant Responsiveness, Contrary to Monocyte-Derived Dendritic Cells

Sreekumar Balan,^{*,†,‡} Vincent Ollion,^{§,¶,||,#} Nicholas Colletti,^{**} Rabie Chelbi,^{*,†,‡} Frédéric Montanana-Sanchis,^{*,†,‡} Hong Liu,^{**} Thien-Phong Vu Manh,^{*,†,‡} Cindy Sanchez,^{*,†,‡} Juliette Savoret,^{*,†,‡} Ivan Perrot,^{††} Anne-Claire Doffin,^{§,¶,||} Even Fossum,^{‡‡} Didier Bechlian,^{§§} Christian Chabannon,^{§§} Bjarne Bogen,^{‡‡,¶¶} Carine Asselin-Paturel,^{††} Michael Shaw,^{**} Timothy Soos,^{**} Christophe Caux,^{§,¶,||,#} Jenny Valladeau-Guilemond,^{§,¶,||,#,1} and Marc Dalod^{*,†,‡,||,1}

Human monocyte-derived dendritic cell (MoDC) have been used in the clinic with moderately encouraging results. Mouse XCR1⁺ DC excel at cross-presentation, can be targeted in vivo to induce protective immunity, and share characteristics with XCR1⁺ human DC. Assessment of the immunoactivation potential of XCR1⁺ human DC is hindered by their paucity in vivo and by their lack of a well-defined in vitro counterpart. We report in this study a protocol generating both XCR1⁺ and XCR1⁻ human DC in CD34⁺ progenitor cultures (CD34-DC). Gene expression profiling, phenotypic characterization, and functional studies demonstrated that XCR1⁻ CD34-DC are similar to canonical MoDC, whereas XCR1⁺ CD34-DC resemble XCR1⁺ blood DC (bDC). XCR1⁺ DC were strongly activated by polyinosinic-polycytidylic acid but not LPS, and conversely for MoDC. XCR1⁺ DC and MoDC expressed strikingly different patterns of molecules involved in inflammation and in cross-talk with NK or T cells. XCR1⁺ CD34-DC but not MoDC efficiently cross-presented a cell-associated Ag upon stimulation by polyinosinic-polycytidylic acid or R848, likewise to what was reported for XCR1⁺ bDC. Hence, it is feasible to generate high numbers of bona fide XCR1⁺ human DC in vitro as a model to decipher the functions of XCR1⁺ bDC and as a potential source of XCR1⁺ DC for clinical use. *The Journal of Immunology*, 2014, 193: 1622–1635.

Dendritic cells (DC) are a heterogeneous family of rare leukocytes that sense danger signals and convey them to lymphocytes for the orchestration of adaptive immune defenses. Clinical trials used monocyte-derived DC (MoDC) to

attempt to promote protective immunity in patients suffering from infections or cancer. These immunotherapies showed limited efficacy, owing to the poor recirculation of MoDC to lymph nodes (1, 2) and likely to other yet uncharacterized functional differences

*Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, UNIV UM2, Aix-Marseille Université, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, 13288 Marseille, France; [†]INSERM, Unité Mixte de Recherche 1104, 13288 Marseille, France; [‡]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7280, 13288 Marseille, France; [§]Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Lyon 1, Université de Lyon, 69373 Lyon, France; [¶]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5286, Département Immunité, Virus et Microenvironnement, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69373 Lyon, France; ^{||}INSERM U1052, Centre Léon Bérard, 69373 Lyon, France; [#]LabEx DEVweCAN, 69373 Lyon, France; ^{**}Sanofi, Cambridge, MA 02139; ^{††}Innate-Pharma, 13009 Marseille, France; ^{‡‡}K.G. Jebsen Center for Research on Influenza Vaccines, University of Oslo and Oslo University Hospital, 0027 Oslo, Norway; ^{§§}Institut Paoli-Calmettes, 13009 Marseille, France; ^{¶¶}Center for Immune Regulation, Institute of Immunology, University of Oslo and Oslo University Hospital Rikshospitalet, 0424 Oslo, Norway; and ^{||}LabEx DCBIOL, 13288 Marseille, France

¹J.V.-G. and M.D. are cosenior authors.

Received for publication May 15, 2014. Accepted for publication June 11, 2014.

This work was supported by the I2HD CIML-SANOI project, INSERM, Agence Nationale de la Recherche (EMICIF, ANR-08-MIEN-008-02; to M.D.), Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (to M.D.), Institut National du Cancer Grant 2011-155 (to C. Caux, J.V.-G., and M.D.), Ligue contre le Cancer (Comité de la Savoie), Lyon Biopole (France), Association pour la Recherche sur le Cancer (France), Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe Labellisée to M.D.), and the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013 Grant Agreement 281225; to M.D.). V.O. is a laureate from a LabEx DEVweCAN Ph.D. fellowship. S.B. was supported through the Agence Nationale de la Recherche (EMICIF, Grant ANR-08-MIEN-008-02). S.B., F.M.-S., R.C., and C.S. were supported by the I2HD CIML-SANOI

project. T.-P.V.M. was supported through the Agence Nationale de la Recherche (PhyloGenDC, Grant ANR-09-BLAN-0073-02), and the European Research Council (FP7/2007-2013 Grant Agreement 281225).

S.B., J.V.-G., and M.D. conceived the project and designed the experiments; S.B., V.O., R.C., F.M.-S., H.L., A.-C.D., C.S., J.S., N.C., M.S., and I.P. conducted experiments; B.B. and E.F. provided XCL1 vaccibodies; D.B. and C. Chabannon provided cord blood samples; S.B., V.O., R.C., F.M.-S., H.L., C.S., C. Caux, J.V.-G., and M.D. conducted data analyses; T.-P.V.M. and M.D. trained and supervised R.C. and F.M.-S. for bioinformatics analyses; S.B. and M.D. wrote the manuscript; all authors contributed to the editing of the manuscript; C. Caux, J.V.-G., and M.D. gathered funding; and J.V.-G. and M.D. supervised the project.

The microarray data presented in this article have been submitted to the Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE57671.

Address correspondence and reprint requests to Marc Dalod, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Campus de Luminy, Case 906, F-13288 Marseille Cedex 09, France. E-mail address: dalod@ciml.univ-mrs.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: bDC, blood DC; CB, cord blood; DC, dendritic cell; EFS, Etablissement Français du Sang; FLT3-L, FLT3-ligand; GSEA, GeneSet Enrichment Analysis; LT-DC, lymphoid tissue-resident DC; MoDC, monocyte-derived DC; PCA, principal component analysis; pDC, plasmacytoid DC; PolyI:C, polyinosinic-polycytidylic acid; SCF, stem cell factor; TPO, thrombopoietin.

This article is distributed under The American Association of Immunologists, Inc., [Reuse Terms and Conditions for Author Choice articles](#).

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

between MoDC and lymphoid tissue-resident DC (LT-DC). Hence, major efforts are being made to better characterize human LT-DC and to evaluate their immunoactivation potential.

Steady-state human blood and secondary lymphoid organs contain three major DC subsets, CD141(BDCA3)⁺CLEC9A⁺ DC, CD1c(BDCA1)⁺ DC, and CLEC4C(BDCA2)⁺ plasmacytoid DC (pDC) (3). Homologies exist between mouse and human LT-DC subsets (4, 5). Comparative transcriptomics (4–7) and functional studies (7–12) showed that human CD141⁺CLEC9A⁺ DC are homologous to mouse spleen CD8 α ⁺ DC, which are specialized in cross-presentation. Mouse CD8 α ⁺ DC and human CD141⁺CLEC9A⁺ DC specifically express the XCR1 chemokine receptor (4, 8, 9, 13, 14) and can therefore be coined XCR1⁺ DC. The ligands of XCR1 are selectively expressed in NK and CD8 T cells, promoting their interactions with XCR1⁺ DC (13). Human XCR1⁺ DC have been described in many tissues (6, 7, 15). Human and mouse XCR1⁺ DC specifically express high levels of TLR-3 (16) and respond to its triggering with hepatitis C virus or with the synthetic ligand polyinosinic-polycytidylic acid (PolyI:C) by IFN- λ production (12, 15, 17) and by enhanced cross-presentation (7–11). The extent to which human XCR1⁺ DC are more efficient for cross-presentation than other human DC subsets is debated. It depends on the tissue origin of the DC subsets, on their activation status, and on the mode of Ag delivery (7–10, 18–23). However, several independent studies showed that human XCR1⁺ blood DC (bDC) excel at cross-presentation of cell-associated Ags (8–10, 18) and of particulate Ags delivered through Fc γ Rs, through lysosomes (19, 20) or upon polyI:C stimulation (8, 10, 23). Because they share unique characteristics with mouse XCR1⁺ DC, human XCR1⁺ bDC constitute a distinct human DC subset that may have potential clinical applications (24–26). To determine whether and how human XCR1⁺ DC could be harnessed in the clinic, it is necessary to better characterize them. This includes determining their global responses to adjuvants. A major bottleneck for such studies is the paucity of XCR1⁺ DC in human tissues. Generating high numbers of XCR1⁺ DC in vitro from CD34⁺ hematopoietic progenitors will help overcome this problem.

Human DC derived in vitro from monocytes or CD34⁺ progenitors have been widely used to investigate DC biology. Only MoDC (27) and Langerhans cells (LC) (28) have been generated reproducibly in vitro by many teams. Gene expression profiling and/or ontogenic studies showed that MoDC, Langerhans cell, and DC lines strikingly differ from LT-DC subsets and are more similar to monocytes or macrophages (4, 29–32). Cultures of CD34⁺ progenitors with FLT3-ligand (FLT3-L) or thrombopoietin (TPO) have been reported to yield pDC, CD141⁺CLEC9A⁺ DC, or CD1c⁺ DC (11, 33, 34). The extent to which the CD141⁺CLEC9A⁺, the CD1c⁺, or the other HLA-DR⁺ cells in these cultures resembled human bDC subsets was, however, not thoroughly examined. In this study, we report a protocol generating high numbers of both XCR1⁺ DC and XCR1⁻ DC in CD34⁺ progenitor cultures (CD34-DC), with a high-throughput characterization of these DC subsets by gene expression and secreted molecule profiling under steady-state and activation conditions and by comparison with XCR1⁺ bDC and MoDC.

Materials and Methods

Isolation of cord blood CD34⁺ cells

Human nontherapeutic-grade cord blood (CB) samples were collected from informed and consenting mothers at the Etablissement Français du Sang (EFS) Lyon in the frame of an EFS-INSERM agreement or at the Marseille University Hospital de la Conception birth clinic and obtained through the Marseille CB bank. Marseille CB bank is a not-for-profit allogeneic CB bank affiliated with the French consortium of CB bank (RFSP,

Reseau Francais du Sang Placentaire) and the “Agence de Bioledecine.” CB units that were disqualified for therapeutic use upon reception at the Institut Paoli-Calmettes cell therapy facility, because of insufficient volume or total cell number, were used for research, as indicated to pregnant mothers in the information document. The protocol was reviewed by the Institut Paoli-Calmettes Comité d’Orientation Stratégique (COS or IRB). CD34⁺ cells were enriched magnetically by using the Dynal (Invitrogen) or Miltenyi Biotec CD34⁺ cell isolation kit. CD34⁺ cells from adult donor bone marrow or mobilized peripheral blood were purchased from properly licensed commercial companies (AllCells and StemCells).

In vitro generation of MoDC from enriched monocytes derived from CB CD34⁺ cells

MoDC were differentiated from enriched monocytes derived from CB CD34⁺ cells, as adapted from a published protocol (35). CD34⁺ cells were expanded for 21 d in expansion#1 medium (stemspan from StemCell Technologies; 10% FBS, 25 ng/ml Flt-3L, 20 ng/ml stem cell factor [SCF], and 10 ng/ml TPO). The cells were replated in weekly intervals at 5×10^4 cells/ml, 2 ml/well, in 6-well plates, in fresh expansion#1 medium. On day 14, the cells were plated in 100-mm dishes at 2×10^5 cells/ml, 10 ml/dish, in fresh expansion#1 medium. On day 21, CD14⁺ monocytes were enriched by positive selection through MACS (Miltenyi Biotec) and differentiated for 7 d in differentiation#1 medium (RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich), 10% FBS, 50 ng/ml GM-CSF, and 25 ng/ml IL-4) (GM4 protocol). The growth factors and cytokines used were from PeproTech unless specified otherwise.

In vitro generation of XCR1⁺ and XCR1⁻ DC from CB CD34⁺ cells

XCR1⁺ CD34-DC cultures were performed accordingly to the FS36 protocol (11) and modifications thereof as described below. For the FS36 protocol, CD34⁺ cells were cultured for 7 d at 5×10^4 cells/ml, 2 ml/well, in 6-well plates, with expansion#2 medium (stemspan; 100 ng/ml Flt-3L, 100 ng/ml SCF, 20 ng/ml IL-3, and 20 ng/ml IL-6) in the absence of serum supplementation. Expanded cells were harvested on day 7. They were used for DC generation, either directly or after cryopreservation, through culture in U-bottom 96-well plates in differentiation#2 medium (RPMI 1640 medium; 10% FCS, 100 ng/ml Flt-3L, 20 ng/ml SCF, 20 ng/ml GM-CSF, and 20 ng/ml IL-4). On day 6, half of the medium was replaced, and fresh cytokines were added. Cultures were harvested at days 8–11. In the adapted version FS36A, 5% heat-inactivated autologous plasma was added to the expansion medium. In the FS3TA protocol, for the expansion phase, 50 ng/ml TPO was substituted to IL-6 (expansion#3 medium), and 5% heat-inactivated autologous plasma was added. The FS3T protocol was based on the FS3TA with substitution of autologous plasma by 10% FBS. The optimized FS3T* protocol was based on the FS3T protocol, with reduced cell density and culture in 96-well plates during the expansion phase and decreased concentration of GM-CSF and IL-4 during the differentiation phase. In detail, for the FS3T* protocol, CD34⁺ cells were cultured for 7 d at 2.5×10^4 cells/ml, 200 μ l/well, in round-bottom 96-well plates, with expansion#3 medium (stemspan; 100 ng/ml Flt-3L, 100 ng/ml SCF, 20 ng/ml IL-3, and 50 ng/ml TPO) with 10% FCS. Expanded cells were differentiated in RPMI 1640 medium plus 10% FCS, with 100 ng/ml Flt-3L, 20 ng/ml SCF, 2.5 ng/ml GM-CSF, and 2.5 ng/ml IL-4 in U-bottom 96-well plates (6.25×10^4 cells/ml and 200 μ l well). On day 6, half of the medium was replaced, and fresh cytokines were added. Cultures were harvested on days 8–13, depending on the experiments.

Surface staining and sorting of *in vitro*-generated DC

Cells were stained with Abs (Table I) for 30 min at 4°C, washed with 1 \times PBS, and acquired on a LSR II or Canto II flow cytometer (BD Biosciences). Human XCR1 was stained with a fluorescently coupled recombinant human chemokine ligand vaccibody (rhXCL1-mCherry) (36). FS36 and FS3T cultures were sorted into >97% pure DC subsets with a FACSAria cytometer (BD Biosciences), based on viability (negativity for Sytox blue; Invitrogen) and expression of CD141 and CD11c.

Purification of peripheral blood DC

PBMC were prepared by Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) gradient centrifugation from buffy coats received from EFS (Marseille) and depleted of monocytes, B cells, and T cells by negative selection using LD columns and magnetic beads coupled to Abs against CD3, CD14, and CD19 (Miltenyi Biotec). Enriched cells were stained for 30 min at 4°C in 1 \times PBS and 0.5% BSA. Viable (Sytox blue-negative) DC subsets were sorted with a FACSAria cytometer (BD Biosciences) to a purity > 96%, as Lin⁻HLA-

DR⁺CD11c⁺CD1c⁻CLEC4C⁻CD141^{high} cells for XCR1⁺ DC, Lin⁻HLA-DR⁺CD11c^{high}CD1c⁺CLEC4C⁻CD141^{-/low} cells for CD1c⁺ DC, and Lin⁻HLA-DR⁺CD11c⁻CD1c⁻CLEC4C⁺CD141^{-/low} cells for pDC.

Cytospin and Wright–Giemsa stainings

Cells were diluted at 10–15 × 10³ cells/50 μl and used for the cytospin at 400 rpm for 4 min. The slides were air-dried for 15 min, fixed in methanol for 7 min, and stained with Wright–Giemsa solution (Sigma-Aldrich). Images were taken with a Nikon eclipse (camera “DS-Fi2”) microscope.

TLR stimulation of DC subsets

Optimal doses of adjuvants were defined by titration curves in assays assessing the phenotypic maturation of CD34-DC cultures (data not shown). Sorted DC subsets were stimulated for 16 h with PolyI:C (5 μg/ml), R848 (10 μg/ml), or LPS (1 μg/ml) (all from InvivoGen). Cells were then examined for phenotypic maturation or used for RNA extraction. Sorted bDC were maintained in Flt-3L (100 ng/ml) plus GM-CSF (20 ng/ml). MoDC were stimulated on day 6.

Cytokine production assays

Cytokines were titrated in culture supernatants with a custom procarta immune assay kit following the instructions from the manufacturer. Data were acquired with the Magpix reader using the xPONENT 4.2 software and analyzed with the Milliplex Analyst 5.1 Software.

RNA extraction and microarray experiments

Total RNA was prepared with the RNeasy Micro kit (Qiagen). The quantity and integrity of mRNA were measured using the 2100 Bioanalyzer system with picochips (Agilent Technologies). The RNA integrity numbers were generally above 8 and never below 7. Microarray experiments were performed at the Plate-forme Biopuces (Strasbourg, France) (<http://www-microarrays.u-strasbg.fr>). In brief, cDNA was generated and labeled using the Ribo-SPIATM Whole Transcript Amplification Process (NuGen) using as a starting material 20 ng total RNA for most of the in vitro-derived DC and 1 ng for ex vivo-isolated blood DC. GeneChip Human Gene 1.0 ST DAT files were processed using Affymetrix Gene Chip Operating System to generate .CEL files. Quality control of the array hybridization and normalization of the raw Affymetrix expression data with Robust Multi-chip Analysis 2 (37) were performed through Bioconductor in the R statistical environment (version 2.14.1) using the oligo package. Density plots of the normalized expression data were generated to estimate the background noise. For TLR stimulations of CD34-DC subsets, differentially expressed genes between conditions were identified by General Linear Model with paired analysis comparing PolyI:C, R848, or LPS-treated samples to unstimulated controls for each DC subset of each individual CB culture tested. For hierarchical clustering and heat maps, each gene was represented by only one ProbeSet selected as the one giving the highest signal. Principal component analysis (PCA) was computed with the MeV software and represented with the R software (scatterplot3D package). Hierarchical clustering was made with the pvclust package in R to evaluate the robustness of the branches of the tree through multiscale bootstrap resampling of the genes (<http://www.is.titech.ac.jp/~shimo/prog/pvclust/>). Heat-map representations were made with the GeneE software (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/>). Genes were clustered based on coregulation analysis using BioLayout Express3D for computing Pearson's correlation coefficients and for graphical representation (38).

Allogeneic CD4⁺ T cell stimulation

CD4⁺ T cells were isolated from buffy coat with the RosetteSep human CD4⁺ T cell enrichment mixture (StemCell Technologies). CD4⁺ T cells were labeled with CFSE (2 μM) and cocultured with DC at 20:1 ratio for 6 d. T cell proliferation and CFSE dilution was assessed by FACS after input of a same number of latex beads in each well and staining with PE-CD3 and allophycocyanin-CD4. Absolute cell counts were determined through normalization by acquisition of the same number of latex beads per sample.

Generation of K562-N9V or GFP expressing cell lines

We used lentiviral-based vectors to generate the K562 cell line expressing the N9V epitope of the CMV pp65 fused in frame at the 5'-end to cytoplasmic OVA. The HIV lentiviral backbone is based on self-inactivating 3'-long terminal repeat vectors. This vector was engineered to carry first the human CMV early enhancer/chicken β-actin hybrid promoter driving the N9V-OVA protein, followed by the spleen focus-forming virus pro-

motor driving the enhanced GFP reporter gene. To increase the level of transcription the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element was inserted downstream of N9V-OVA. Amplification of the fusion protein was done using a vector encoding a full OVA as template and the following primers: forward N9V-CytOVA, 5'-GCCTCGAGTGAGCCACCATGATCCTGGCCCGCAACCTGGTGCCCATGGTGGCTACGGTTCAGGGTCAGAATACCAGGACACAAATAAATAAGGTTGTTCCG-3', and RVS-OVA, 5'-CTGCTCAAGGCCTGAGACTTC-3'. Viruses were pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein, infections at MOI 5 were performed, and 5 d posttransduction, GFP-positive K562 cells were cell sorted, expanded in culture, and used as a stable bulk population. GFP expression was checked before each experiment. Negative controls for cross-presentation experiments always included K562 cells infected with a lentivirus encoding GFP alone, which never induced IFN-γ production by the CD8 T cell clone (data not shown).

Cross-presentation assay

A total of 10⁵ K562 cells expressing the N9V (pp65⁴⁹³⁻⁵⁰³) epitope from the major CMV structural protein and 0.5 × 10⁵ DC were cocultured in round-bottom 96-well plates in complete medium for 24–36 h with or without PolyI:C (5 μg/ml) or R848 (10 μg/ml) (InvivoGen). As positive control, 10 nM soluble N9V peptide was added to DC for 1 h before extensive washes. An N9V-specific T cell clone (0.5 × 10⁵ cells/well) (39) was then added in the presence of GolgiStop (BD Biosciences) for an additional 12 h (ratio DC:T = 1:2). After fixation and permeabilization, T cell activation was determined as the percentage of IFN-γ-expressing cells within CD3⁺GFP⁻ cells.

Statistics

Statistics for gene chips data analyses are detailed in *Materials and Methods* and the figure legends. Significance for other experimental data was evaluated with Graph pad Prism 6, using the tests indicated in the figure legends.

Accession numbers

The microarray data have been submitted to the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) under accession number GSE57671.

Results

Combined use of FLT3-L and TPO in CD34⁺ progenitor cultures yields high numbers of XCR1⁺ DC

We reproduced what to our knowledge is the first published protocol for in vitro generation of XCR1⁺ DC from CB CD34⁺ progenitors (11). It consisted in an initial 7-d expansion phase with FLT3-L, SCF, IL-3, and IL-6 (“FS36” cultures), followed by a 13-d differentiation phase with FLT3-L, SCF, GM-CSF, and IL-4 (Supplemental Fig. 1A). We tested modifications of this protocol by varying the cytokines used for the expansion phase (data not shown), in particular IL-6 replacement by TPO (“FS3T” cultures). FS36 and FS3T cultures were both composed in majority of CD11c^{high}CD141^{+/}-HLA-DR⁺ cells (Fig. 1A, Table I, Supplemental Fig. 1B), which lacked expression of XCR1, CLEC9A, and CADM1 (Fig. 1B, Supplemental Fig. 1C) and were therefore named XCR1⁻ CD34-DC. The cultures also consistently encompassed CD11c^{low}CD141^{high}HLA-DR⁺ cells (Fig. 1A, Supplemental Fig. 1B), which shared with XCR1⁺ bDC (36) specific expression of XCR1, CLEC9A, and CADM1 (Fig. 1B, Supplemental Fig. 1C) and were thus named XCR1⁺ CD34-DC. MoDC were derived from the same CB CD34⁺ cells (Supplemental Fig. 1A) (35). The morphology of XCR1⁺ CD34-DC was similar to that of XCR1⁺ bDC, and XCR1⁻ CD34-DC resembled MoDC (Fig. 1C). FS3T cultures yielded higher percentages and absolute numbers of XCR1⁺ CD34-DC (Supplemental Fig. 1D, 1E). The yields of XCR1⁺ CD34-DC were improved by lowering cell density and adding 10% FBS during the expansion phase. During the differentiation phase, lower concentrations of GM-CSF and IL-4 were sufficient to yield maximal numbers of XCR1⁺ CD34-DC (data not shown). XCR1⁺ CD34-DC were not detected at the end of the

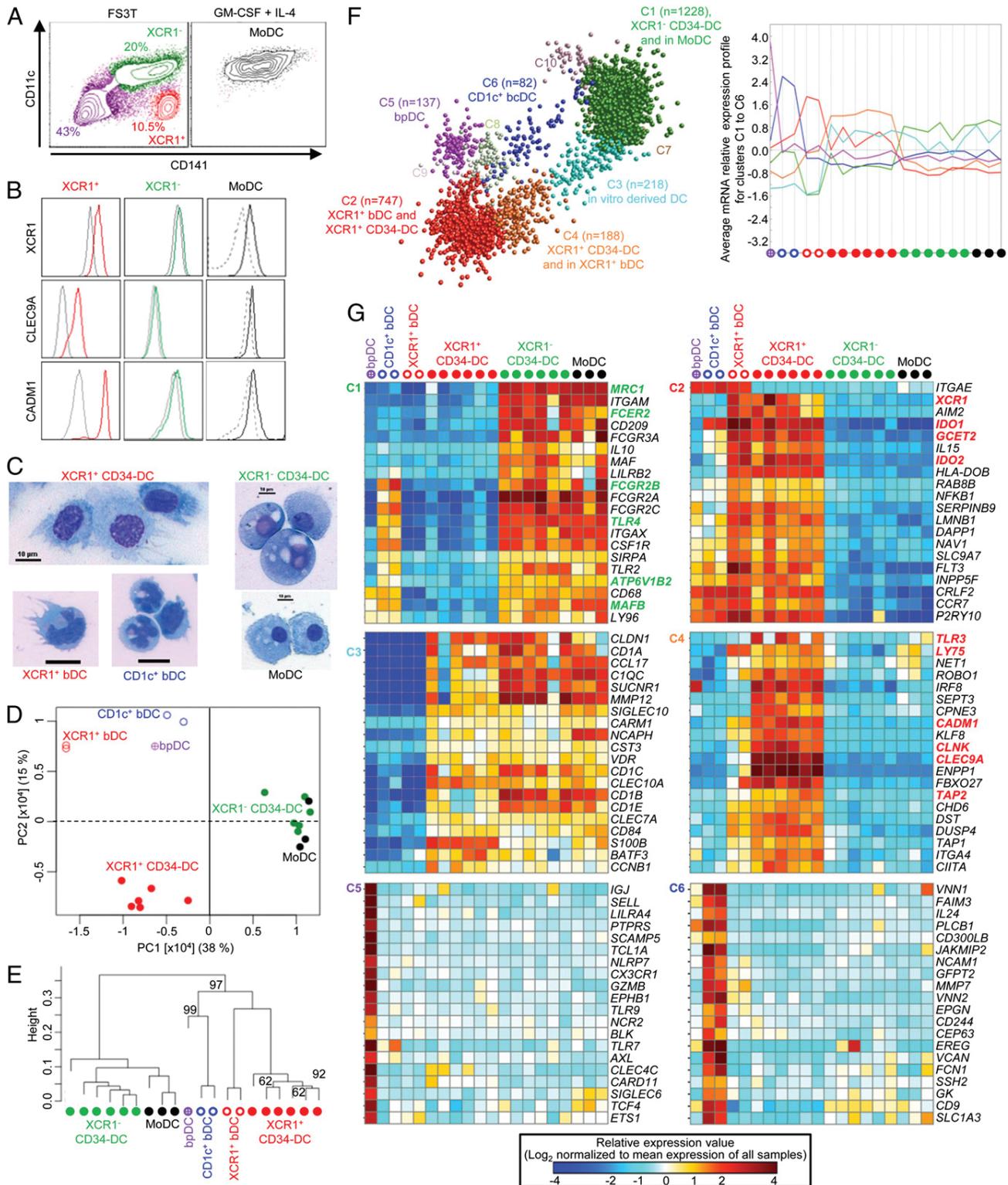


FIGURE 1. Characterization of in vitro-generated CD34-DC subsets. **(A)** Identification of cell subsets in cultures of CD34⁺ CB progenitors based on the expression of CD11c and CD141 for FS3T cultures (*left contour plot*, double-negative cells in violet, XCR1⁻ CD34-DC in green and XCR1⁺ CD34-DC in red) and G4 cultures (*right contour plot*, MoDC in black). **(B)** Expression of XCR1, CLEC9A, and CADM1 on each of the cell subsets identified in **(A)**, using the same color code. Isotype control stainings are shown as gray curve on each histogram. For **(A)** and **(B)**, one representative result of at least three independent cultures is shown. **(C)** Microscopy analysis of the morphology of Giemsa/May-Grünwald-stained DC subsets sorted from the cultures of CD34⁺ CB progenitors or from the blood of adult healthy donors. **(D–G)** Gene expression profiling of XCR1⁺ CD34-DC, XCR1⁻ CD34-DC, and MoDC. Microarrays were performed on total RNA extracted from DC subsets FACS purified from FS3T culture (XCR1⁺ CD34-DC and XCR1⁻ CD34-DC), from G4 cultures (MoDC), or from the blood of adult healthy donors (bpDC, CD11c⁺ bDC, and XCR1⁺ bDC). **(D)** PCA performed on all ProbeSets. **(E)** Hierarchical clustering performed on the 3934 genes showing a fold change ≥ 2 between at least two of the cell types studied, using Pearson and average as distance metric/linkage parameters. The numbers above edges indicate the robustness of the corresponding node, calculated as (*Figure legend continues*)

Table I. Abs and other reagents used for flow cytometry stainings

Ag	Fluorochrome	Clone or Reagent	Suppliers
CD1c	PE	AD5-8E7	Miltenyi Biotec
CD1c	PerCp	L161	BioLegend
CD1a	Allophycocyanin-Cy7	HI149	BioLegend
BDCA2	PerCp	201A	BioLegend
BDCA2	Biotin	AC144	Miltenyi Biotec
BDCA3	FITC	AD5-14H12	Miltenyi Biotec
BDCA3	Allophycocyanin	AD5-14H12	Miltenyi Biotec
BDCA3	PE	VI E013	BD Bioscience
lin mixture 3 (CD3,14, 19, 20)	FITC		BD Biosciences
Clec9a	Allophycocyanin	683409	R&D Systems
SynCAM/TSLC1/CADM1	Purified	3E1	MBL
CD11c	V450	B-ly6	BD Biosciences
CD11b	FITC	ICRF44	eBioscience
CD1b	Allophycocyanin	eBioSN13 (SN13 K5-1B8)	eBioscience
CD23	PE	EBVCS2	eBioscience
CD32	Allophycocyanin	CD32	eBioscience
CD206	PE-Cy7	19.2	eBioscience
CD209	Allophycocyanin	eB-h209	eBioscience
CD86	AF700	2331 (FUN-1)	BD Biosciences
CD83	Allophycocyanin	HB15e	BD Biosciences
HLADR	AF700	LN3	eBioscience
CD40	PE	MAB89	Beckman Coulter
TLR3	PE	34A3	Innate Pharma
TLR4	PE	HTA125	eBioscience
CD172	Allophycocyanin	15-414	eBioscience
CD103	PE-Cy7	B-ly7	eBioscience
CD14	FITC	M5E2	BD Biosciences
XCR1	mCherry	rhXCL1	Homemade
Secondary anti-chicken	FITC	Polyclonal Ab	Southern Biotechnology Associates
Biotin	Allophycocyanin	Streptavidin	BD Bioscience

expansion phase; their development during the differentiation phase required both GM-CSF and IL-4; they reached maximal frequencies ~11 d after the initiation of differentiation (data not shown). Hence, unless specified otherwise, XCR1⁺ CD34-DC were generated with an optimized protocol coined FS3T*, by culturing cells during expansion at 2.5×10^4 cells/ml, in U-bottom 96-well plates, with 10% FBS and, during differentiation, by decreasing GM-CSF and IL-4 concentrations to 2.5 ng/ml and harvesting cultures at day 11. FS3T* cultures yielded $1.8 \pm 1.5 \times 10^6$ XCR1⁺ CD34-DC from 10^5 CD34⁺ CB progenitors (Supplemental Fig. 1E).

XCR1⁺ and XCR1⁻ CD34-DC respectively expressed XCR1⁺ bDC and MoDC transcriptomic fingerprints

To determine in the broadest and most unbiased way possible to which extent XCR1⁺ CD34-DC resembled XCR1⁺ bDC, we profiled their gene expression. PCA (Fig. 1D) demonstrated a clear proximity between XCR1⁺ CD34-DC and XCR1⁺ bDC, and between MoDC and XCR1⁻ CD34-DC, along the PC1 axis representing the majority of gene expression variability in the dataset. Cell type distribution along PC1 was explained by their differential expression of many genes previously identified as

being selectively expressed either in XCR1⁺ bDC or in MoDC (4, 40) (Supplemental Table I). On the PC2 axis, XCR1⁺ CD34-DC clearly segregated away from XCR1⁺ bDC, which resulted in part from their higher expression of mitotic genes and lower expression of lysosomal genes (Supplemental Table I). Hence, XCR1⁺ CD34-DC are a good model of human XCR1⁺ bDC, contrary to MoDC, but their differentiation might be stopped at a preterminal stage as it has been reported for in vitro generated mouse XCR1⁺ DC (41). Hierarchical clustering confirmed the strong similarity between XCR1⁺ CD34-DC and XCR1⁺ bDC and between MoDC and XCR1⁻ CD34-DC (Fig. 1E). Coregulation analysis using BioLayoutExpress (Fig. 1F) clustered together genes with a high selective expression in MoDC and XCR1⁻ CD34-DC (C1, $n = 1228$) or in XCR1⁺ CD34-DC and XCR1⁺ bDC (C2, $n = 747$ and C4, $n = 188$), in consistency with the transcriptomic fingerprints previously reported for in vitro-derived (4) or ex vivo-isolated (40) human MoDC versus for human blood, skin, and intestine XCR1⁺ DC (Fig. 1G) (4, 6, 7). CD34-DC subsets from FS36 and FS3T cultures harbored similar gene expression programs (Supplemental Fig. 2). The expression patterns of several genes were confirmed at the protein level (Fig. 2). Bona fide XCR1⁺ DC also could be efficiently generated from CD34⁺ progenitors iso-

the percentage of occurrence of this node among 1000 independent trees generated by multiscale bootstrap resampling. (F) BioLayoutExpress clustering of the same set of genes as used in (E). On the left, the size of the different clusters and their relationships are shown as tridimensional clouds with each gene represented as a node colored accordingly to the gene clusters to which it belongs. The calculation parameters used were a cutoff for Pearson correlation coefficient at 0.8 and an inflation value at 2. Only clusters encompassing ≥ 50 genes are represented. On the right, the average gene expression pattern across all cell types examined is shown for each cluster. (G) Heat maps showing the expression patterns for 20 individual genes selected from each cluster mostly based on prior knowledge of their selective expression in ex vivo-isolated bDC subsets (bold red for XCR1⁺ bDC-specific genes) or monocyte-derived inflammatory DC (bold green) and/or based on prior knowledge of their functions.

lated from bone marrow (Fig. 3) or blood (data not shown) of adult donors. In conclusion, to our knowledge, we demonstrated for the first time that a culture protocol of CB CD34⁺ cells generated simultaneously different DC subsets along two independent ontogenic pathways, XCR1⁻ CD34-DC related to the monocyte lineage and similar to MoDC as well as XCR1⁺ CD34-DC resembling XCR1⁺ bDC.

XCR1⁺ versus XCR1⁻ CD34-DC show reciprocal responsiveness to TLR3 versus TLR4 triggering

Because we generated XCR1⁺ CD34-DC and MoDC-like XCR1⁻ CD34-DC from the same CD34⁺ cells in the same cultures, it allowed a rigorous side-by-side comparison of the cell-intrinsic immunoactivation potential of these two DC subsets, without potential confounding effects linked to differentiation from distinct cell progenitors and with different cytokines. XCR1⁺ CD34-DC matured phenotypically in response to PolyI:C but not to LPS, and conversely for XCR1⁻ DC and MoDC (Fig. 4A), in consistency with the opposite expression pattern in CD34-DC subsets of the respective receptors of these adjuvants, TLR3 and TLR4 (Fig. 2). TLR7/8 activation by R848 induced an intermediate response in all DC subsets (Fig. 4A). These response patterns were confirmed by gene expression profiling. In particular, both PCA (Fig. 4B) and hierarchical clustering (Fig. 4C) showed that PolyI:C stimulation of XCR1⁺ DC and LPS stimulation of XCR1⁻ CD34-DC and MoDC strongly affected their gene expression programs, setting them apart from their unstimulated counterparts. LPS stimulation of XCR1⁺ CD34-DC and PolyI:C stimulation of XCR1⁻ CD34-DC and MoDC did not strongly affect their gene expression programs. The highest number of differentially expressed genes ($n = 2010$) was observed for PolyI:C stimulation of XCR1⁺ DC (Fig. 4D, Supplemental Table I), followed by LPS stimulation of MoDC ($n = 1447$) and XCR1⁻ CD34-DC ($n = 1047$).

Hundreds of genes are similarly modulated in PolyI:C-stimulated XCR1⁺ CD34-DC and LPS-stimulated XCR1⁻ CD34-DC or MoDC

PCA showed a parallel shift in the gene expression programs of each DC subset from unstimulated to optimally activated states (Fig. 4B). Indeed, 370 genes were similarly modulated in response to PolyI:C in XCR1⁺ CD34-DC and in response to LPS in XCR1⁻ CD34-DC or MoDC (Fig. 5, Supplemental Table I). Ingenuity pathway analyses found many annotations to be significantly enriched for the genes commonly upregulated in mature DCs (Fig. 5), highlighting the contribution of this core maturation gene set to the canonical process of DC maturation, the activation of NK or T cells or more generally the immune defenses against bacteria or viruses, in a large part under the instruction of NF κ B or type I IFN (IFN-I) (Fig. 5C).

Many genes are modulated in specific combinations of DC subset/stimulus

Many genes were significantly modulated in specific combinations of DC subset/stimulus (Fig. 5A, 5B Supplemental Table I), likely determining the nature of the specific functions exerted by mature DC subsets. Fewer annotations were enriched for these gene sets and with lower statistical significance. Under steady-state conditions, XCR1⁻ CD34-DC or MoDC harbored a higher expression of genes coding for inflammatory molecules than XCR1⁺ CD34-DC (Fig. 6). TLR4 or TLR8 triggering of XCR1⁻ CD34-DC and MoDC further enhanced the expression of these inflammatory molecules and induced additional ones, including *IL18* and *IL12B* (Fig. 6). IL-10 was only detected in XCR1⁻ CD34-DC and MoDC

in response to R848 or LPS (Fig. 6A, 6B), consistent with production of this cytokine only by CD14⁺ DC but not XCR1⁺ DC in skin (7, 42). As described for XCR1⁺ bDC in vitro (12), XCR1⁺ CD34-DC uniquely expressed IFN- λ upon TLR3 triggering (Fig. 6A, 6B). Many other genes were newly found to be selectively induced to high levels in XCR1⁺ CD34-DC upon PolyI:C stimulation (Fig. 6, Supplemental Table I), including genes encoding antiapoptotic, antiviral, or costimulation molecules as well as cytokines/chemokines acting on NK or T cells.

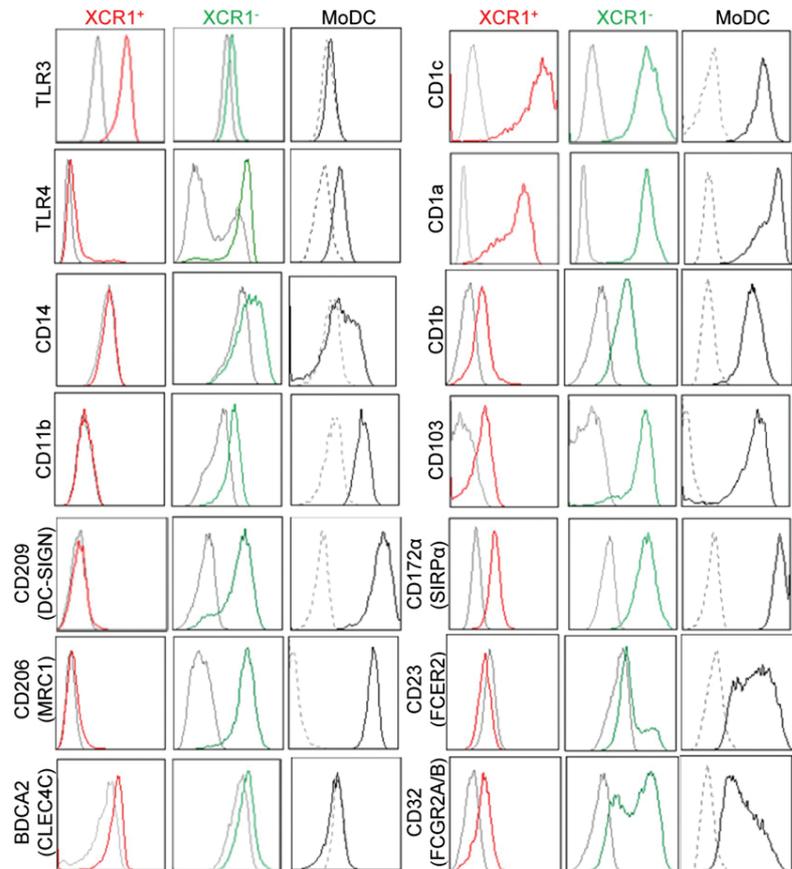
The response pattern of XCR1⁺ CD34-DC and XCR1⁺ bDC to candidate adjuvants are strikingly similar

To examine to which extent the responses of XCR1⁺ CD34-DC to adjuvants were similar to those of XCR1⁺ bDC, we compared the gene expression profiling of CD1c⁺ bDC, XCR1⁺ bDC, XCR1⁺ CD34-DC, and XCR1⁻ CD34-DC upon stimulation with R848, PolyI:C, or LPS. As observed for XCR1⁺ CD34-DC, XCR1⁺ bDC were not activated by LPS, moderately by R848, and strongly by PolyI:C (Fig. 7A, 7B). PolyI:C-stimulated XCR1⁺ CD34-DC, XCR1⁺ bDC, and CD1c⁺ bDC regrouped together, away from other conditions of stimulation of these cell types and from XCR1⁻ CD34-DC (Fig. 7A, 7B) or MoDC (data not shown). Cell type distribution along PCA axes resulted in a large part from their differential expression of many genes already at steady state (Fig. 7C, clusters 1 and 5–8) as well as from selective induction of genes in 1) CD1c⁺ bDC and XCR1⁻ CD34-DC by R848 and LPS (subcluster A), 2) bDC and XCR1⁺ CD34-DC by PolyI:C as well as XCR1⁻ CD34-DC by both PolyI:C and LPS (cluster 2), and 3) bDC and XCR1⁺ CD34-DC by PolyI:C (cluster 4). *IL12A* was strongly and exclusively induced in bDC subsets by PolyI:C. Despite being based on a very stringent and constrained selection of genes bearing a heavy weight in the first three components of the PCA, this analysis highlighted striking similarities and differences between DC subset responses to PolyI:C. To extend this observation, PolyI:C-induced gene clusters harboring contrasting expression pattern across all conditions were identified through iterative self-organizing maps (Fig. 7D). This confirmed that DC subset responses to PolyI:C were characterized both by 1) the induction of many genes specifically in bDC subsets and XCR1⁺ CD34-DC (cluster 3, $n = 388$), with a higher induction of a number of these genes in XCR1⁺ bDC and/or XCR1⁺ CD34-DC as compared with CD1c⁺ bDC (Supplemental Fig. 5), and 2) the induction of many genes, in particular interferon stimulated genes, by PolyI:C in all the DC subsets studied as well as by LPS in XCR1⁻ CD34-DC (cluster 5, $n = 203$). In addition to *IL12A*, several genes were induced exclusively by PolyI:C in bDC (cluster 4, $n = 63$), including *IL23A* and *IL13*. Thus, in addition to inducing interferon stimulated genes similar to MoDC and XCR1⁻ CD34-DC, bDC mounted a strikingly specific and strong response to PolyI:C, which was very well modeled by XCR1⁺ CD34-DC.

PolyI:C-activated XCR1⁺ CD34-DC increased their ability to stimulate allogeneic CD4⁺ T cells and have the highest capacity for cell-associated Ag cross-presentation

PolyI:C and R848 stimulations significantly increased the ability of XCR1⁺ CD34-DC to induce allogeneic CD4⁺ T cell proliferation, consistent with previous observations on human blood or skin XCR1⁺ DC (7, 10), although this was not the case with LPS (Fig. 8A). Under steady-state conditions, no significant differences were observed between DC subsets for their ability to cross-present a cell-associated Ag (Fig. 8B). PolyI:C stimulation increased this function in XCR1⁺ CD34-DC significantly above the levels observed at steady state and in XCR1⁻ CD34-DC and MoDC (Fig. 8B, 8C). Although R848 activated all DC subsets to

FIGURE 2. Phenotypic analyses confirm microarray data regarding the identity of CD34-DC subsets. DC cultures were stained with Abs against TLR3 or a variety of cell surface markers selected based on available Abs and differential expression of the corresponding genes between XCR1⁺ versus XCR1⁻ CD34-DC as shown in Fig. 1G. Data were analyzed as in Fig. 1A and 1B. One representative result of at least three independent cultures is shown.



the same extent (Fig. 4), it induced cross-presentation to significantly higher levels only in XCR1⁺ CD34-DC (Fig. 8B, 8C).

Discussion

In this paper, we report an optimized protocol for in vitro generation of high numbers of human XCR1⁺ DC from CD34⁺ hematopoietic progenitor cultures. We characterized these XCR1⁺ CD34-DC, as well as the XCR1⁻ CD34-DC representing the major cell population in the same cultures, through an unbiased, high-throughput comparison with XCR1⁺ bDC and with MoDC. These results unambiguously demonstrated that XCR1⁻ CD34-DC resemble MoDC, whereas XCR1⁺ CD34-DC are a good model of bDC and LT-DC, both under steady-state as well as activation conditions.

XCR1⁺ CD34-DC expressed the molecular signature characteristic of XCR1⁺ bDC, including the chemokine receptor XCR1, which likely promotes physical interactions with CD8⁺ T cells (8, 13), the endocytic receptor CLEC9A, which promotes cross-presentation of Ag derived from dying cells (43), the adhesion receptor CADM1, which may promote the induction of CTL responses (44), and the pattern recognition receptor TLR3, which allows sensing of dsRNA including responsiveness to the synthetic adjuvant PolyI:C. CD1c and CD141 are not reliable markers of human DC subsets, because they were expressed on all the three in vitro-derived DC subsets studied in this work, consistent with similar observations reported for ex vivo-isolated human DC subsets (7, 11, 42). Hence, flow cytometry assessment of cell surface expression of the discriminative markers XCR1 or CLEC9A and CADM1, or gene expression profiling, are critical to ensure the identity of HLA-DR⁺CD141⁺ cells in humans (7, 8, 11, 36).

To examine the immunoactivation potential of XCR1⁺ CD34-DC, XCR1⁻ CD34-DC, and MoDC, we selected for their stimulation three adjuvants widely used for basic research on DC maturation and/or for the design of novel immunotherapeutic treatments, LPS, PolyI:C, and R848. Ag targeting to XCR1⁺ DC combined with PolyI:C adjuvant is one of the best vaccination strategies to induce protective immune responses in mouse models of infectious diseases and cancer (45, 46). It is also very efficient for the induction of antiviral human CD4⁺ T cell responses in humanized mice in experimental settings where XCR1⁺ DC are

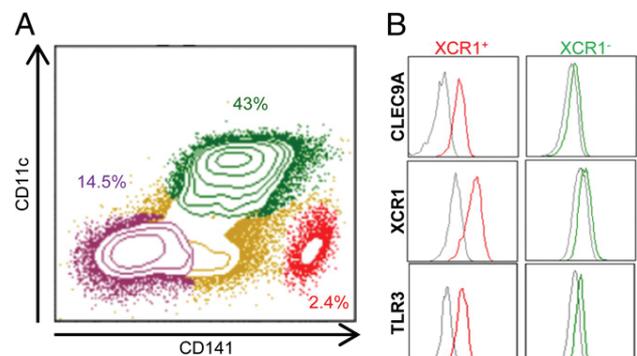


FIGURE 3. Efficient differentiation of XCR1⁺ DC in FS3T cultures of CD34⁺ hematopoietic progenitors from the bone marrow of adult donors. **(A)** Identification of cell subsets in cultures of adult bone marrow CD34⁺ progenitors based on the expression of CD11c and CD141, for FS3T cultures, similarly to what is shown for CB cultures on Fig. 1A. **(B)** Expression of selected markers on each of the cell subsets identified in (A), similarly to what is shown for CB cultures on Figs. 1B and 2. One representative result of at least two independent cultures is shown.

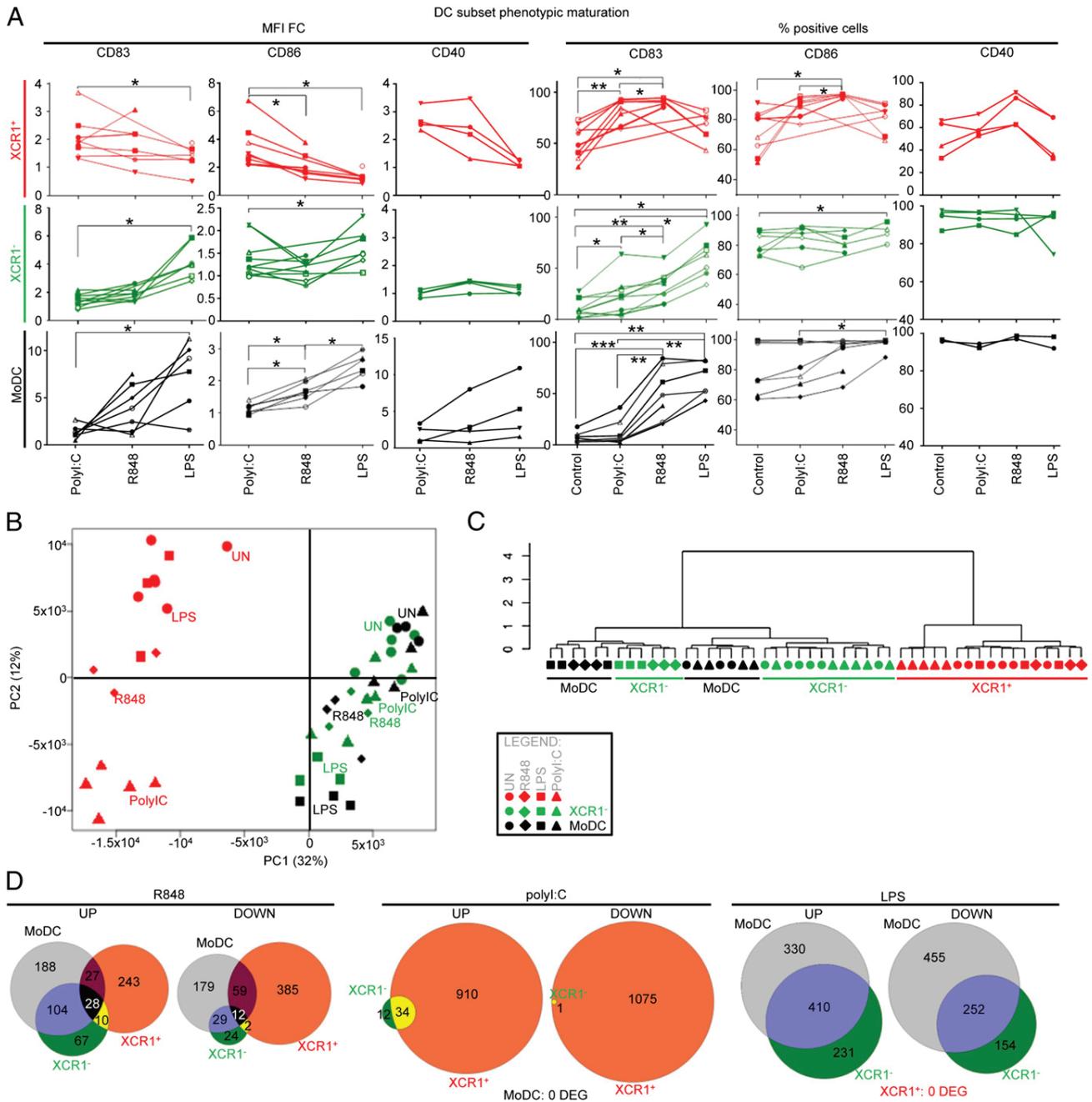
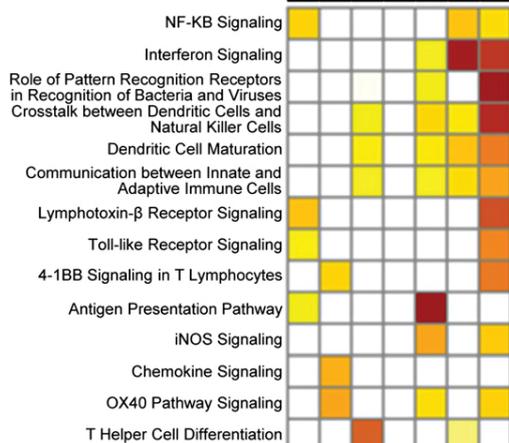
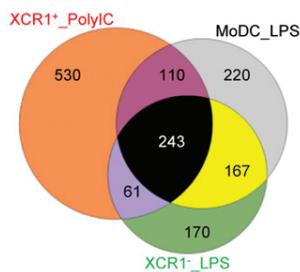


FIGURE 4. XCR1⁺ CD34-DC are uniquely and very strongly activated by polyI:C but fail to respond to LPS, whereas XCR1⁻ CD34-DC and MoDC show a reverse pattern. **(A)** Phenotypic maturation of CD34-DC subsets in response to stimulation with PolyI:C, R848, or LPS. MoDC generated from five different CB samples and seven independent cultures and XCR1⁻ versus XCR1⁺ CD34-DC subsets sorted from nine independent CB cultures representing five different CB samples were incubated for 16 h in medium alone (control) or with PolyI:C, R848, or LPS. Cells were then stained with Abs for the maturation markers CD83, CD86, CD40, or isotype control Abs. Results are represented as fold change (FC) of mean fluorescence intensity (MFI) above control cultures (*left graphs*) or as percentage of positive cells (*right graphs*) as a function of stimuli for each individual CB samples (symbols). To determine significance, a Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed on 10 independent cultures from five different donors. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 10⁻³. **(B–D)** Gene expression profiling of CD34-DC subsets exposed to PolyI:C, R848, or LPS. Genome-wide expression analysis was performed on XCR1⁺ versus XCR1⁻ CD34-DC subsets sorted from three to six independent FS3T CB cultures and on three independent MoDC cultures. **(B)** PCA performed on all ProbeSets. **(C)** Unsupervised hierarchical clustering of stimulated DC subsets performed on the 5015 genes showing a FC ≥ 1.5 between at least two conditions. **(D)** Venn diagrams showing the number of genes induced (UP) or repressed (DOWN) in each DC subset by R848 (*left*), PolyI:C (*middle*), or LPS (*right*), as well as the overlap for a given stimulus between DC subset responses.

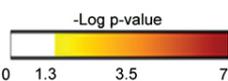
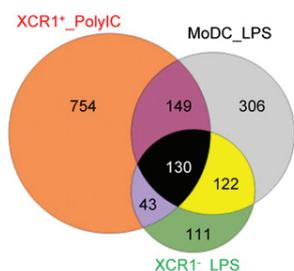
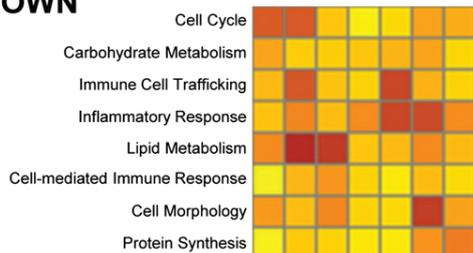
a major source of IFN-I (47). The unique potency of PolyI:C in eliciting strong adaptive cellular immune responses also extends to nonhuman primate vaccination against SIV, papillomavirus, or *Plasmodium falciparum* (48–50). As compared with many other

stimuli tested including LPS and R848, PolyI:C induces a unique combination of cytokines and chemokines in human whole blood assays (51), highlighting the particular immunoactivation potential of this adjuvant. However, the *in vivo* primary targets and specific

A UP



B DOWN



C

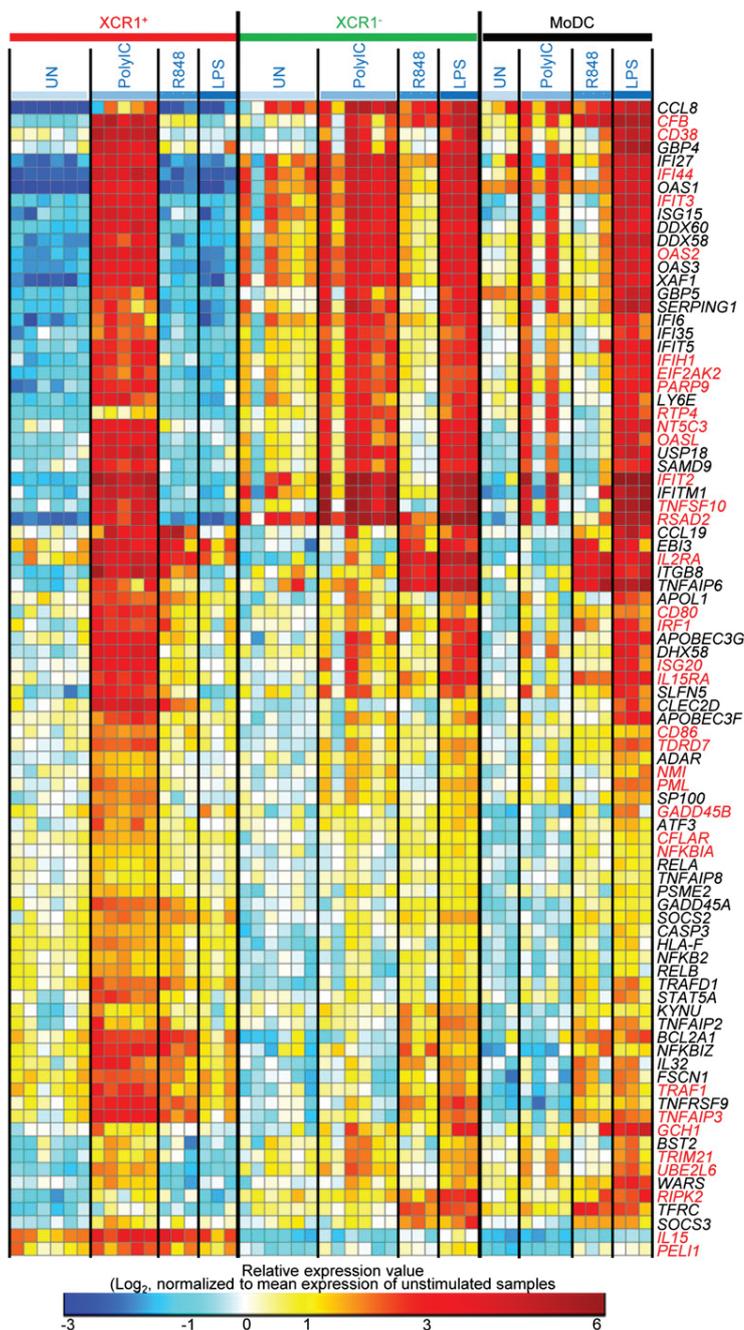


FIGURE 5. Comparison of the genetic reprogramming of XCR1⁺ DC in response to PolyI:C and XCR1⁻ DC or MoDC in response to LPS. Venn diagrams were performed on the data from Fig. 4E to compare the sets of genes induced (**A**) or repressed (**B**) in XCR1⁺ DC in response to PolyI:C and XCR1⁻ DC or MoDC in response to LPS. Ingenuity pathway analyses were performed for each set of genes as defined by the different areas of the Venn diagrams to determine whether these lists were enriched for genes annotated for specific pathways. The results are shown as heat maps where the color intensity increases with statistical significance of the annotation enrichment. (**C**) A heat map showing the expression patterns of the genes responsible for the enrichment of the pathways NF-KB signaling and IFN signaling shown in (**A**). The red font identifies the genes previously reported to be part of the core transcriptomic signature commonly upregulated in mouse DC subsets and in human pDC or MoDC upon activation with a variety of microbial stimuli.

modes of action of PolyI:C are still largely unknown, which hampers efficient translation to human of preclinical animal vaccination trials using this adjuvant. XCR1⁺ and CD1c⁺ bDC were strongly and uniquely activated by PolyI:C, but not by LPS, and conversely for MoDC. The differential responses of bDC versus MoDC to candidate adjuvants were nicely reproduced by the contrasting responses of in vitro-derived XCR1⁺ versus XCR1⁻

CD34-DC. Hence, XCR1⁺ CD34-DC are a good in vitro model for XCR1⁺ bDC not only under steady-state conditions but also in terms of responses to adjuvants. The differences in the responses to adjuvants of bDC versus MoDC are largely cell intrinsic rather than being imprinted by their development in distinct environments through exposure to different growth factors and cytokines. Of note, however, regulation of a core set of hundreds of genes

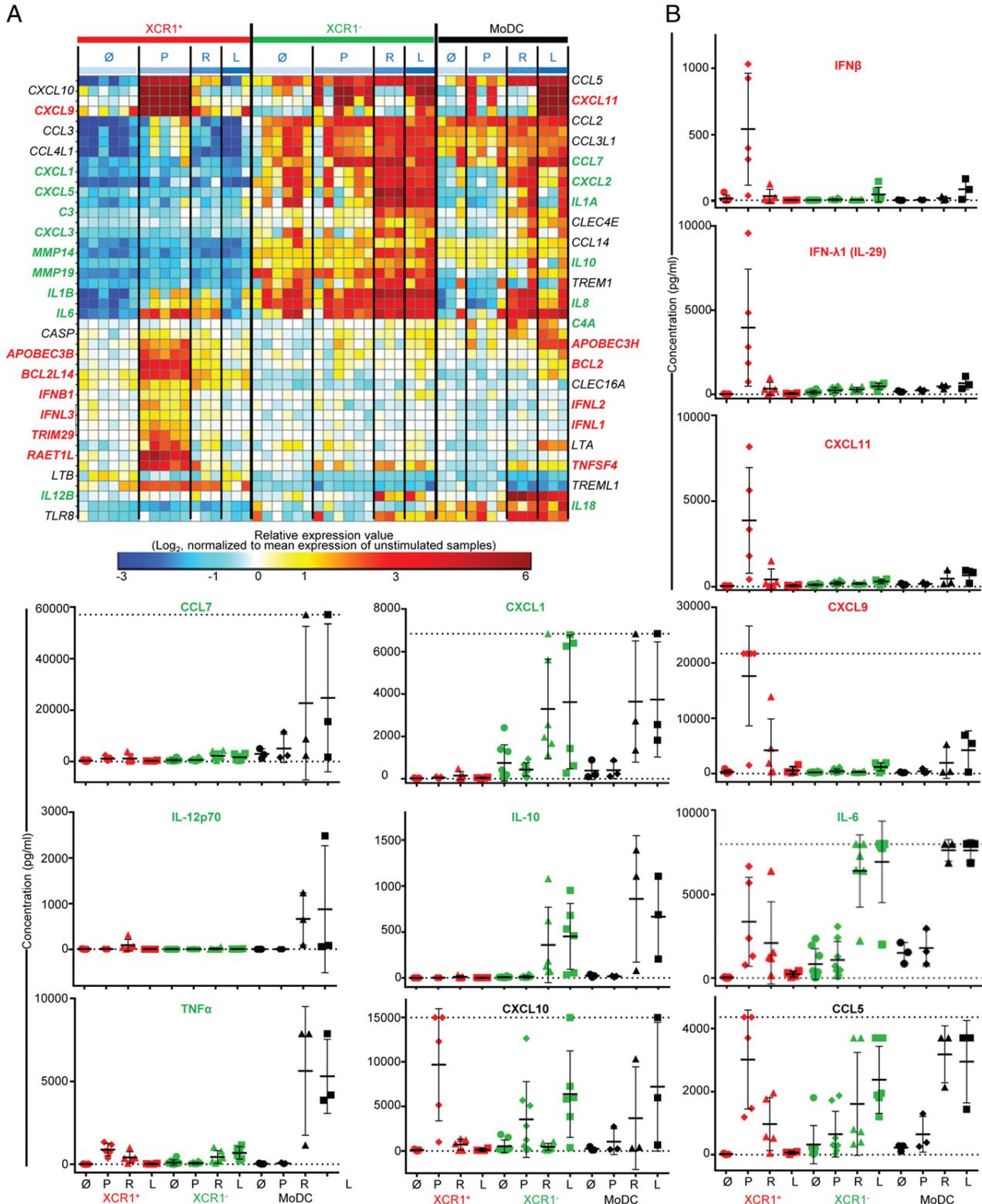


FIGURE 6. Cytokine production by CD34-DC subsets and MoDC. DC subsets were sorted and stimulated as described in Fig. 4. **(A)** Expression pattern of selected genes. Genes highlighted in bold green are 1) already expressed to higher levels in steady state XCR1⁻ CD34-DC or MoDC, as compared with XCR1⁺ CD34-DC (except for *IL12B* and *IL18*, which are not detected at steady state), 2) further induced specifically in XCR1⁻ CD34-DC or MoDC upon R848 or LPS stimulation, and 3) encoded for molecules with proinflammatory or matrix remodeling functions, except for IL-10, which is anti-inflammatory. Genes highlighted in bold red are induced to higher levels in PolyI:C-activated XCR1⁺ CD34-DC as compared with all the other conditions examined and encode for antiviral, antiapoptotic, or NK/T cell-stimulating molecules. **(B)** Secretion of selected cytokines. Culture supernatants were used for Luminex-based detection of 18 different analytes. Results from three to eight independent cultures for each DC subset are shown as individual points, with bar overlays indicating mean \pm SD. Dotted lines in the graph show detection (*bottom*) or saturation (*top*) thresholds. Color codes for molecule names are the same as in (A).

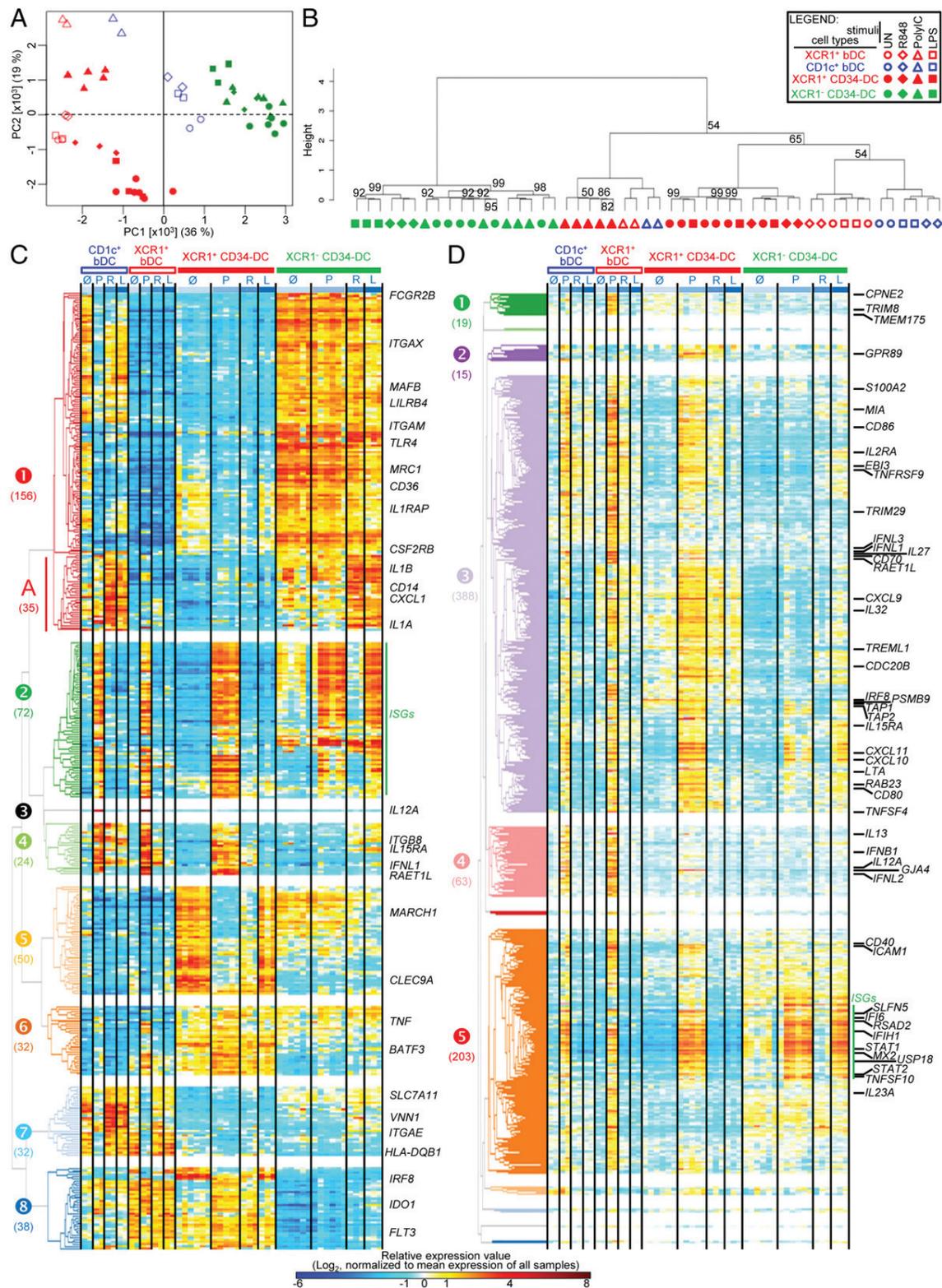


FIGURE 7. Comparison of the responses to adjuvants of CD34-DC and bDC subsets. XCR1⁺ bDC and CD1c⁺ bDC were FACS sorted from the blood of adult healthy donors, stimulated in vitro under the same conditions described in Fig. 4 for CD34-DC subsets, and processed for microarrays. Data were analyzed together with those of CD34-DC subsets shown in Fig. 4. **(A)** PCA performed on the 2978 genes showing a fold change ≥ 2 between at least two of the conditions studied. **(B)** Hierarchical clustering performed on the same set of genes as in (A), using Pearson/Ward as distance metric/linkage parameters. **(C)** A heat map showing the expression patterns of the genes bearing the most weight on cell type distribution along the PC1, PC2, and PC3 axes of the PCA illustrated in (A). **(D)** A heat map showing the expression patterns of PolyI:C-induced genes harboring contrasting expression patterns across conditions. Individual expression patterns of a few selected PolyI:C-induced genes are shown on Supplemental Fig. 3 as bar graphs of mean \pm SD of relative linear expression values for each combination of DC subset/stimulus to better show the differential expression between conditions.

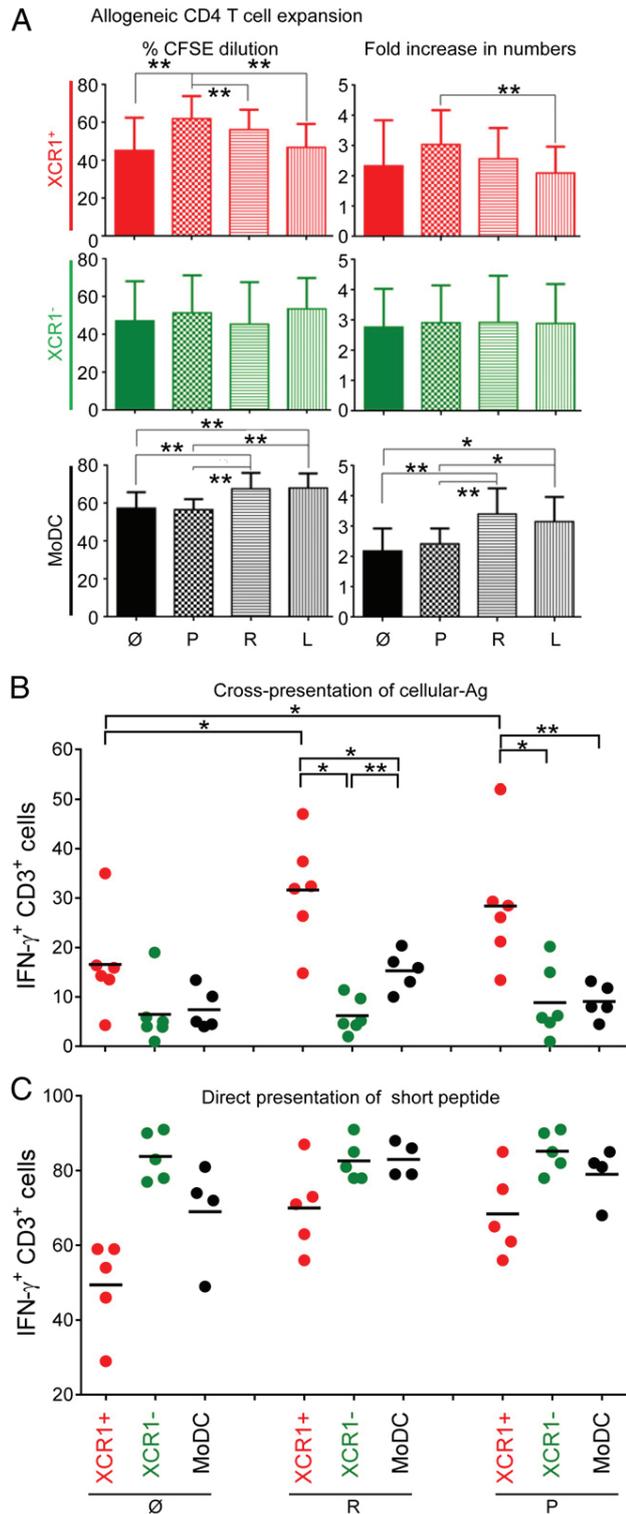


FIGURE 8. Activation of T lymphocytes by resting and stimulated CD34-DC subsets and MoDC. **(A)** Allogeneic CD4⁺ T cell activation. FS3T* CD34-DC subsets and MoDC were cocultured for 6 d with CFSE-labeled allogeneic CD4⁺ T cells. The percentages of CD4⁺ T cells showing CFSE dilution are shown on the *left graphs* and the fold changes in CD4⁺ T cell numbers on the *right graphs* as a function of stimuli. Results are shown as mean ± SD for three to four independent MLR cultures for each DC subset with three replicate wells per culture. To determine significance, a Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed. **(B and C)** Cross-presentation of a cell-associated Ag by FS36 CD34-DC subsets and by MoDC derived from adult peripheral blood monocytes. **(B)** Each DC

subset was cocultured 24 h with N9V/OVA-expressing K562 cells with or without R848 or PolyI:C (ratio DC:tumor = 1:1) and tested for induction of IFN-γ production by an N9V-specific T cell clone as assessed by intracellular staining. **(C)** N9V peptide-pulsed DC subsets were used as a positive control for the activation of the N9V-specific T cell clone and to ensure that all DC subsets were viable and had a similar efficacy for direct presentation of an optimal MHC-I-restricted epitope. No cross-presentation was observed in absence of cognate Ag when using K562 cells transfected with a vector expressing GFP only (data not shown). Results are shown as individual percentages of IFN-γ-expressing T cells for four to six independent experiments for each DC subset, with mean values indicated by black horizontal bars. To determine significance, a Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

was observed in all optimally activated human DC subsets irrespective of stimuli, including NFKB or IFN-I target genes. These results extend to human XCR1⁺ DC, our previous observations on mouse DC subsets and human MoDC and pDC (52), and emphasizes the relevance of MoDC as a practical model to study the cell biology and molecular regulation underlying this conserved maturation subprogram.

XCR1⁺ DC and MoDC expressed strikingly different patterns of molecules involved in the orchestration of inflammatory responses and in cross-talk with NK or T cells. Resting XCR1⁻ CD34-DC and MoDC expressed a much broader array of inflammatory molecules than XCR1⁺ CD34-DC and XCR1⁺ bDC, a difference that was further increased upon stimulation by LPS or R848. Resting XCR1⁺ CD34-DC and XCR1⁺ bDC expressed higher levels of genes critical for Ag processing and presentation, homing to lymph nodes or cross-talk with NK and T cells. In PolyI:C-activated XCR1⁺ CD34-DC, XCR1⁺ bDC, and eventually CD1c⁺ bDC, a specific secretion of IFN-λ was measured as well as the selective induction of genes involved in cross-talk with NK or T cells. Likewise to what was reported for XCR1⁺ bDC (8, 10), XCR1⁺ CD34-DC efficiently cross-presented a cell-associated Ag upon PolyI:C or R848 stimulation. This was not the case for XCR1⁻ CD34-DC and MoDC. Hence, MoDC may be poised for inducing inflammation, whereas XCR1⁺ CD34-DC and XCR1⁺ bDC might be endowed with a stronger potential for the activation of NK cells and T cells. However, some differences were observed between XCR1⁺ bDC and XCR1⁺ CD34-DC. XCR1⁺ bDC expressed higher levels of lysosomal genes at steady state (Supplemental Table I) and, in response to PolyI:C, induced more strongly many cytokine genes including *IFNLs*, *IFNB1*, *IL12A*, and *IL23A* (Supplemental Fig. 5). In contrast, XCR1⁺ CD34-DC expressed higher levels of mitotic genes (Supplemental Table I). This suggests that XCR1⁺ CD34-DC might not be completely differentiated.

In summary, our results demonstrated that XCR1⁺ CD34-DC and XCR1⁺ bDC are similar in their gene expression programs and functions not only under steady-state conditions but also upon stimulation. In particular, they mount strikingly broad but specific responses to TLR3 stimulation and are specialized in cross-presentation of cell-associated Ags. In contrast, XCR1⁻ CD34-DC resemble MoDC and are specialized in the modulation of inflammation. Our study demonstrated the feasibility of generating high numbers of bona fide XCR1⁺ DC in vitro from clinically relevant sources of CD34⁺ progenitors and demonstrated their unique responsiveness to the PolyI:C adjuvant, which represents a significant advance toward the potential use of human XCR1⁺ DC in the clinic.

subset was cocultured 24 h with N9V/OVA-expressing K562 cells with or without R848 or PolyI:C (ratio DC:tumor = 1:1) and tested for induction of IFN-γ production by an N9V-specific T cell clone as assessed by intracellular staining. **(C)** N9V peptide-pulsed DC subsets were used as a positive control for the activation of the N9V-specific T cell clone and to ensure that all DC subsets were viable and had a similar efficacy for direct presentation of an optimal MHC-I-restricted epitope. No cross-presentation was observed in absence of cognate Ag when using K562 cells transfected with a vector expressing GFP only (data not shown). Results are shown as individual percentages of IFN-γ-expressing T cells for four to six independent experiments for each DC subset, with mean values indicated by black horizontal bars. To determine significance, a Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

Acknowledgments

We thank Pierre Grenot, Marie-Laure Thibault, Marc Barad, Atika Zouine, and Isabelle Durand for technical support on cell sorting, Violaine Alunni and Christelle Thibault-Carpentier from the Plate-forme Biopuces (Strasbourg, France) for performing the microarray experiments (www.microarrays.ustrasbg.fr), and Lise-Marie Daufresne and Julie Bernard for management of the CB bank.

Disclosures

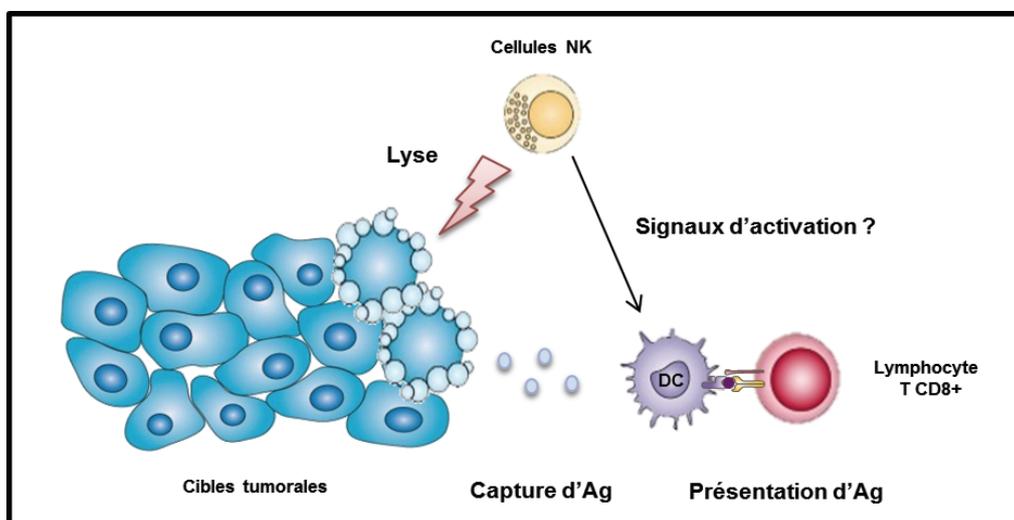
E.F. and B.B. are inventors on a patent application on XCL1-targeted vaccines. I.P. and C.A.-P. are employees of Innate Pharma and are inventors on a patent application on anti-human TLR3 Abs. H.L., M.S., N.C., and T.S. are employees of SANOFI. The other authors have no financial conflicts of interest.

References

- Adema, G. J., I. J. de Vries, C. J. Punt, and C. G. Figdor. 2005. Migration of dendritic cell based cancer vaccines: in vivo veritas? *Curr. Opin. Immunol.* 17: 170–174.
- Plantinga, M., M. Williams, M. Vanheerswynghels, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad, and B. N. Lambrecht. 2013. Conventional and monocyte-derived CD11b⁺ dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38: 322–335.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, et al. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: e74–e80.
- Robbins, S. H., T. Walzer, D. Dembélé, C. Thibault, A. Defays, G. Bessou, H. Xu, E. Vivier, M. Sellars, P. Pierre, et al. 2008. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9: R17.
- Crozat, K., R. Guiton, M. Williams, S. Henri, T. Baranek, I. Schwartz-Cornil, B. Malissen, and M. Dalod. 2010. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol. Rev.* 234: 177–198.
- Watchmaker, P. B., K. Lahl, M. Lee, D. Baumjohann, J. Morton, S. J. Kim, R. Zeng, A. Dent, K. M. Ansel, B. Diamond, et al. 2014. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* 15: 98–108.
- Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P. S. Wasan, X. N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, et al. 2012. Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37: 60–73.
- Crozat, K., R. Guiton, V. Contreras, V. Feuillet, C. A. Dutertre, E. Ventre, T. P. Vu Manh, T. Baranek, A. K. Storset, J. Marvel, et al. 2010. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207: 1283–1292.
- Bachem, A., S. Güttler, E. Hartung, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H. W. Mages, et al. 2010. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207: 1273–1281.
- Jongbloed, S. L., A. J. Kassianos, K. J. McDonald, G. J. Clark, X. Ju, C. E. Angel, C. J. Chen, P. R. Dunbar, R. B. Wadley, V. Jeet, et al. 2010. Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* 207: 1247–1260.
- Poulin, L. F., M. Salio, E. Griessinger, F. Anjos-Afonso, L. Craciun, J. L. Chen, A. M. Keller, O. Joffre, S. Zelenay, E. Nye, et al. 2010. Characterization of human DNGR-1⁺BDCA3⁺ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207: 1261–1271.
- Lauterbach, H., B. Bathke, S. Gilles, C. Traidl-Hoffmann, C. A. Lubber, G. Fejer, M. A. Freudenberg, G. M. Davey, D. Vremec, A. Kallies, et al. 2010. Mouse CD8 α ⁺ DCs and human BDCA3⁺ DCs are major producers of IFN- λ in response to poly I:C. *J. Exp. Med.* 207: 2703–2717.
- Dorner, B. G., M. B. Dorner, X. Zhou, C. Opitz, A. Mora, S. Güttler, A. Hutloff, H. W. Mages, K. Ranke, M. Schaefer, et al. 2009. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines co-operation with CD8⁺ T cells. *Immunity* 31: 823–833.
- Crozat, K., S. Tamoutounour, T. P. Vu Manh, E. Fossum, H. Luche, L. Ardouin, M. Williams, H. Azukizawa, B. Bogen, B. Malissen, et al. 2011. Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8 α ⁺ type. *J. Immunol.* 187: 4411–4415.
- Yoshio, S., T. Kanto, S. Kuroda, T. Matsubara, K. Higashitani, N. Kakita, H. Ishida, N. Hiramatsu, H. Nagano, M. Sugiyama, et al. 2013. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)⁺ dendritic cells are a potent producer of interferon- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 57: 1705–1715.
- Crozat, K., E. Vivier, and M. Dalod. 2009. Crosstalk between components of the innate immune system: promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunol. Rev.* 227: 129–149.
- Zhang, S., K. Kodys, K. Li, and G. Szabo. 2013. Human type 2 myeloid dendritic cells produce interferon- λ and amplify interferon- α in response to hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 144: 414–425 e417.
- Segura, E., M. Durand, and S. Amigorena. 2013. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J. Exp. Med.* 210: 1035–1047.
- Cohn, L., B. Chatterjee, F. Esselborn, A. Smed-Sørensen, N. Nakamura, C. Chalouni, B. C. Lee, R. Vandlen, T. Keler, P. Lauer, et al. 2013. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3⁺ dendritic cells at cross presentation. *J. Exp. Med.* 210: 1049–1063.
- Flinsberg, T. W., E. B. Compeer, D. Koning, M. Klein, F. J. Amelung, D. van Baarle, J. J. Boelens, and M. Boes. 2012. Fc γ receptor antigen targeting potentiates cross-presentation by human blood and lymphoid tissue BDCA-3⁺ dendritic cells. *Blood* 120: 5163–5172.
- Schreibelt, G., L. J. Klinkenberg, L. J. Cruz, P. J. Tacken, J. Tel. M. Kreutz, G. J. Adema, G. D. Brown, C. G. Figdor, and I. J. de Vries. 2012. The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3⁺ myeloid dendritic cells. *Blood* 119: 2284–2292.
- Mittag, D., A. I. Proietto, T. Loudovaris, S. I. Manering, D. Vremec, K. Shortman, L. Wu, and L. C. Harrison. 2011. Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J. Immunol.* 186: 6207–6217.
- Nizzoli, G., J. Krietsch, A. Weick, S. Steinfeld, F. Facciotti, P. Gruarin, A. Bianco, B. Steckel, M. Moro, M. Crosti, et al. 2013. Human CD1c⁺ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 122: 932–942.
- Gallois, A., and N. Bhardwaj. 2010. A needle in the ‘cancer vaccine’ haystack. *Nat. Med.* 16: 854–856.
- Raddford, K. J., and I. Caminschi. 2013. New generation of dendritic cell vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9: 259–264.
- Tacken, P. J., and C. G. Figdor. 2011. Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines. *Semin. Immunol.* 23: 12–20.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179: 1109–1118.
- Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1992. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258–261.
- Miller, J. C., B. D. Brown, T. Shay, E. L. Gautier, V. Jovic, A. Cohain, G. Pandey, M. Leboeuf, K. G. Elpek, J. Helft, et al. 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13: 888–899.
- Hoeffel, G., Y. Wang, M. Greter, P. See, P. Teo, B. Malleret, M. Leboeuf, D. Low, G. Oller, F. Almeida, et al. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209: 1167–1181.
- Schulz, C., E. Gomez Perdiguer, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S. E. Jacobsen, H. W. Pollard, et al. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86–90.
- Lundberg, K., A. S. Albrekt, I. Nelissen, S. Santegoets, T. D. de Grijuij, S. Gibbs, and M. Lindstedt. 2013. Transcriptional profiling of human dendritic cell populations and models—unique profiles of in vitro dendritic cells and implications on functionality and applicability. *PLoS One* 8: e52875.
- Chen, W., S. Antonenko, J. M. Sederstrom, X. Liang, A. S. Chan, H. Kanzler, B. Blom, B. R. Blazar, and Y. J. Liu. 2004. Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 103: 2547–2553.
- Proietto, A. I., D. Mittag, A. W. Roberts, N. Sprigg, and L. Wu. 2012. The equivalents of human blood and spleen dendritic cell subtypes can be generated in vitro from human CD34⁺ stem cells in the presence of fms-like tyrosine kinase 3 ligand and thrombopoietin. *Cell. Mol. Immunol.* 9: 446–454.
- Balan, S., V. P. Kale, and L. S. Limaye. 2010. A large number of mature and functional dendritic cells can be efficiently generated from umbilical cord blood-derived mononuclear cells by a simple two-step culture method. *Transfusion* 50: 2413–2423.
- Dutertre, C.-A., J.-P. Jourdain, M. Rancez, S. Amraoui, E. Fossum, B. Bogen, C. Sanchez, A. Couëdel-Courteille, Y. Richard, M. Dalod, et al. 2014. TLR-3 responsive, XCR1⁺, CD141(BDCA3)⁺/CD8 α ⁺-equivalent dendritic cells uncovered in healthy and SIV-infected rhesus macaques. *J. Immunol.* 192: 4697–4708.
- Irizarry, R. A., B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf, and T. P. Speed. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249–264.
- Theocharidis, A., S. van Dongen, A. J. Enright, and T. C. Freeman. 2009. Network visualization and analysis of gene expression data using BioLayout Express(3D). *Nat. Protoc.* 4: 1535–1550.
- Retière, C., V. Prod’homme, B. M. Imbert-Marcille, M. Bonneville, H. Vié, and M. M. Hallet. 2000. Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J. Virol.* 74: 3948–3952.
- Segura, E., M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiochia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, and S. Amigorena. 2013. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 38: 336–348.
- Naik, S. H., A. I. Proietto, N. S. Wilson, A. Dakic, P. Schnorrer, M. Fuchsberger, M. H. Lahoud, M. O’Keeffe, Q. X. Shao, W. F. Chen, et al. 2005. Cutting edge: generation of splenic CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J. Immunol.* 174: 6592–6597.

42. Chu, C. C., N. Ali, P. Karagiannis, P. Di Meglio, A. Skowera, L. Napolitano, G. Barinaga, K. Grysb, E. Sharif-Paghaleh, S. N. Karagiannis, et al. 2012. Resident CD141 (BDCA3)⁺ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J. Exp. Med.* 209: 935–945.
43. Sancho, D., O. P. Joffre, A. M. Keller, N. C. Rogers, D. Martínez, P. Hernandez-Falcón, I. Rosewell, and C. Reis e Sousa. 2009. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458: 899–903.
44. Takeuchi, A., Y. Itoh, A. Takumi, C. Ishihara, N. Arase, T. Yokosuka, H. Koseki, S. Yamasaki, Y. Takai, J. Miyoshi, et al. 2009. CRTAM confers late-stage activation of CD8⁺ T cells to regulate retention within lymph node. *J. Immunol.* 183: 4220–4228.
45. Wang, B., N. Zaidi, L. Z. He, L. Zhang, J. M. Kuroiwa, T. Keler, and R. M. Steinman. 2012. Targeting of the non-mutated tumor antigen HER2/neu to mature dendritic cells induces an integrated immune response that protects against breast cancer in mice. *Breast Cancer Res.* 14: R39.
46. Do, Y., A. M. Didierlaurent, S. Ryu, H. Koh, C. G. Park, S. Park, D. S. Perlin, B. S. Powell, and R. M. Steinman. 2012. Induction of pulmonary mucosal immune responses with a protein vaccine targeted to the DEC-205/CD205 receptor. *Vaccine* 30: 6359–6367.
47. Meixlsperger, S., C. S. Leung, P. C. Rämmer, M. Pack, L. D. Vanoaica, G. Breton, S. Pascolo, A. M. Salazar, A. Dzionek, J. Schmitz, et al. 2013. CD141⁺ dendritic cells produce prominent amounts of IFN- α after dsRNA recognition and can be targeted via DEC-205 in humanized mice. *Blood* 121: 5034–5044.
48. Park, H., L. Adamson, T. Ha, K. Mullen, S. I. Hagen, A. Nogueron, A. W. Sylwester, M. K. Axthelm, A. Legasse, M. Piatak, Jr., et al. 2013. Polyinosinic-polycytidylic acid is the most effective TLR adjuvant for SIV Gag protein-induced T cell responses in nonhuman primates. *J. Immunol.* 190: 4103–4115.
49. Tewari, K., B. J. Flynn, S. B. Boscardin, K. Kastenmueller, A. M. Salazar, C. A. Anderson, V. Soundarapandian, A. Ahumada, T. Keler, S. L. Hoffman, et al. 2010. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4⁺ T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) and α DEC-CSP in non human primates. *Vaccine* 28: 7256–7266.
50. Stahl-Hennig, C., M. Eisenblätter, E. Jasny, T. Rzehak, K. Tenner-Racz, C. Trumpfheller, A. M. Salazar, K. Uberla, K. Nieto, J. Kleinschmidt, et al. 2009. Synthetic double-stranded RNAs are adjuvants for the induction of T helper 1 and humoral immune responses to human papillomavirus in rhesus macaques. *PLoS Pathog.* 5: e1000373.
51. Duffy, D., V. Rouilly, V. Libri, M. Hasan, B. Beitz, M. David, A. Urrutia, A. Bisiaux, S. T. Labrie, A. Dubois, et al. 2014. Functional analysis via standardized whole-blood stimulation systems defines the boundaries of a healthy immune response to complex stimuli. *Immunity* 40: 436–450.
52. Manh, T. P., Y. Alexandre, T. Baranek, K. Crozat, and M. Dalod. 2013. Plasmacytoid, conventional, and monocyte-derived dendritic cells undergo a profound and convergent genetic reprogramming during their maturation. *Eur. J. Immunol.* 43: 1706–1715.

Au cours de ma thèse, j'ai finalement contribué à une étude dont le but était de caractériser le rôle des cellules NK dans l'induction de la présentation croisée d'Ag par les DC (Deauvieu et al., 2015). Des travaux antérieurs avaient montré que les cellules NK induisent la surexpression des molécules de co-stimulation à la surface des DC, favorisent leur production d'IL-12 et la polarisation Th1 des lymphocytes T CD4⁺ et augmentent leur capacité de stimulation des CTL. Néanmoins, l'induction d'une telle immunité requiert, en amont, la capture, l'apprêtement et la présentation des Ag aux lymphocytes T CD8⁺ par les DC *via* le processus de présentation croisée. Le rôle des cellules NK dans ce contexte n'ayant pas été étudiée, notre équipe a mis en place un modèle cellulaire permettant d'évaluer la présentation croisée, par les MoDC et par les DC BDCA3^{high}, d'un Ag exprimé par une cible tumorale comme illustré sur le schéma ci-dessous.



A l'aide de ce modèle, nous avons mis en évidence la capacité des cellules NK humaines à induire la présentation croisée, par les MoDC, d'un Ag exprimé par une cible tumorale. L'activation des cellules NK par leur cible est suffisante pour induire une réponse significative même si une pré-activation des cellules NK avec de l'IL-2 ou de l'IL-12 exogène augmente considérablement leur efficacité. De plus, nous avons montré que la fonction lytique des cellules NK n'est pas nécessaire à la capture et à la présentation croisée d'Ag, tandis que la production d'IFN- γ et de TNF α est indispensable. En outre, le mécanisme d'ADCC permet d'amplifier la présentation croisée d'Ag lorsque la reconnaissance naturelle des cibles par les cellules NK n'est pas suffisante. Enfin, nous avons montré que l'induction de la présentation croisée d'Ag par l'IFN- γ et le TNF α s'appliquait également aux DC BDCA3^{high}.

Ainsi, nous avons identifié une nouvelle fonction des cellules NK qui pourrait être capitale dans l'induction des réponses CTL anti-tumorale chez l'homme.

Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells

Florence Deauvieau^{1,2,3,4,5}, Vincent Ollion^{1,2,3,4,5,6}, Anne-Claire Doffin^{1,2,3,4,5}, Carole Achard⁷, Jean-François Fonteneau⁷, Estelle Verronese^{1,2,3,4,5}, Isabelle Durand^{1,2,3,4,5}, Raffaella Ghittoni⁸, Jacqueline Marvel⁸, Colette Dezutter-Dambuyant^{1,2,3,4,5}, Thierry Walzer⁸, Henri Vie⁷, Ivan Perrot⁹, Nadège Goutagny^{1,2,3,4,5,6}, Christophe Caux^{1,2,3,4,5,6*} and Jenny Valladeau-Guilemond^{1,2,3,4,5,6*}

¹Inserm UMR-S1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

²CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

³UNIV UMR1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

⁴Université de Lyon, Lyon, France

⁵Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁶LabEx DEVweCAN, Lyon, France

⁷INSERM U892, CNRS UMR6299, Université de Nantes, Nantes, France

⁸IFR128, INSERM U851, Université de Lyon, Lyon, France

⁹Innate Pharma, Marseille, France

Dendritic cells (DCs) cross-present antigen (Ag) to initiate T-cell immunity against most infections and tumors. Natural killer (NK) cells are innate cytolytic lymphocytes that have emerged as key modulators of multiple DC functions. Here, we show that human NK cells promote cross-presentation of tumor cell-derived Ag by DC leading to Ag-specific CD8⁺ T-cell activation. Surprisingly, cytotoxic function of NK cells was not required. Instead, we highlight a critical and nonredundant role for IFN- γ and TNF- α production by NK cells to enhance cross-presentation by DC using two different Ag models. Importantly, we observed that NK cells promote cell-associated Ag cross-presentation selectively by monocytes-derived DC (Mo-DC) and CD34-derived CD11b^{neg}CD141^{high} DC subsets but not by myeloid CD11b⁺ DC. Moreover, we demonstrate that triggering NK cell activation by monoclonal antibodies (mAbs)-coated tumor cells leads to efficient DC cross-presentation, supporting the concept that NK cells can contribute to therapeutic mAbs efficiency by inducing downstream adaptive immunity. Taken together, our findings point toward a novel role of human NK cells bridging innate and adaptive immunity through selective induction of cell-associated Ag cross-presentation by CD141^{high} DC, a process that could be exploited to better harness Ag-specific cellular immunity in immunotherapy.

Dendritic cells (DCs) are endowed with the unique ability to present exogenous Ag on MHC class I molecules to activate cytotoxic T cells (CTLs) by a mechanism known as cross-

Key words: cross-presentation, dendritic cell, NK cell, mAb therapy
Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Conflict of interest: Nothing to report

*C.C. and J.V.-G. contributed equally to this work

Grant sponsor: Institut National du Cancer; **Grant number:** INCA 2011-155; **Grant sponsors:** Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, France), Ligue contre le Cancer (Comité de la Savoie, France), Lyon Biopole (France), ARC (France), the European CHILDRHOPE Project and the Labex DEVWECAN

DOI: 10.1002/ijc.29087

History: Received 8 Oct 2013; Accepted 18 June 2014; Online 21 July 2014

Correspondence to: Dr Jenny Valladeau-Guilemond, Cancer Research Center of Lyon, Cheney D - Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France, Tel.: +33-4-78-78-29-64, Fax: +33-4-78-78-27-20, E-mail: jenny.valladeau-guilemond@lyon.unicancer.fr

presentation. This pathway allows DC to induce specific cellular immunity against intracellular pathogens and tumors that do not directly affect DC.¹ Several types of exogenous Ag have been reported to be cross-presented including soluble Ag, immune complexes, Ag associated with chaperones or beads and cell-associated Ag from apoptotic, necrotic and autophagic cells.² Human monocyte-derived DCs (Mo-DC) also acquire Ag from live cells by a mechanism named “nibbling” and process them for subsequent cross-presentation.^{3,4} This pathway leads to an efficient protective antitumor response *in vivo*.^{4,5} Moreover, protective antitumor immunity can be induced in mice by specifically targeting the CD8 α ⁺ DC subset,⁶ which displays a unique ability to cross-present exogenous Ag and activate CD8⁺ T cells.⁷ In this context, many groups have shown that human CD141^{high} DCs, the equivalent of mouse CD8 α ⁺ DC, have a higher capacity for cross-presentation compared to other DC subsets.^{8–12} Nevertheless, the superior cross-presenting capacity of CD141^{high} DC is a matter of debate and may instead rely on the endocytic compartment reached by the Ag and on the Ag form as very recently proposed.^{13,14} Indeed, CD141⁺ DC cross-present cell-derived Ag more efficiently, whereas soluble

What's new?

Dendritic cells (DCs) can activate an immune response by 'presenting' specific antigens on their surface. In this study, the authors found that when tumor cells are coated with therapeutic antibodies (mAbs), natural killer (NK) cells are activated to trigger the presentation of tumor antigens by special subsets of DCs. They also found that IFN- γ and TNF- α are crucial to this process. These results support the concept that NK cells can contribute to the efficacy of therapeutic mAbs by inducing anti-tumor adaptive immunity.

Ag may be cross-presented with the same efficacy by BDCA1⁺ CD11b⁺ DC or by CD141^{high} DC.^{13,14}

Natural killer (NK) cells are innate cytotoxic lymphocytes known for their ability to kill infected or tumor cells and produce antiviral/tumoral and "helper" cytokines. Increasing evidence indicates that upon interaction with DC, NK cells may also critically contribute to the shaping of adaptive immunity. Indeed, *in vitro* interactions between human DC and NK cells result in reciprocal activation.^{15,16} DC-derived cytokines such as interleukin (IL)-12 or type I interferon (IFN) strongly enhance IFN- γ production and cytolytic activity of NK cells.¹⁷ Once activated, NK cells promote DC maturation and IL-12 production^{15,18} providing critical "help" for Th1 polarization and CD8⁺ T-cell priming.^{16,19–21} We hypothesized that, upon recognition of tumor target cells, NK cells may also contribute to initiate the antitumor CTL response by favoring Ag capture and/or processing by DC leading to cross-presentation to specific CD8⁺ T cells. In our study, we show that human NK cells trigger efficient cross-presentation of tumor cell-derived Ag by Mo-DC. Unexpectedly, this function does not require cytolytic activity of NK cells but is critically dependent on their production of both IFN- γ and TNF- α . Importantly, we demonstrate that NK cells are also able to promote cell-associated Ag cross-presentation selectively by the CD11b^{neg}CD141^{high} DC subset in contrast to myeloid BDCA1⁺ CD11b⁺ DC generated from CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSCs) highlighting a previously unknown specific cross-talk between NK cells and the human cross-presenting DC subset. Finally, we also demonstrate that NK cell activation through therapeutic monoclonal antibodies (mAbs)-coated tumors results in efficient cross-presentation to CD8⁺ T cells. Our data thus define a new NK cell function specifically regulating cell-associated Ag cross-presentation by CD141^{high} DC that could be targeted in immunotherapy to generate polyspecific T-cell immunity.

Material and Methods**Flow cytometry and antibodies**

Following staining with monoclonal Abs recognizing human CD3, CD56, CD11b (Beckman Coulter, Marseille, France), CD141 (Miltenyi Biotec, Paris, France), DC-SIGN, mannose receptor and IFN- γ (Becton Dickinson, Le pont de Claix, France) and dead cell exclusion using propidium iodide (Invitrogen, Saint Aubin, France) or DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (Molecular Probes, Lifetechnologies, Saint Aubin, France), analyses were performed on the DAKO Cytomation Cyan and FlowJo software (Tree Star, OR, USA).

Human cell lines and DC differentiation

Complete medium consisted of RPMI 1640 glutamax with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), penicillin-streptomycin and gentamycin (Life technologies). We used lentiviral-based vectors to generate the K562 cell line (ATCC) expressing the N9V epitope of the CMV pp65 fused in frame at the 5' end to cytoplasmic OVA (see Supporting Information Materials). The KHYG1 NK cell line (provided by Masato Yagita, Japan) was stably transduced with either an irrelevant shRNA or shRNA against UNC13D (Sigma Aldrich, Lyon, France) and cultured in complete media supplemented with IL-2 (450 U/ml, Chiron, CA, USA) and puromycin (2 μ g/ml, Invivogen, Toulouse, France) to sustain shRNA expression. Immature DCs (iDCs) were generated from monocytes as described in Supplementary Materials and mature DCs (mDCs) were obtained by exposing cells to 500 ng/ml of LPS (Invivogen) for 24 hr. In some experiments, Mo-DCs were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) before co-culture. CD34⁺-derived DCs were obtained as previously described by Poulin *et al.*¹² The CD141^{high}/CD11b⁻ (referred to as "CD141^{high} DC") and the CD141^{low}/CD11b⁺/BDCA1⁺ DC subset (referred to as "CD11b⁺ DC") were cell sorted with a BD FACSAria III SORP (purity > 95%) and used in similar conditions to Mo-DC.

NK cell isolation and culture

NK cells were negatively isolated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (EFS) using the NK cell isolation kit (Miltenyi Biotec, CD56⁺CD3⁻ cells, 96.7% \pm 1.7%). NK cells were cultured in complete medium or with 1,000 U/ml of IL-2 or 50 ng/ml of IL-12 (Peprotech) for 18 hr. In some experiments, resting and activated NK cells were treated for 1 hr at 37°C with 50 μ g/ml of chloroquin (Sigma-Aldrich).

Cross-presentation assays

A total of 10⁵ K562 cells expressing the N9V epitope and 0.5 \times 10⁵ DCs were co-cultured with indicated numbers of NK cells (NK:DC ratio from 0:1 to 5:1) for 24–36 hr. When indicated, mixed cultures were exposed to 10 μ g/ml of neutralizing mAbs against TNF- α , IFN- γ or isotype control (R&D Systems, Lille, France). In some experiments, recombinant TNF- α (Cetus Corporation, CA, USA) or IFN- γ (Peprotech, NJ, USA), Poly I:C (HMW, 5 μ g/ml), lipopolysaccharide (LPS) (500 ng/ml) or R848 (5 μ g/ml) (all from Invivogen)

were added 12 hr after the start of DC-K562 co-culture. As a positive control, 10 nM of soluble pp65^{493–503} peptide was added for 1 hr in mixed cultures before extensive washes. A pp65^{493–503}-specific T-cell clone (0.5×10^5 cells per well)²² was then added in the presence of GolgiSTOP (Becton Dickinson) for an additional 12 hr. After fixation and permeabilization, intracellular expression of IFN- γ in T cells was monitored by flow cytometry using an anti-CD3. T-cell activation was determined as the percentage of IFN- γ -expressing cells within CD3⁺GFP⁻-gated cells. K562 killing was evaluated in similar NK/DC/K562 co-cultures: K562 cells were labeled with PKH67 (Sigma-Aldrich) and PI incorporation was analyzed by flow cytometry. For sequential cross-presentation assays, DC sorting was performed using CD1a microbeads (Miltenyi).

For cross-presentation of endogenous tumor-derived antigen, NYESO-1pos/HLA-A*0201neg melanoma cell lines M18 were Schwarz measles virus (MV)-infected (MOI = 1) or UV-B irradiated and cultured for 72 hr. They were then co-cultured with HLA-A*0201pos Mo-DC (DC:tumor cell ratio 1:1). After 18 hr, Mo-DCs were washed and co-cultured with the HLA-A*0201/NYESO-1(157–165)-specific CD8⁺ T-cell clone M117.167²³ (ratio 1:1) for 5 hr with Brefeldin-A (Sigma Aldrich). Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized and stained with anti-IFN- γ - and CD8-specific antibodies (BD Biosciences) as described²³; IFN- γ production was analyzed by flow cytometry using a CD8⁺ T-cell gate.

Transwell experiments

IL-2-preactivated blood NK cells and target cells (E:T ratio of 2.5:1) were co-cultured in the upper compartment of a 0.4- μ M pore-size Transwell system (Costar, Sigma-Aldrich) where K562_N9V and DC were cultured in the bottom compartment (K562:Mo-DC ratio of 2:1) for 24 hr. Anti-CD20 Rituximab[®] and anti-HER2 Trastuzumab[®] were used at 10 μ g/ml. Cells contained in the bottom compartment were transferred to 96-well plates for further co-culture with N9V-specific T-cell clone as described above. Supernatants were collected for IFN- γ and TNF- α quantification by ELISA (BenderMedsystems, eBioScience, Paris, France).

Ag uptake analysis

A total of 1×10^5 PKH67-labeled K562 cells were co-cultured in round-bottomed 96-well plates with 0.5×10^5 DC in the presence or absence of activated NK cells at a K562:DC 2:1 ratio, as for cross-presentation assays. After 18–24 hr of culture, Mo-DC uptake was evaluated by flow cytometry or by confocal microscopy. Flow cytometry quantification and confocal microscopy were performed as described in Supporting Information Materials.

Statistics

Significances were determined using one-way ANOVA with Bonferroni's post-test or a Mann-Whitney test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Results

Human primary NK cells efficiently promote cross-presentation of tumor cell-derived antigen by iDC

To investigate the potential capacity of human NK cells to promote Ag cross-presentation by DC, we introduced the HLA-A2-restricted pp65^{495–503} N9V epitope of the human CMV virus into the chicken ovalbumin (OVA) as a surrogate Ag into the NK-target K562 cell line (HLA-A2-, named K562_N9V, Supporting Information Fig. S1A). When this construct was introduced into the HLA-A2⁺ MCF7 cell line, co-culture with N9V-specific CD8⁺ T cells led to T-cell activation, confirming endogenous processing and presentation of the fusion protein (Supporting Information Fig. S1B). K562_N9V were then co-cultured with immature Mo-DC in the presence of increasing numbers of NK cells. Cross-presentation by DC was subsequently assessed by adding N9V-specific CD8⁺ T-cell clones into co-cultures and by monitoring their intracytoplasmic IFN- γ production (Fig. 1a). IL-2-preactivated NK cells dramatically enhanced IFN- γ production by N9V-specific T cells (Fig. 1b). Lytic degranulation, monitored by CD107a staining on T cells, was similarly increased (data not shown). By contrast, no T-cell responses were observed using K562 cells lacking the N9V epitope (K562_GFP), HLA-A2⁻ DC and fixed or mature HLA-A2⁺ DC (Fig. 1b and Supporting Information Fig. S1C), indicating that T-cell activation occurred *via* HLA-A2-restricted N9V cross-presentation by live iDC. Only the highest dose of resting NK cells led to a substantial T-cell response, whereas a low number of IL-2-preactivated NK cells was sufficient to induce DC cross-presentation. Of note, addition of high numbers of activated NK cells into mixed cultures completely abrogated T-cell activation (Fig. 1c). Autologous and allogenic NK/DC displayed comparable responses (Supporting Information Fig. S1D). NK cells have been previously shown to be able to kill DC at high NK:DC ratios,¹⁸ which has also been observed in activated CD8⁺ T cells.²⁴ Nevertheless, neither DC nor T-cell mortality was observed in our cultures (data not shown). Impaired Ag cross-presentation may be due to strong K562 killing (Fig. 1d), resulting in epitope degradation in these experimental conditions. Indeed, we observed by Western blot the complete loss of cellular OVA containing the N9V epitope (Supporting Information Fig. S2A). This is consistent with previous studies demonstrating epitope degradation during apoptosis.^{25,26} Finally, NK cells exposed to the innate DC cytokine IL-12 were as efficient as NK-IL2 at inducing Ag cross-presentation by DC (Fig. 1e). Altogether, these findings highlight a novel role for DC/NK cell cross-talk, bridging innate and adaptive immunity.

DC cross-presenting function requires NK cells during Ag uptake but does not depend on target cell killing

To identify NK cell effector functions required to induce tumor Ag cross-presentation by DC, we first inhibited lytic

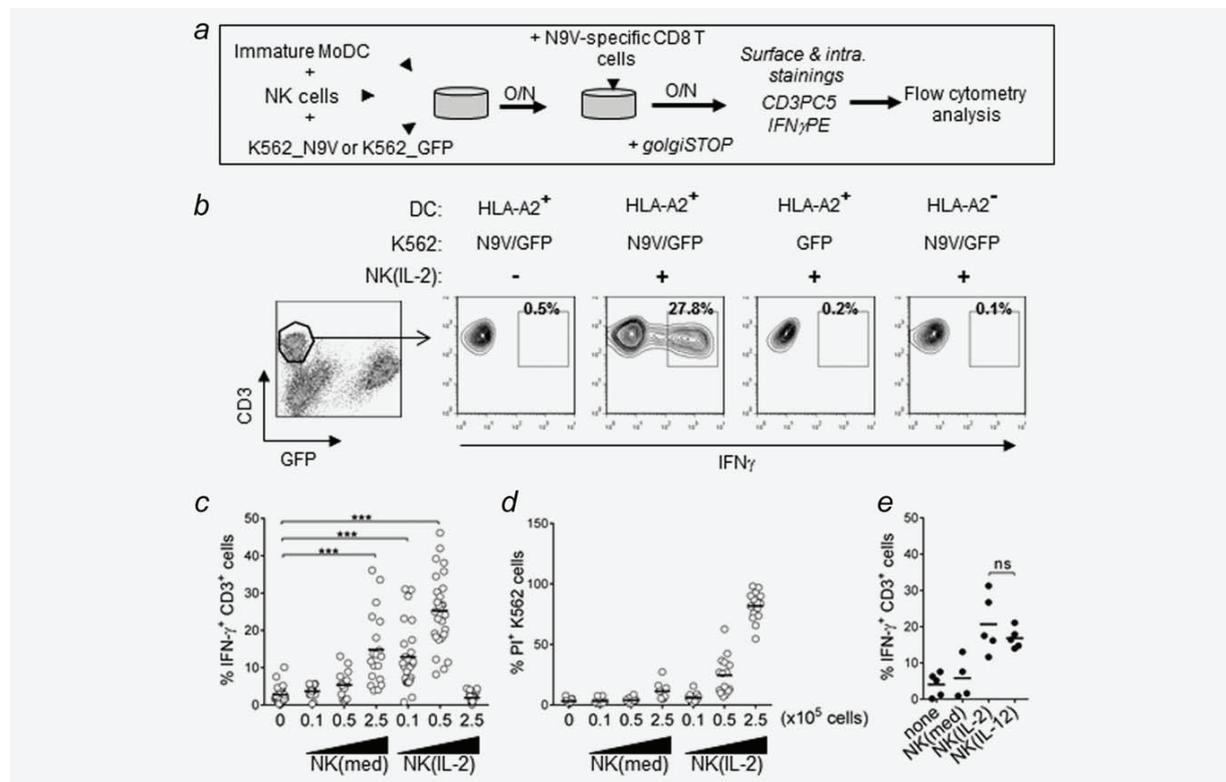


Figure 1. NK cells promote tumor cell-derived Ag cross-presentation by DC. (a) IL-2-activated NK cells [NK(IL-2)] were co-cultured for 24 hr with K562_N9V cells and DC. N9V-specific CD8⁺ T cells were then added and their activation was monitored by flow cytometry as illustrated. (b) One representative out of >12 independent experiments is shown using 1:1 NK:DC ratio. Negative controls included HLA-A2 negative DC (0.5% \pm 0.3% of IFN- γ ⁺CD3⁺) and K562 cells infected with a lentivirus encoding GFP alone (1.1% \pm 0.7% of IFN- γ ⁺CD3⁺). (c and e) NK cells exposed to medium [NK(med)] or preactivated with indicated recombinant cytokines [NK(IL-X)] were co-cultured at indicated number with K562_N9V (1 \times 10⁵ cells per well) expressing the HLA-A2-restricted N9V epitope (GFP⁺) and DC (0.5 \times 10⁵ cells per well) and cross-presentation was monitored as in (b). Values indicate the percentage of IFN- γ ⁺ cells among total CD3⁺ T cells. (d) K562 killing was measured by propidium iodide (PI) incorporation in PKH67-labeled K562 cells in corresponding NK/K562/DC co-cultures. (c, d and e) Each symbol represents an individual experiment and bars show the mean of all experiments.

granule exocytosis by transient treatment of preactivated NK cells with chloroquin. Treated NK cells, which failed to kill K562 cells, induced dramatic IFN- γ responses by CD8⁺ T cells, especially at high cellular ratios (Fig. 2a), probably owing to the prevention of epitope degradation (Supporting Information Fig. S2A). Direct effect of residual chloroquin on DC was excluded because the responses induced by resting NK cells, with low killing activity, were not modified by the treatment (Fig. 2b). We extended this analysis in the KHYG1 NK cell line, which also promotes DC cross-presentation (Fig. 2c), by knocking down the Munc 13-4 protein, a critical effector of granule exocytosis²⁷ by RNA silencing (Supporting Information Fig. S2B). Unc13D-deficient KHYG1, while failing to kill K562, displayed increased capacity to promote DC cross-presentation (Fig. 2c). These data demonstrate that NK-cell-mediated killing of target cells is not a prerequisite to induce Ag cross-presentation by DC in our model.

Thus, we asked whether NK cells induced or increased Ag uptake by DC using K562 stained with a fluorescent PKH dye. As shown in Figure 3a, DC could capture antigenic material from K562 cells in the absence of NK cells (Figs. 3a and 3b). This capture was abolished upon fixation (Fig. 3a) and only marginally increased in the presence of activated NK cells (Fig. 3c). These data showed that NK cells were not required for tumor Ag capture by DC, which is consistent with previous results showing that lysis of target cells was not a prerequisite for Ag cross-presentation. We thus wondered whether NK cells induced Ag cross-presentation by providing immunostimulatory signals to DCs that have already engulfed antigenic material from tumor cells. To this aim, DCs were first co-cultured with K562_N9V for 24 hr, cell sorted and then cultured with NK cells in the presence of K562 to ensure full NK cell activation (Fig. 3d). Interestingly, activated NK cells were unable to induce Ag cross-presentation in these conditions. T-cell activation was

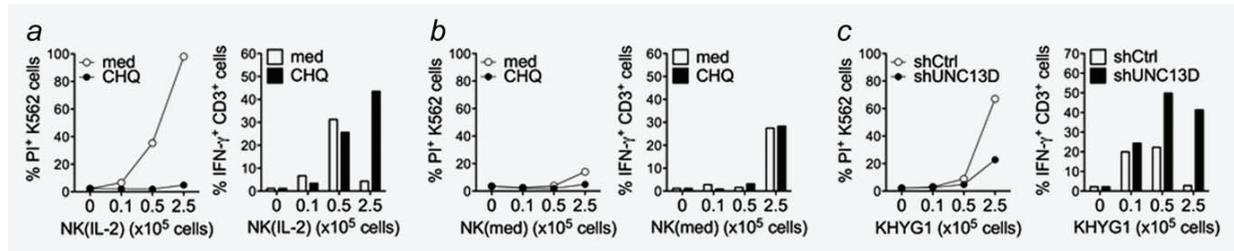


Figure 2. NK cells trigger Ag cross-presentation by DC independently of their capacity to kill target cells. NK cells deficient for lytic granule exocytosis were tested for their capacity to kill K562 cells (left) and to induce Ag cross-presentation by DC (right) as described in Figure 1. (a and b) IL-2-primed [NK(IL-2)] or resting [NK(med)] blood NK cells were treated with chloroquin (CHQ) before mixing of the cultures. (c) KHYG1 cell line expressing an irrelevant shRNA (shCtrl) or a shRNA against UNC13D gene. One representative experiment out of three is shown.

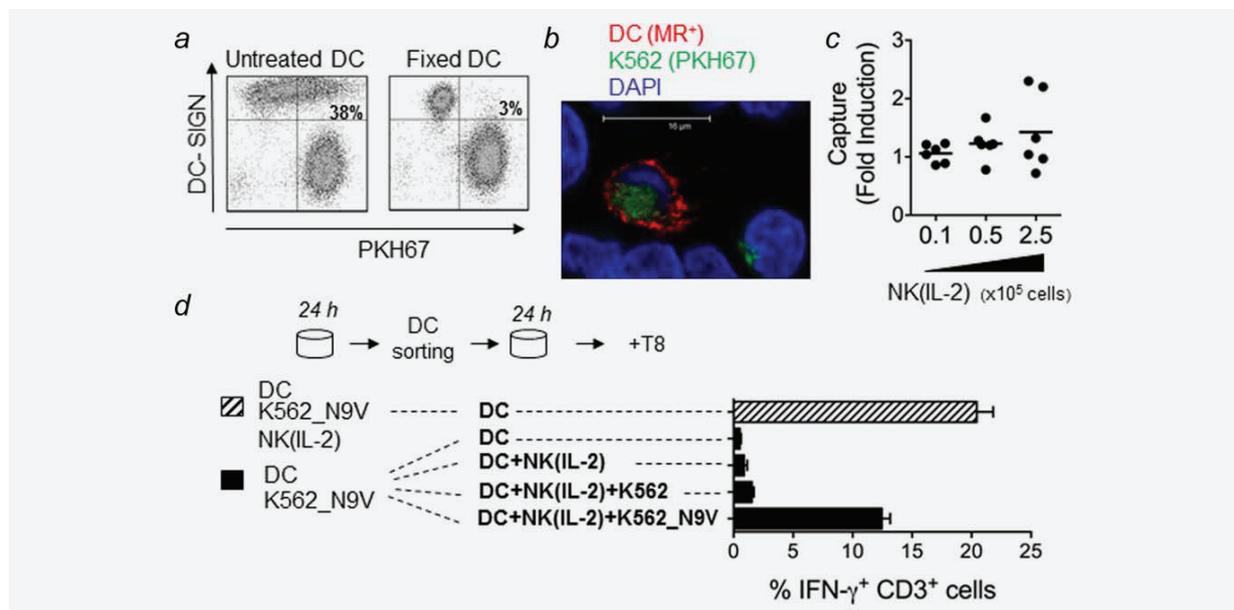


Figure 3. While cross-presentation required NK cells during early phase of Ag internalization, DCs capture K562 cellular material independently of NK cells. (a) Ag uptake of PKH67-labeled K562 in DC-SIGN-stained DC or fixed DC from one representative experiment out of 14 independent experiments. Values correspond to the percentage of viable DC PKH67+ within total viable DC. (b) Uptake of PKH67-labeled K562 cells (green) by mannose receptor-stained DC (red) analyzed by confocal microscopy (DAPI, blue). (c) Flow cytometry analysis of Ag uptake in the presence of indicated numbers of NK(IL-2), expressed as fold induction compared to DC/K562 alone. Each symbol represents an individual experiment and bars correspond to the mean of overall experiments. (d) Cross-presentation assays performed in sequential steps as illustrated. DC that had been co-cultured for 24 hr with K562_N9V alone at 1:2 DC:K562 ratio or in the presence of NK cells at 1:2:1 DC:K562:NK ratio were purified using CD1a microbeads and further cultured for 24 hr in medium or in the presence of indicated cells at similar ratios before adding T cells. Histograms show the mean of triplicate wells of culture \pm SD of one representative experiment out of three.

restored only when K562_N9V were added again concomitantly with NK cells. As a control, the same kinetic and sorting conditions were applied to DC that had captured Ag in the presence of IL-2-activated NK cells and displayed usual T-cell response. These data show that NK cells need to be present during Ag uptake for subsequent cross-presentation and suggest that NK cells play a critical role in the early steps of the cross-presentation process, possibly triggering a specific pathway of Ag capture and/or intracellular processing.

Both IFN- γ and TNF- α production play key roles in NK-cell-induced Ag cross-presentation

We then investigated the role of IFN- γ and TNF- α , both cytokines of major importance in NK/DC cross-talk.²⁸ Ag cross-presentation induced by IL-2-primed NK cells or KHYG1 cells was significantly diminished by either IFN- γ or TNF- α neutralization and completely abolished when both cytokines were blocked (Fig. 4a). iDC cross-presentation induced by resting NK cells was similarly

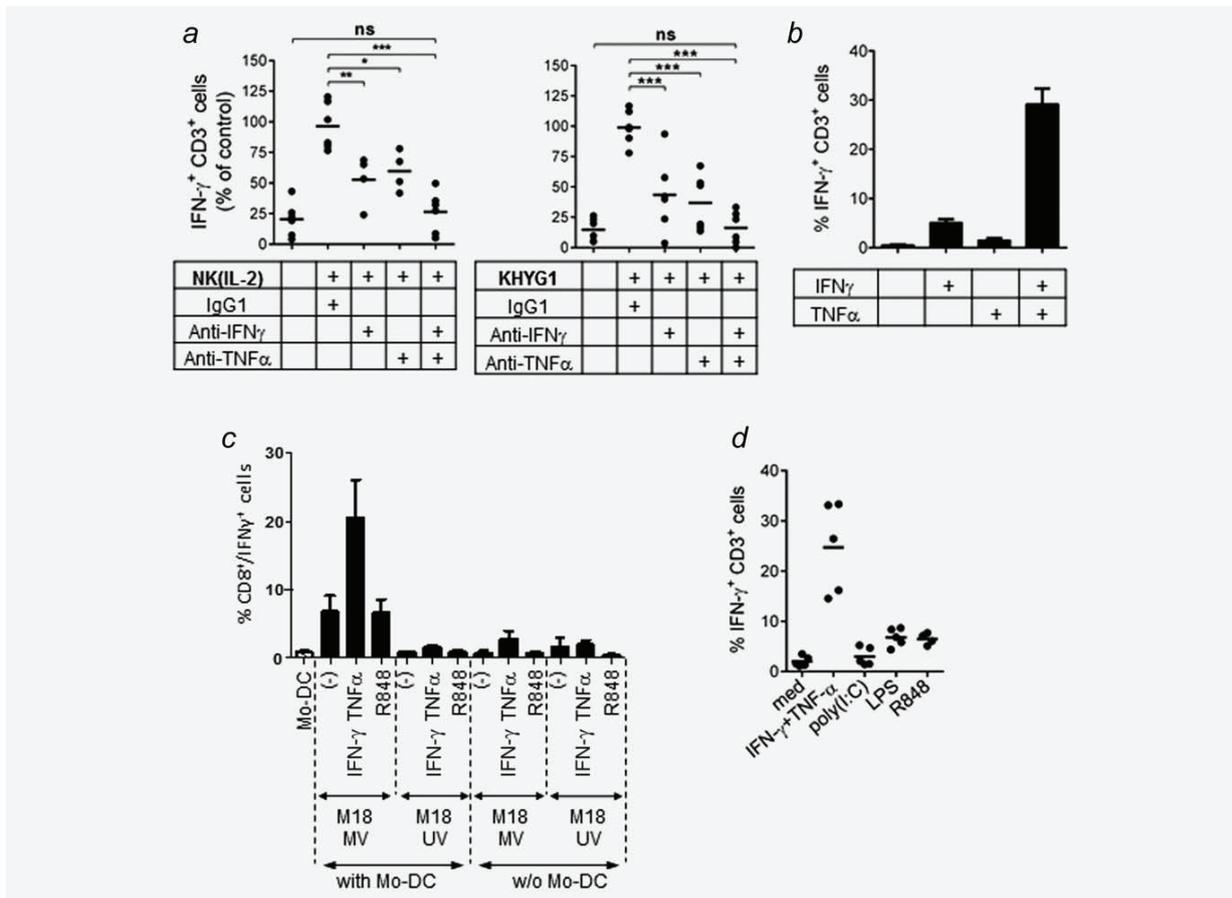


Figure 4. Both IFN γ and TNF α play key roles in NK-cell-induced Ag cross-presentation. (a) Cross-presentation assays were performed with or without neutralizing mAbs or isotype control. IFN- γ responses were normalized to 100% for NK cell conditions in the absence of any mAbs. (b) NK cells were replaced by recombinant IFN- γ , TNF- α or both or by indicated TLR ligands in cross-presentation assays (d). (c) Mo-DCs were cultured for 18 hr with UV-irradiated or MV-infected M18 tumor cells with or without R848, or a combination of IFN- γ /TNF- α . Mo-DCs were then co-cultured for 5 hr with the M117.167 CD8 $^+$ T-cell clone specific for HLA-A*0201/NYESO-1(157–165). IFN- γ production by the clone was measured by flow cytometry. (a, d) Each symbol represents an individual experiment and bars correspond to the mean of overall experiments. (b) Data represent means of triplicate wells of culture \pm SD of a representative experiment out of three. (c) Data represent means of three independent experiments.

inhibited (data not shown). Additionally, a combination of recombinant IFN- γ and TNF- α was sufficient to induce Ag cross-presentation by DC (Fig. 4b), even at low concentration (Supporting Information Fig. S3). Intracellular staining of GFP $^+$ tumor cells, DC-SIGN $^+$ DC or CD56 $^+$ NK revealed a specific IFN- γ and TNF- α production in NK cells in mixed cultures (Supporting Information Fig. S4). Collectively, these data highlight a nonredundant role for IFN- γ and TNF- α in NK-cell-induced Ag cross-presentation by DC. This was confirmed using another cross-presentation model of an endogenous tumor Ag naturally expressed in melanoma cells. Indeed, we used the HLA-A*0201 $^-$ M18 cell line that expresses NYESO-1. After cell death of M18 tumor cells induced by MV infection, this tumor endogenous antigen is cross-presented by DC to a HLA-A*0201/NYESO-1(157–165)-specific CD8 $^+$ T-cell clone M117.167²³

and not if cell death was induced by UV. In this model, this process is also highly enhanced by IFN- γ and TNF- α , further highlighting the important role of NK-derived cytokines in cross-presentation (Fig. 4c).

Finally, as IFN- γ and TNF- α are known for their effect on DC activation, we examined whether TLR ligands [poly(I:C), LPS and R848] that induced phenotypic and functional DC maturation could mimic NK cell effect. Despite leading to strong DC activation as previously demonstrated, none of the tested TLR ligands was able to induce Ag cross-presentation similarly to exogenous IFN- γ and TNF- α (Fig. 4d), highlighting a specific impact of NK-cell-derived products. These results define a novel function of NK-cell-derived cytokines that likely contribute to induce specific CD8 $^+$ T-cell immunity by promoting cell-associated Ag cross-presentation.

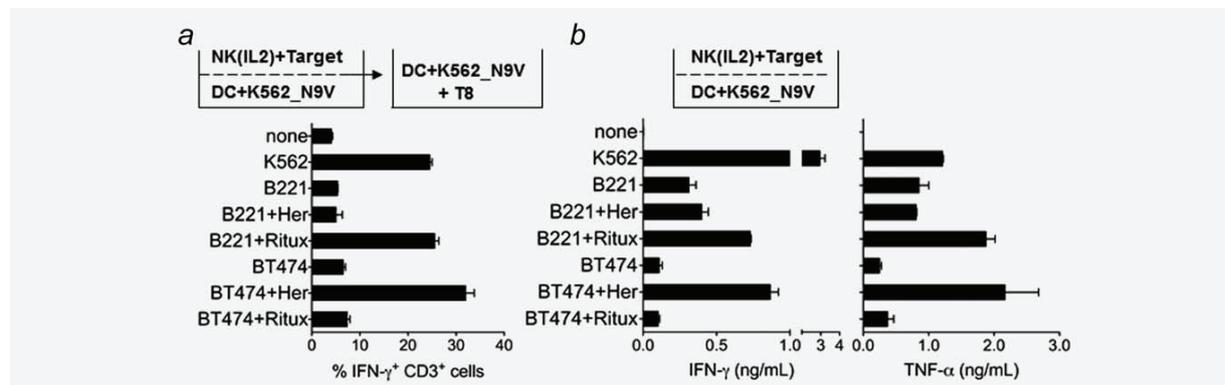


Figure 5. NK cell activation by therapeutic mAb-coated tumor cells induces Ag cross-presentation by DC. (a and b) IL-2-preactivated NK cells and the indicated target cells were added to the upper compartment of a transwell system where DC and K562_N9V were cultured in the bottom compartment. The experiments were performed with or without Rituximab® (Ritux) or Herceptin® (Her). N9V-specific T-cell clone activation was assessed using cells contained in the bottom compartment. (b) Supernatants were collected before co-culture with T cells for cytokine quantification by ELISA. Data represent means of triplicate wells of culture ± SD of one representative experiment out of three.

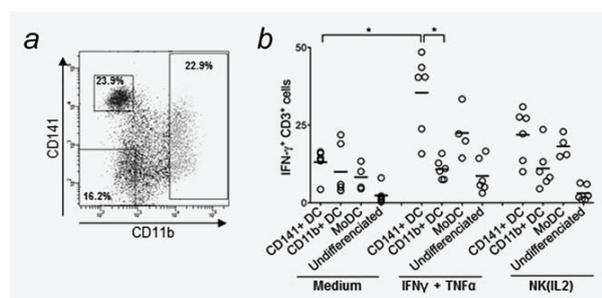


Figure 6. NK cells promote tumor cell-derived Ag cross-presentation by CD141^{high} DC. (a) CD34-derived DCs were cell-sorted based on CD11b and CD141 staining. Undifferentiated cells expressing neither CD11b nor CD141⁺ were also cell-sorted. (b) Cross-presentation of Mo-DC and purified CD34-derived CD141^{high} and CD11b⁺ DC subsets was analyzed as described in Figure 1 [with IL-2-preactivated NK cells; NK(IL-2)] (NK:DC ratio of 0.2:1) or IFN-γ and TNF-α. Negative controls included HLA-A2 negative Mo-DC and GFP-K562 cells. Each symbol represents an individual experiment and bars show the mean of all experiments.

NK cell activation by therapeutic mAb-coated tumor cells induces Ag cross-presentation by DC

As NK cells are known to produce large amounts of cytokines upon recognition of mAb-coated target cells, we then determined whether soluble factors produced by activated NK cells could also induce efficient Ag cross-presentation by DC. To this end, we set up a transwell system where NK cells and various target cells were co-cultured in the upper compartment being separated from DC and K562_N9V by a 0.4-μm pore-size membrane. Thus, soluble factors released by NK activated through antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in the upper compartment will act on DC in contact with K562_N9V in the lower compartment. CD8⁺ T cells were subsequently added to the lower compart-

ment to measure N9V cross-presentation. We used as NK cell targets, the EBV-transformed CD20⁺ LCL721.221 and breast carcinoma HER2⁺ BT474 cell lines, treated or not with anti-CD20 Rituximab® or anti-HER2 Trastuzumab®, respectively. Although soluble factors produced upon “natural” recognition of these two cell lines by IL-2-activated NK cells were not sufficient to induce Ag cross-presentation by DC, those produced in the presence of appropriate targeting mAbs were highly efficient (Figs. 5a and 5b). These data reveal that human therapeutic mAbs may not only lead to direct antitumor effect but also to the development of polyspecific antitumor T-cell immunity through NK-cell-induced DC cross-presentation.

NK cells promote Ag cross-presentation by CD141^{high} DC

Functionally distinct DC subsets have been previously described. The superior ability of human CD141^{high} DC to cross-present Ag compared to the CD11b⁺/BDCA1⁺ DC subset has been reported,^{9,11,12} but was recently challenged. As CD141^{high} DCs are very rare in human blood, we generated them from CD34⁺ HSC as previously described.¹² The CD11b⁺/BDCA1⁺ and CD141^{high}/CD11b⁻ DC subsets as well as undifferentiated cells were FACS-sorted (detailed in Supporting Information Materials and Fig. 6a) and used in cross-presentation assays in the presence of NK cells [ratio NK:DC (0.2:1)] or exogenous IFN-γ and TNF-α. Interestingly, we observed that NK cells specifically enhance tumor cell-associated Ag cross-presentation by CD11b⁻CD141^{high} DC. Moreover, this DC subset was highly responsive to IFN-γ and TNF-α at an even higher magnitude than Mo-DC. In contrast, neither NK cells nor exogenous cytokines could promote efficient cross-presentation by the myeloid CD11b⁺ DC subset or undifferentiated cells (Fig. 6b). These results highlight a previously unknown cross-talk between NK cells and CD141^{high} DC for inducing tumor cell-derived Ag cross-presentation.

Discussion

Antigen cross-presentation is a specific DC function required to elicit CTL responses against tumors and intracellular pathogens. Besides their innate cytolytic function, NK cells have been described as regulators of multiple DC functions, including DC costimulatory function and IL-12 production, both properties required for T-cell priming and Th1 polarization. In our study, we show for the first time that human NK cells also promote cross-presentation of tumor cell-derived Ag by DC resulting in specific CD8⁺ T-cell activation. Moreover, we demonstrate a key role for both TNF- α and IFN- γ production by NK cells in inducing DC cross-presentation. Of importance, our results further highlight a preferential cross-talk between NK cells and CD141^{high} DC for inducing tumor cell-derived Ag cross-presentation.

Unexpectedly, lytic activity of NK cells was not required for DC cross-presentation showing that NK-cell-mediated killing of tumor cells was not a prerequisite for their engulfment by DC. Indeed, we found that DC could capture cellular material from K562 cells independently of the presence of NK cells. NK cells may thus help DC cross-presentation of Ag internalized by DC from natural cellular debris or live cells. DC cross-presentation of Ag derived from live infected or tumor cells has been previously described *in vitro*.^{3,4} This process may be critical in the initiation of T-cell responses to noncytotoxic viruses and was recently shown to induce protective antitumor immunity *in vivo*.²⁹

Our work suggests that this mechanism is induced following specific recognition of tumor cells by NK cells. Importantly, we demonstrate that the production of IFN- γ and TNF- α by NK cells is critical to induce or increase DC cross-presentation to CD8⁺ T cells. Furthermore, we confirm in another model, the impact of those NK-derived cytokines in regulating cross-presentation. In this endogenous NYESO-1 cross-presentation model, the signal provided by the virus itself or the particular cell death pathway induced by infection is also critical for cross-presentation as previously discussed by Guillerme *et al.*²³ Indeed, cross-presentation was not observed when UV-irradiated tumor cells were used. Because the M18 cell line is not a natural NK target, we could not examine the direct impact of NK on promoting cross-presentation. However, the strong effects of the NK cytokines extend the concept that NK cells play a role in regulating cross-presentation. DCs stimulated with activated NK cells or recombinant IFN- γ and TNF- α exhibited a mature phenotype and enhanced cell surface expression of MHC class I molecules (data not shown). Nevertheless, TLR ligands, which also induced DC maturation, could not substitute NK cells for inducing Ag cross-presentation showing that the impact of NK cells is specific and not limited to upregulation of cell surface molecules on DC. Additionally, NK cells were inefficient at inducing cross-presentation when applied to DCs that have already internalized Ag demonstrating that NK cells are required during the early steps of intracellular Ag

processing. Furthermore, IFN- γ is known to increase immunoproteasome activity by inducing the neosynthesis of various immunoproteasome subunits and regulators as well as upregulation of transporters associated with antigen processing (TAP1/TAP2).³⁰ Nevertheless, it has been shown that the IFN- γ -inducible antigen processing machinery is not sufficient on its own to induce robust Ag cross-presentation by DC, as in our model where both IFN- γ and TNF- α are required. Although NK cells did not significantly impact the level of Ag capture by DC, they may promote a specific pathway of Ag capture and/or delivery suitable for downstream cross-presentation. It has been reported that IFN- γ promotes the formation of gap junctions by increasing connexin 43 expression in melanoma cells³¹ or the release of K562 exosomes,³² both mechanisms of Ag transfer from live cells to DC leading to T-cell cross-priming.^{31,33} Molecular processes triggered by IFN- γ and TNF- α in Ag cross-presentation need to be further investigated as well as the potential contribution of other NK-cell-derived signals, such as the release of HMGB1 or direct cellular interaction through Nkp30 or the MICA-NKG2D axis, both implicated in DC maturation by NK cells.^{16,34,35}

Here, we observed that NK cells (or IFN- γ and TNF- α) induced cell-derived Ag cross-presentation selectively in CD11b^{neg}CD141^{high} DC and in Mo-DC and not in CD11b⁺ DC. The superior ability for cross-presentation of different human DC subsets, such as CD141^{high} DC, is still a matter of debate and may rely on the Ag form and the intracellular compartment reached by the Ag through endocytic receptors.^{13,14,36} Indeed, if Ag is targeted to early endocytic compartments, CD11b⁺/BDCA1⁺ DCs are equivalent to CD141^{high} DC.¹³ Nevertheless, naturally recognized and internalized cellular Ag are better cross-presented by CD141^{high} DC.¹⁴ Therefore, more than an intrinsic specialization of the CD141^{high} DC subset, our observations may also reflect a particular Ag acquisition pathway from live cells and/or a preferential NK/CD141^{high} DC cross-talk. Indeed, among blood DC subsets and CD34-derived DC, CD11b^{neg}CD141^{high} represents the only DC population that does not express SIRP α , the receptor of the CD47 “don't eat me” signal.³⁷ Although the NK/CD141^{high} DC cross-talk has never been documented, several observations point to specific interactions between those two cell types. First, we have previously demonstrated a cooperation between circulating blood myeloid DC and NK cells in the early response to dsRNA (TLR3 ligands)³⁸ where CD141^{high} DCs selectively express high TLR3.³⁹ Second, XCR1 is a specific marker of CD141^{high} DC and its ligand XCL1 is mainly expressed by CD8⁺ T cells and NK cells. Interestingly, the XCR1-XCL1 axis was recently demonstrated as very important in CD8⁺ T-cell priming.^{10,40}

Thus, we propose a model where NK cells and DC sensing the emerging tumor allow the release of IFN- γ and TNF- α necessary for the processing and cross-presentation of tumor-associated Ag (TAA) acquired from live cells by

CD141^{high} DC. NK-cell-induced activated DC will then secrete high amounts of cytokines such as IL-12 that will amplify NK cell activation and consequently the cross-presentation pathway. Following migration into draining lymph nodes, Ag-bearing DC will ultimately induce an efficient CD8⁺ T-cell response. In accordance with this model, injection of NK cell targets such as class I-deficient splenocytes led to efficient specific CD8⁺ T-cell responses *in vivo*⁴¹ and recognition of MHC class I-deficient tumor cells by NK cells has been shown to induce DC activation and protective CD8⁺ T-cell immunity in mice.^{42,43} Furthermore, in a mouse model of subcutaneous melanoma, activation of NK cell functions at the tumor site appears to be critical for inducing specific CTL cross-priming and the antitumor response.⁴⁴ Thus, our *in vitro* observations with human cells are strongly supported by various *in vivo* murine models. Importantly, using tumor cells other than the typical target K562 cells, we also found that addition of specific antitumor therapeutic mAbs could induce potent Ag cross-presentation when natural recognition of target cells did not stimulate NK cells with high enough efficiency. This shows that NK cells, which contribute to antitumor activity of clinical mAbs through ADCC,⁴⁵ may also favor subsequent induction of specific T-cell immunity through their noncytolytic functions. These

observations extend recent studies showing that the efficacy of therapeutic mAbs (anti-EGFR, anti-Her2-neu or anti-CD20) may require the adaptive immune response.^{16,46–48}

To conclude, in addition to their previously described role in priming DC for IL-12 production and Th1 polarization *in vivo*,^{42,49} NK cells may also contribute to increase adaptive T-cell immunity through triggering cellular Ag cross-presentation by DC. This NK-cell-dependent pathway should be particularly relevant for initiating adaptive immunity in sterile inflammatory conditions such as in tumors, and may be necessary to generate epitope spreading and downstream polyspecific CD8⁺ T-cell responses against multiple endogenous TAA.

Acknowledgements

The authors thank the DTC platform (Inserm, Nantes, France) for monocytes, Dr M. Yagita (Japan) for KHYG1 cell line, G. de Saint Basile (France) for anti-Munc 13-4 antibody, C. Thery (France) for polyclonal rabbit anti-OVA and D. Nègre and the Anira Vectorologie Platform (France) for lentivirus production. F.D. designed and performed research, analyzed data and wrote the paper; V.O., A.C.D. and E.V. performed research; I.D. contributed analytical tools; R.G., J.M., H.V. and I.P. contributed vital reagents; C.D.D., T.W. and N.G. contributed to experimental design and writing of the paper; C.C. and J.V.G. supervised the study, contributed to experimental design and writing of the paper.

References

1. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:47–64.
2. Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, et al. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8⁺ T cells. *Cell Death Differ* 2009;16:991–1005.
3. Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, et al. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* 2001;166:3717–23.
4. Maranon C, Desoutter JF, Hoeffel G, et al. Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4⁺ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6092–7.
5. Matheoud D, Baey C, Vimeux L, et al. Dendritic cells cross-present antigens from live B16 cells more efficiently than from apoptotic cells and protect from melanoma in a therapeutic model. *PLoS One* 2011;6:e19104.
6. Shortman K, Heath WR. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol Rev* 2010;234:18–31.
7. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 2008;322:1097–100.
8. Bachem A, Guttler S, Hartung E, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 2010;207:1273–81.
9. Haniffa M, Shin A, Bigley V, et al. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 2012;37:60–73.
10. Crozat K, Guiton R, Contreras V, et al. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 2010;207:1283–92.
11. Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, et al. Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 2010;207:1247–60.
12. Poulin LF, Salio M, Griessinger E, et al. Characterization of human DNGR-1⁺ BDCA3⁺ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 2010;207:1261–71.
13. Cohn L, Chatterjee B, Esselborn F, et al. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3⁺ dendritic cells at cross presentation. *J Exp Med* 2013;210:1049–63.
14. Segura E, Durand M, Amigorena S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J Exp Med* 2013;210:1035–47.
15. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, et al. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:327–33.
16. Srivastava RM, Lee SC, Andrade Filho PA, et al. Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2013;19:1858–72.
17. Agaoglu S, Marcenaro E, Ferranti B, et al. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2008;112:1776–83.
18. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, et al. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002;195:335–41.
19. Tanaka F, Hashimoto W, Okamura H, et al. Rapid generation of potent and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by interleukin 18 using dendritic cells and natural killer cells. *Cancer Res* 2000;60:4838–44.
20. Dao T, Gomez-Nunez M, Antczak C, et al. Natural killer cells license dendritic cell cross-presentation of B lymphoma cell-associated antigens. *Clin Cancer Res* 2005;11:8763–72.
21. Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, et al. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 2003;171:2366–73.
22. Retiere C, Prod'homme V, Imbert-Marcille BM, et al. Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J Virol* 2000;74:3948–52.
23. Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, et al. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2013;19:1147–58.
24. Rabinovich BA, Li J, Shannon J, et al. Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *J Immunol* 2003;170:3572–6.

25. Castiglioni P, MartIn-Fontecha A, Milan G, et al. Apoptosis-dependent subversion of the T-lymphocyte epitope hierarchy in lymphoma cells. *Cancer Res* 2002;62:1116–22.
26. Labarriere N, Bretaudeau L, Gervois N, 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. *Int J Cancer* 2002;101:280–6.
27. Menager MM, Menasche G, Romao M, et al. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol* 2007;8:257–67.
28. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, et al. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005;106:2252–8.
29. Matheoud D, Perie L, Hoeffel G, et al. Cross-presentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo. *Blood* 2010;115:4412–20.
30. Strehl B, Seifert U, Kruger E, et al. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005;207:19–30.
31. Saccheri F, Pozzi C, Avogadri F, et al. Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. *Sci Transl Med* 2010;2:44ra57.
32. Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, et al. Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J Immunol* 2005;175:2900–12.
33. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001;7:297–303.
34. Semino C, Ceccarelli J, Lotti LV, et al. The maturation potential of NK cell clones toward autologous dendritic cells correlates with HMGB1 secretion. *J Leukoc Biol* 2007;81:92–9.
35. Vitale M, Della CM, Carlomagno S, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the Nkp30 triggering receptor. *Blood* 2005;106:566–71.
36. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu MH, et al. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012;209:653–60.
37. Chao MP, Weissman IL, Majeti R. The CD47-SIRP α pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Curr Opin Immunol* 2012;24:225–32.
38. Perrot I, Deauvieu F, Massacrier C, et al. TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J Immunol* 2010;185:2080–8.
39. Robbins SH, Walzer T, Dembele D, et al. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* 2008;9:R17.
40. Dörner BG, Dörner MB, Zhou X, et al. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8 $^{+}$ T cells. *Immunity* 2009;31:823–33.
41. Krebs P, Barnes MJ, Lampe K, et al. NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood* 2009;113:6593–602.
42. Adam C, King S, Allgeier T, et al. DC-NK cell cross talk as a novel CD4 $^{+}$ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 2005;106:338–44.
43. Mocikat R, Braumüller H, Gumy A, et al. Natural killer cells activated by MHC class I (low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 2003;19:561–9.
44. Liu C, Lou Y, Lizee G, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1165–75.
45. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 2004;64:4664–9.
46. Park S, Jiang Z, Mortenson ED, et al. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell* 2010;18:160–70.
47. Nasser R, Pelegrin M, Michaud HA, et al. Long-lasting protective antiviral immunity induced by passive immunotherapies requires both neutralizing and effector functions of the administered monoclonal antibody. *J Virol* 2010;84:10169–81.
48. Abes R, Gelize E, Fridman WH, et al. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood* 2010;116:926–34.
49. Westwood JA, Kelly JM, Tanner JE, et al. Cutting edge: novel priming of tumor-specific immunity by NKG2D-triggered NK cell-mediated tumor rejection and Th1-independent CD4 $^{+}$ T cell pathway. *J Immunol* 2004;172:757–61.

Supplementary Materials

Generation of K562-N9V or GFP expressing cell line.

We used lentiviral- based vectors to generate the K562 cell line expressing the N9V epitope of the CMV pp65 fused in frame at the 5' end to cytoplasmic OVA. The HIV lentiviral backbone is based on self inactivating 3'LTR vectors (SIN). This vector was engineered to carry first the human CMV early enhancer/chicken β actin hybrid promoter (CAG) driving the N9V-OVA protein followed by the spleen focus-forming virus promoter (SFFV) driving the enhanced green fluorescent protein (eGFP) reporter gene. To increase the level of transcription the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) was inserted downstream of N9V-OVA. Amplification of the fusion protein was done using a vector encoding a full OVA as template and the following primers: Forward N9V-CytOVA:GCCTCGAGTGAGCCACCATGATCCTGGCCCGCAACCTGGTGCCCATGGTGGCTACGGTTCAGGGTCAGAATACCAGGACACAAATAAATAAGGTTGTTTCG and RVS-OVA:CTGCTCAAGGCCTGAGACTTC. Viruses were pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSVg), infections at MOI 5 was performed and 5 days post-transduction, GFP-positive K562 cells were cell sorted, expanded in culture, and used as a stable bulk population. GFP expression was checked before each experiment.

Flow cytometry quantification and confocal microscopy for Ag uptake analysis.

After DC coculture with K562 w or w/o NK, cells were stained on ice with anti-DC-SIGN and DAPI and uptake was calculated as the percentage of PKH67+ DC within total viable DC. To exclude binding, Ag uptake was similarly assessed in 4°C-mixed cultures or using paraformaldehyde-fixed immature DC. For confocal microscopy analysis, mixed cells were plated on poly-L-lysine-coated slides (Sigma-Aldrich) for 1 hour at 37°C before being fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) 0.2% BSA (Interchim). Cells were stained with anti-Mannose Receptor (BD Bioscience) followed by staining with Alexa

Fluor 555-coupled goat anti-mouse Ab (Molecular Probes) and DAPI for nuclei staining. Slides were mounted in ProLong Gold (Invitrogen) and visualized on a laser-scanning confocal microscope (TCS-SP2, Leica).

Differentiation of DC from monocytes

Monocytes-derived DC were obtained by culturing fresh adherent fraction of PBMC or frozen monocytes from leukapheresis (purchased from plateforme DTC, Inserm, Nantes, France) in complete medium in the presence of 50 ng/ml IL-4 and 20 ng/ml GM-CSF (both provided by Schering Plough) for 5 d. DC displayed typical phenotype of immature DC (CD1a⁺CD14⁻HLA⁻DR⁺CD86⁻CD83⁻). Mature DC (CD83⁺CD86⁺HLA⁻DR^{high}) were obtained by exposing cells to 500 ng/ml of LPS for 24 h.

Differentiation of CD141^{high} DC and CD11b⁺ DC from CD34⁺ HSC progenitors

CD34⁺ haematopoietic cells were purified from cord blood by magnetic isolation (Indirect CD34 MicroBead Kit, Miltenyi Biotec). CD34 were cultured during 6 days in 200 ng/ml GM-CSF, 25 ng/ml SCF and 2,5 ng/ml TNF- α . Then, CD34 derived-DC were obtained following 10 more days culture in 200 ng/ml GM-CSF and 10 ng/ml IL4. Then, CD34-derived DC subsets were cell sorted after CD11b-FITC (Dako) and CD141-APC (Miltenyi Biotec) staining and using DAPI exclusion of dead cells. CD141^{high}/CD11b⁻ (as referenced to "CD141^{high} DC"), the CD141^{low}/CD11b⁺/BDCA1⁺ DC subset (as referenced to "CD11b⁺ DC") and undifferentiated cells double negatives were cell-sorted with a BD FACSAria III SORP (purity > 95%) (Figure 6A). As previously described by Poulin *et al.*²⁰ and as controlled by FACS, CD141^{high} DC were CLEC9A⁺, Necl2⁺ and CD11b⁻ whereas CD11b⁺ DC were SIRP α ⁺, CLEC9A⁻, and Necl2⁻ (data not shown). BDCA1 is expressed on the two populations and no pDC were observed in the culture based on BDCA2 staining (data not shown).

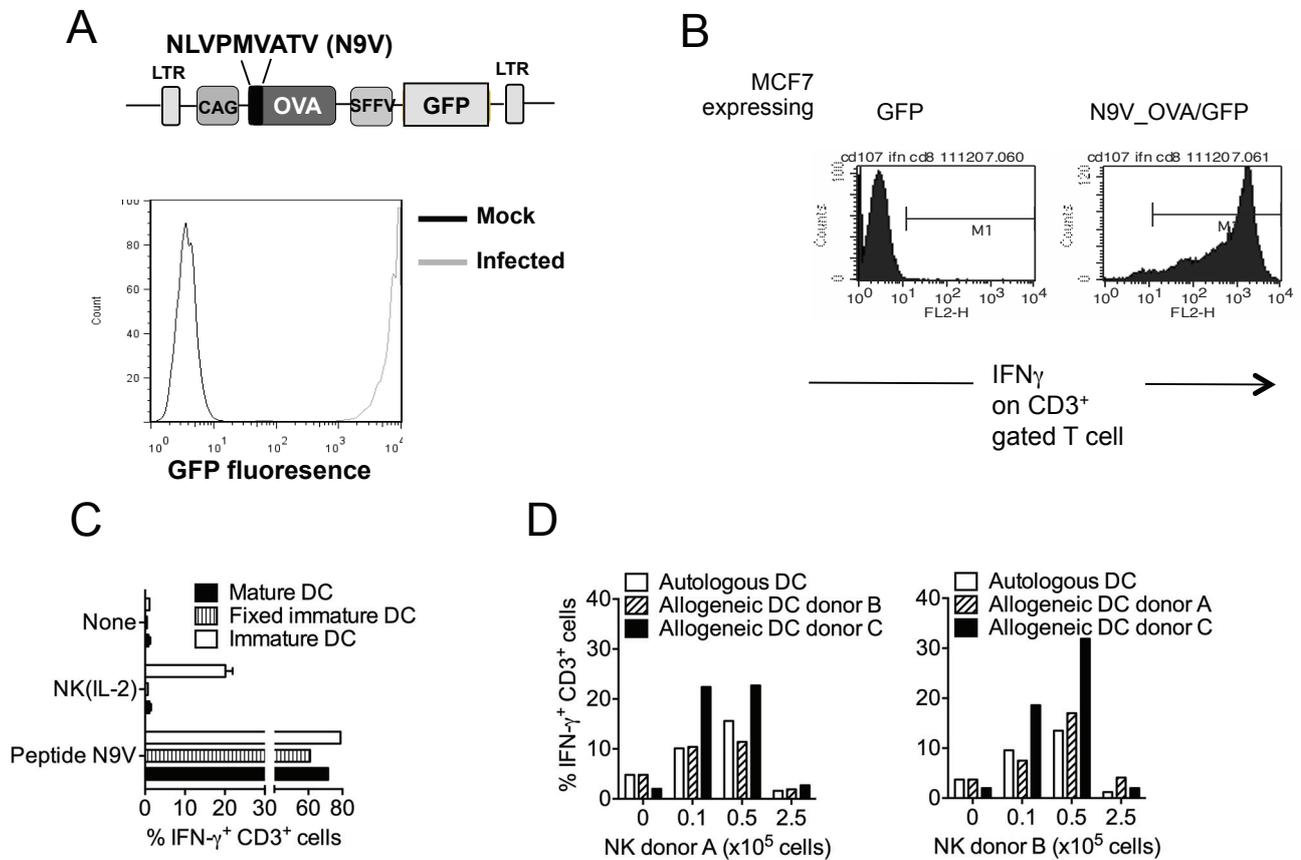


Figure S1. (A) Lentiviral construct used to express N9V epitope in K562 cells and subsequent GFP fluorescence in the infected cell line are shown (referred as N9V_K562). (B) IFN γ intracytoplasmic staining on CD3⁺ gated T cells after direct endogenous Ag presentation by the HLA-A2⁺ MCF7 breast cancer cell line infected with the same N9V_OVA/GFP lentivirus and using MCF7 expressing GFP only as control. (C) Cross-presentation induced by fixed iDC or non-fixed mature DC. As positive control, soluble N9V peptide was applied to mixed cultures for 1 h before washing and adding T cell clone. (D) Comparison between Ag cross-presentation induced with allogeneic and autologous NK/DC settings.

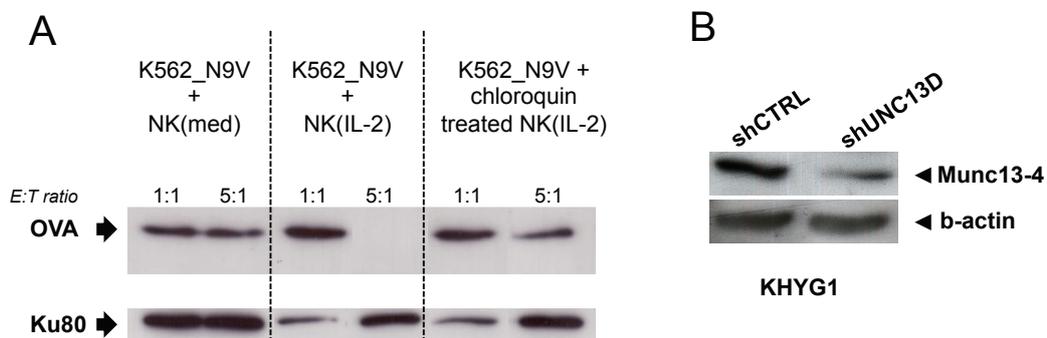


Figure S2. Analysis of transgene and knock down proteins. (A) Western blot analysis of OVA expression in lysates from K562_N9V_OVA after co-culture with resting NK, IL-2 activated NK or chloroquin pretreated IL2-activated NK at various E:T ratio. Polyclonal rabbit anti-OVA (a gift from Clotilde Thery, PARIS, France) and horseradish peroxidase-coupled goat anti-rabbit (DAKO) were used. Anti-Ku80 mAb (Serotec) were used to detect the housekeeping protein. (B) Western blot analysis of Munc 13-4 expression in lysates from KHYG1 expressing an irrelevant shRNA (shCtrl) or a shRNA against UNC13 D. Polyclonal Rabbit anti-human Munc 13-4 (a gift from Geneviève de Saint Basile, PARIS, France {Menager, 2007 2255 / id}) and horseradish peroxidase-coupled goat anti-rabbit (DAKO) were used.

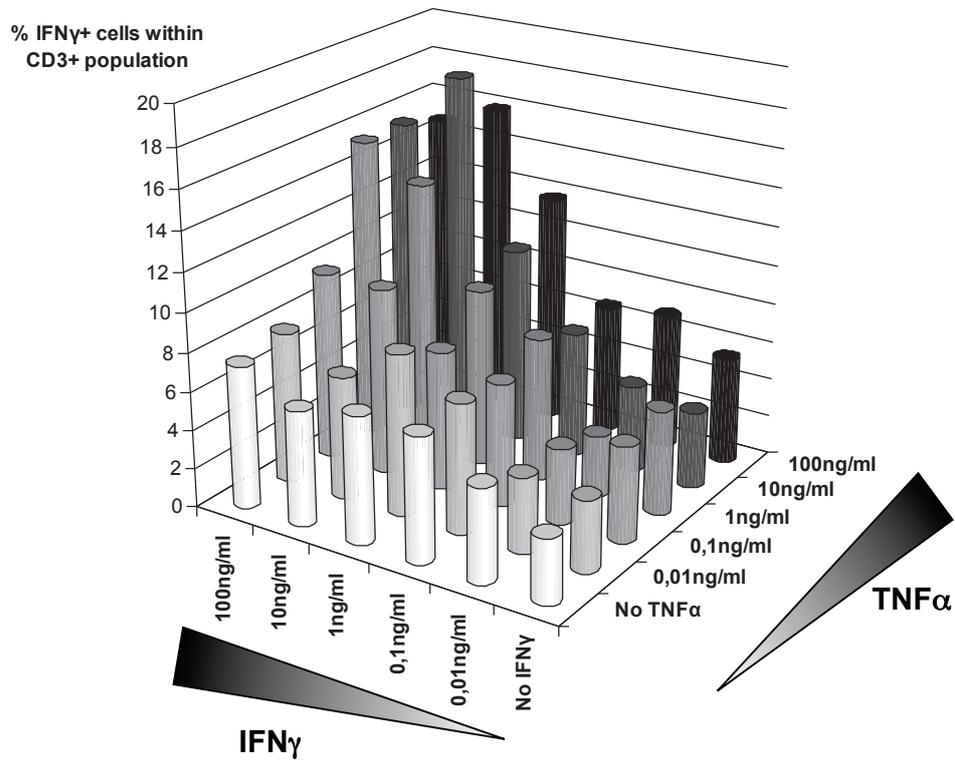


Figure S3. Low concentration of IFN- γ and TNF- α permit Ag cross-presentation by DC. Cross-presentation assays were performed with rising dose of recombinant IFN- γ and/or TNF- α and CD8 T cell activation monitored as in Figure 1A. One representative experiment out of 2.

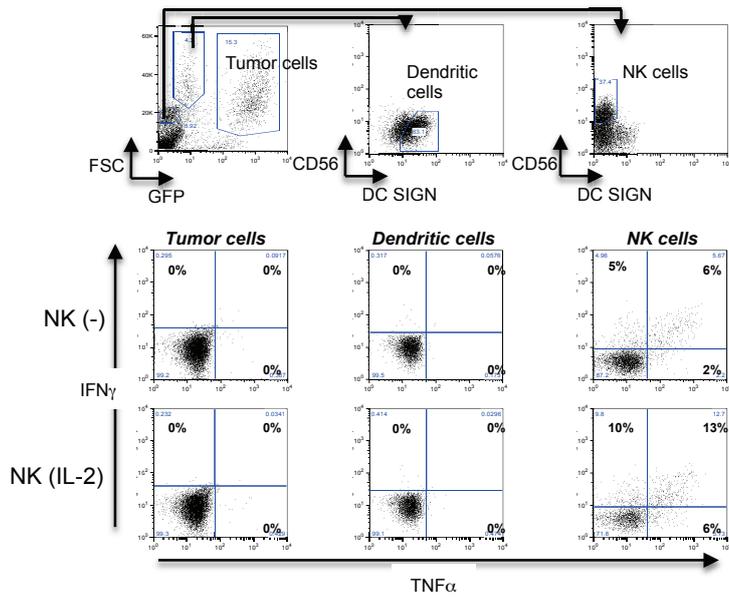


Figure S4. IFN- γ is mostly produced by NK cells in co-culture system with tumor and dendritic cells. In our *in vitro* co-culture system with NK[IL2] (CD56+), DC (CD1a+) and tumor cells (GFP+) at ratio (1:1:2), IFN γ and TNF- α is exclusively produced by NK cells as revealed by intracellular cytokine staining. One experiment representative of 3.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Les DC sont connues depuis de nombreuses années pour leur efficacité à activer les lymphocytes T naïfs (Banchereau and Steinman, 1998). Les données plus récentes concernant les DC ont également révélé, notamment grâce aux modèles murins, que leur présence est nécessaire pour entraver le développement des tumeurs (Hildner et al., 2008; Movassagh et al., 2004). En particulier, ces modèles ont permis de mettre en évidence l'importance de l'IFN de type I produit par les DC dans l'élimination des cellules tumorales par les cellules NK (Swann et al., 2007). D'autre part, la sous population de DC CD8 α^+ active également par présentation croisée des lymphocytes T CD8 spécifiques d'Ag exprimés par les cellules tumorales. Les DC induisent ainsi une forte cytotoxicité envers les cellules tumorales en agissant à la fois sur l'immunité innée et sur l'immunité adaptative. Chez l'homme, l'impact des DC est difficile à évaluer en raison du stade avancé des tumeurs au diagnostic empêchant de déterminer précisément leur fonction dans les étapes précoces du développement tumoral. Il nous a donc paru nécessaire de mettre en place un modèle *in vitro* permettant d'évaluer la présentation croisée d'Ag provenant de cellules tumorales par différentes sous populations de DC et de déterminer les facteurs clés favorisant ou inhibant ce processus essentiel dans la mise en place d'une immunité anti-tumorale spécifique et mémoire.

I. Induction de la présentation croisée d'antigène d'origine cellulaire

Nous avons observé que les cellules NK, *via* leur sécrétion d'IFN- γ et de TNF α , augmentent la présentation croisée d'Ag d'origine cellulaire par les MoDC (Deauvieu et al., 2015). L'IFN- γ et le TNF α étaient déjà connues pour induire la maturation et l'activation des DC (Walzer et al., 2005) mais rien n'avait été montré concernant leur action sur la présentation croisée d'Ag. Ces deux cytokines induisent également la présentation croisée d'Ag par des DC BDCA3^{high} obtenues *in vitro* à partir de progéniteurs et dont l'homologie avec les DC BDCA3^{high} du sang a été démontrée. La présentation croisée des DC BDCA3^{high} peut également être induite en présence de ligands de TLR alors que les MoDC n'y sont pas sensibles. Il est donc difficile d'évaluer jusqu'à quel point la maturation des cellules est impliquée dans l'action de l'IFN- γ et du TNF α et si ces cytokines sont réellement plus aptes que des ligands de TLR pour induire la présentation croisée d'Ag par les DC. Ces travaux démontrent néanmoins que la présentation croisée d'Ag peut être induite par les cellules NK et renforce l'intérêt d'utiliser des thérapies monoclonales permettant de les mobiliser par ADCC.

Nos résultats, obtenus avec la lignée érythroleucémique K562 et la lignée de mélanome M18, n'ont pour l'instant pas pu être généralisés à des lignées issues de cancer de sein (CAL51, BT474) ou d'ovaire (SKOV3) exprimant, comme les cellules K562, l'épitope NgV. Nous avons choisi ces lignées car elles sont sensibles à la lyse par les cellules NK mais il pourrait être intéressant d'explorer des lignées supplémentaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la présentation croisée d'Ag d'origine

cellulaire, en particulier en présence d'IFN- γ et de TNF α . Nous avons vérifié qu'un prétraitement des cellules tumorales avec ces deux cytokines n'induit pas une meilleure présentation croisée d'Ag et nous supposons donc que l'IFN- γ et le TNF α agissent sur les DC.

Si nous ne trouvons aucune lignée de sein ou d'ovaire pour lesquelles la présentation croisée d'Ag par les DC peut être induite par l'IFN- γ et le TNF α , cela signifierait que ces deux cytokines favorisent probablement la reconnaissance ou l'internalisation d'Ag provenant des cellules K562 *via* des mécanismes qui resteraient à élucider. Ceux-ci pourraient être liés au fait que les cellules K562, au contraire des autres lignées testées, ne sont pas adhérentes. Cette différence majeure pourrait être en effet responsable d'une moins bonne interaction entre les DC et leur cible, en raison de contraintes physiques ou de l'induction de certains récepteurs à la surface des cellules tumorales liés à leur adhésion.

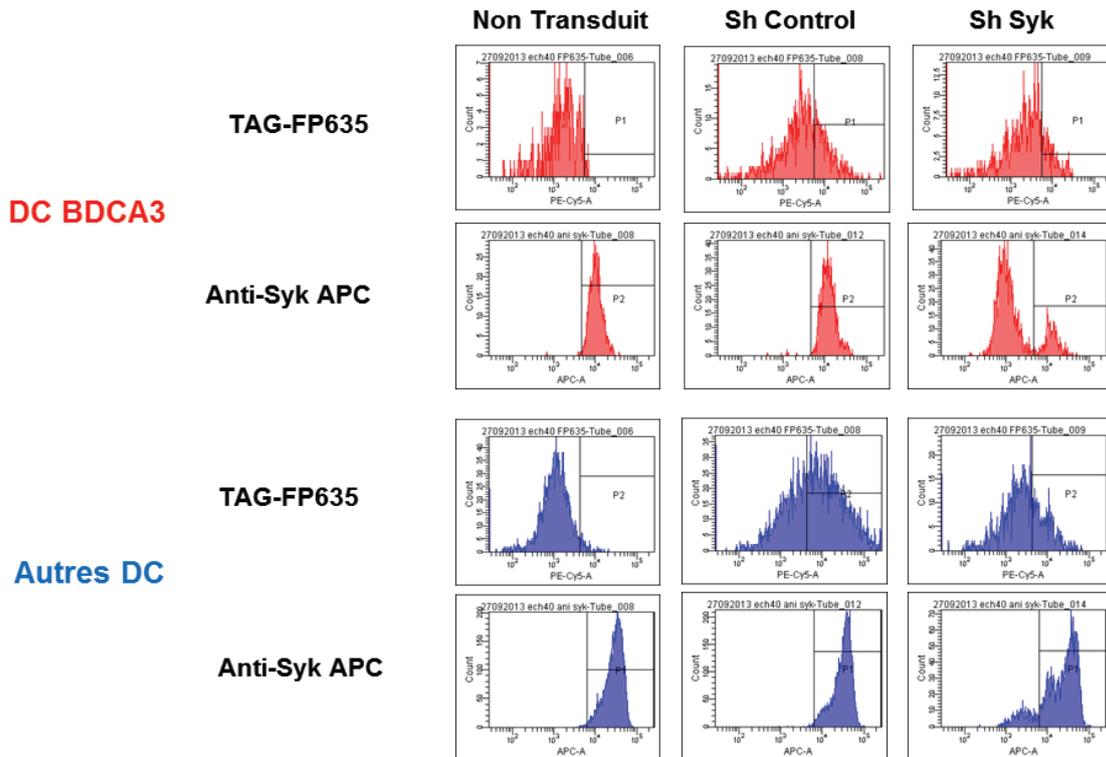
Au contraire, si nous trouvons une ou plusieurs lignées adhérentes pour lesquelles la présentation croisée d'Ag peut être induite par l'IFN- γ et le TNF α , il serait possible d'identifier les caractéristiques les différenciant des autres lignées, en comparant par exemple leur transcriptome. Nous pourrions ainsi imaginer mettre en évidence une ou plusieurs protéines, telles que CD47, dont la présence ou l'absence permettrait de favoriser l'internalisation et la présentation croisée d'Ag provenant de cellules vivantes. A plus large échelle, cela pourrait permettre d'élaborer de nouvelles hypothèses permettant d'expliquer pourquoi certains patients ne répondent pas totalement aux traitements par des anticorps monoclonaux. Outre les réponses partielles liées à l'hétérogénéité phénotypique des cellules tumorales, à la présence de cellules souches cancéreuses résistantes ou aux mécanismes d'immunoéchappement, il est en effet possible que les cellules tumorales entravent la capture d'Ag et participent ainsi à la rechute des patients en empêchant la mise en place d'une réponse immune adaptative par les DC.

A l'inverse, il est possible que ces mécanismes hypothétiques d'inhibition de la capture d'Ag par les DC au sein des tumeurs n'aient que peu d'impact vis-à-vis de la forte cytotoxicité des cellules NK induites par les anticorps monoclonaux thérapeutiques. Et dans le cas d'une forte mort cellulaire, il est imaginable que les DC puissent initier une réponse cytotoxique en présentant aux lymphocytes T CD8 les Ag libérés par les cellules tumorales mourantes (Nowak et al., 2003). En ce sens, nos résultats montrent que l'IFN- γ et le TNF α participent à la présentation croisée d'Ag issus de cellules M18 dont la mort a été induite suite à une infection par le virus de la rougeole. Cependant, en cas d'irradiation de ces cellules tumorales par des ultraviolets, la présentation croisée de l'Ag est loin d'être optimale. La lignée M18 n'étant pas sensible à la lyse par les cellules NK nous n'avons pas pu vérifier l'impact de cette voie de mort, mais il nous est apparu pour la lignée K562 qu'une forte lyse par les cellules NK peut dégrader l'Ag. Ainsi, il est difficile de savoir à l'avance si les traitements induisant la mort des cellules tumorales chez les

patients participent ou non à la mise en place d'une réponse anti-tumorale spécifique médiée par les DC.

A) Exploration des mécanismes d'induction de la présentation croisée d'antigène cellulaire

Suite à nos observations, nous envisageons désormais d'étudier plus en détails les mécanismes sous-jacents à l'induction de la présentation croisée d'antigène cellulaire par l'IFN- γ et le TNF α . Ceci nécessitera d'outrepasser certains obstacles liés à l'origine cellulaire de l'Ag. En effet, certains outils existant pour l'étude de la présentation croisée d'Ag solubles sont difficilement applicables dans notre modèle. Une faible vitesse de dégradation antigénique est par exemple un facteur clé pour une bonne présentation croisée. Cette vitesse de dégradation est connue pour être influencée par le compartiment dans lequel se trouve séquestré l'Ag ou par l'expression de NOX2 favorisant l'alcalinisation du compartiment d'internalisation (Schuette and Burgdorf, 2014). Il est possible d'utiliser une protéine soluble, appelée DQ Ovalbumine, afin de mesurer la vitesse de dégradation au sein des endolysosomes. Cette protéine, fluoresce dans le rouge lorsqu'elle est intacte et dans le vert après dégradation (Bonifaz et al., 2014). Cependant, il n'est pas certain que l'Ag exprimé dans notre modèle soit internalisé de la même manière qu'un Ag soluble car la forme et la taille des particules ont été décrites pour influencer l'efficacité de la présentation croisée (Mant et al., 2012). L'option la plus simple, mais indirecte, serait ainsi d'évaluer l'expression de NOX2 et son activité, au cours d'une cinétique de traitement avec de l'IFN- γ et du TNF α . De la même manière, le transfert d'antigène dans le cytosol est important pour une présentation croisée d'Ag efficace. Ce transfert peut être étudié en utilisant du cytochrome c, connu pour induire la mort par apoptose des cellules lorsqu'il est relâché dans le cytoplasme par les mitochondries (Lin et al., 2008). Il est ainsi possible d'évaluer le transfert de cytochrome c depuis les endosomes jusqu'au cytoplasme en mesurant l'apoptose des cellules cependant rien ne dit, encore une fois, que le transfert de cytochrome c sera représentatif de celui d'un Ag d'origine cellulaire. La meilleure option consisterait alors probablement à analyser l'expression de molécules permettant le transfert d'Ag, tel que sec61, pour résoudre cette question. Par ailleurs, ne sachant pas encore à quel niveau de la voie de présentation croisée intervient l'IFN- γ et le TNF α , nous pourrions évaluer la modulation de la plupart des molécules essentielles à ce processus par TLDA (Taqman Low Density Array) sur cellules triées. Les TLDA sont des cartes micro-fluidiques, composés de centaines de puits, permettant d'évaluer l'expression de centaines de gènes en parallèle sur le principe des PCR en temps réels. Une approche plus large de transcriptomique permettrait par ailleurs potentiellement de révéler des molécules encore non identifiées pour la présentation croisée d'Ag d'origine cellulaire. Enfin, nous pourrions confirmer le rôle des protéines ainsi mises en évidence par une approche complémentaire que nous avons développée et validée dans l'équipe sur le modèle de DC



Annexe 1 : Validation d'un protocole permettant d'inhiber des protéines de manière spécifique par transduction de ShRNA. Des progéniteurs de sang de cordons ont été transduits à l'issue de l'étape de prolifération avec un Sh Control ou un Sh dirigé contre la protéine Syk. A l'issue de l'étape de différenciation, les cellules transduites expriment un Tag fluorescent FP635. La transduction avec le Sh dirigé contre Syk permet d'inhiber l'expression de cette protéine dans les cellules transduites.

généérées *in vitro*, nous permettant d'inhiber spécifiquement l'expression de protéines par shRNA (small hairpin RNA) (Annexe 1).

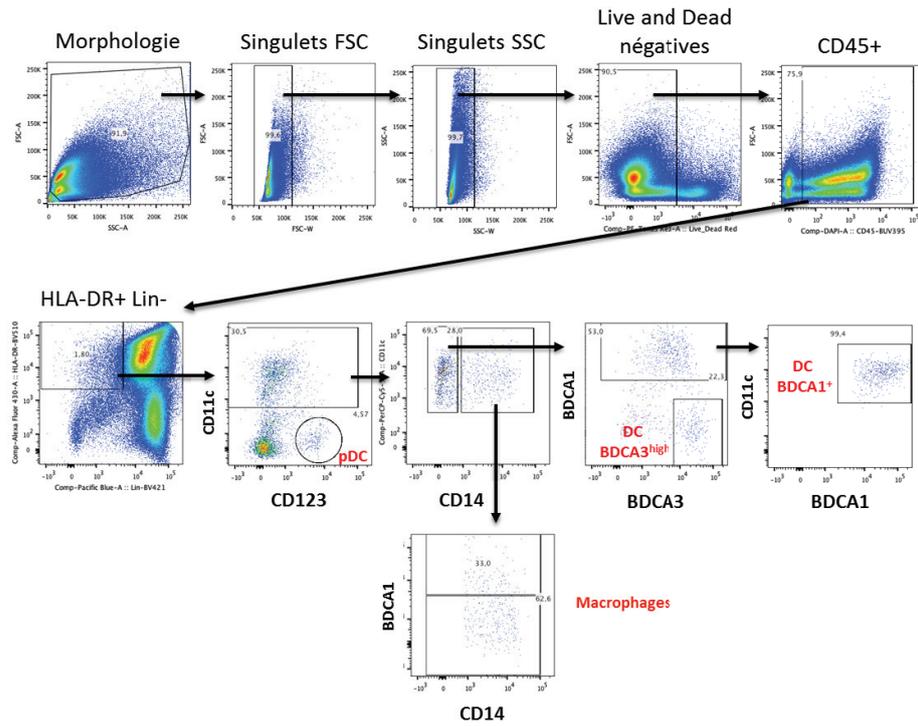
B) Supériorité des cellules dendritiques BDCA3^{high} pour la présentation croisée d'antigène ?

Une étude comparant les DC BDCA1⁺ et les DC BDCA3^{high} circulantes montre que leur présentation croisée d'Ag peut être fortement induite en présence de LPS ou R848 pour les DC BDCA1⁺ et de PolyI:C ou R848 pour les DC BDCA3^{high} (Nizzoli et al., 2013). Au contraire, la présentation croisée des pDC n'est pas significativement induite en présence de CpG ou R848. Ces travaux montrent ainsi l'importance du choix de l'activateur pour évaluer correctement la capacité de présentation croisée d'Ag des différentes sous populations. Notre modèle ne nous a pas permis de comparer les capacités de présentation croisée des DC BDCA3^{high} vis-à-vis des autres DC présentes *in vivo*. Cette comparaison est importante pour la mise au point de traitements visant à induire une réponse anti-tumorale optimale chez les patients et pour mieux définir la portée des résultats obtenus chez la souris. Chez l'homme, les études montrant une forte aptitude des DC BDCA3^{high} circulantes pour la présentation croisée d'antigène en présence de ligand de TLR3 mais à l'état basal, elles semblent au contraire moins douées que les DC BDCA1⁺ pour la présentation croisée d'Ag même si cette différence n'est pas significative. A l'inverse, les DC BDCA3^{high} de la peau et des ganglions lymphatiques sont spontanément supérieures pour la présentation croisée d'Ag, laissant penser que l'environnement tissulaire les conditionne pour cette fonction (Haniffa et al., 2012).

La particularité de notre modèle repose sur l'origine cellulaire de l'Ag. Il nous semblait en effet important de nous intéresser à cette forme d'Ag car elle est probablement plus représentative de ce qui se déroule *in vivo*. Des travaux s'intéressant à la présentation croisée d'Ag provenant de cellules mortes montrent que les DC BDCA3^{high} du sang présentent un avantage vis-à-vis des autres sous populations de DC (Bachem et al., 2010). Ceci n'est pas surprenant puisque les DC BDCA3^{high} expriment spécifiquement Clec9A. Pour notre part, nous avons également montré l'efficacité des DC BDCA3^{high} pour la présentation croisée d'Ag provenant de cellules vivantes. Ceci peut s'expliquer par l'absence de SIRPα à la surface des DC BDCA3^{high} ne permettant pas aux cellules tumorales d'inhiber leur phagocytose par les DC. L'importance de Clec9A et de SIRPα pourrait être évaluée en inhibant leur expression de manière spécifique à l'aide de shRNA dirigés contre Clec9A, pour les DC BDCA3^{high}, et SIRPα, pour les autres DC. S'il s'avère que les DC BDCA3^{high} sont plus douées pour la présentation croisée d'Ag provenant de cellules mortes et de cellules vivantes, cela se révélera très intéressant dans le cadre de thérapies anticancéreuses car il sera alors possible d'imaginer renforcer les thérapies actuelles induisant une forte mort cellulaire ou de réduire les doses et les effets secondaires de ces traitements, en les combinant à des thérapies visant à réactiver spécifiquement les DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs. Au contraire, si toutes les DC présentent de manière

Panel

CD45 BUV395
 CD3, 15, 19, 56 BV421
 HLA-DR BV510
 CD123 BV605
 CD11c PercPCy5.5
 CD14 PE
 Live and Dead Red
 BDCA1 PE-Cy7
 BDCA3 APC



Annexe 2 : Exemple d'un marquage multiparamétrique sur suspension de cellules d'amygdales permettant de trier en parallèle les pDC, les macrophages, les DC BDCA3^{high} et les DC BDCA1⁺.

similaire les Ag d'origine cellulaire lorsqu'elles sont activées de manière optimale, il serait pertinent d'activer les cellules infiltrants en majorité les tumeurs ou d'activer simultanément toutes les populations de DC pour amplifier les chances de succès thérapeutique.

Enfin, nous envisageons d'utiliser un protocole publié récemment permettant de générer *in vitro* des pDC, des DC BDCA1⁺ et des DC BDCA3^{high} (Lee et al., 2015). Au vue de nos résultats montrant que R848 module un plus grand nombre de gènes chez les DC BDCA3^{high} que chez les MoDC, et des résultats montrant que l'induction de la présentation croisée des DC BDCA1⁺ est de meilleure qualité en présence de LPS, il sera important d'utiliser un panel large de ligands de TLR, incluant des activateurs des TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, et TLR9, pour s'assurer de comparer chaque population de DC en condition d'activation optimale.

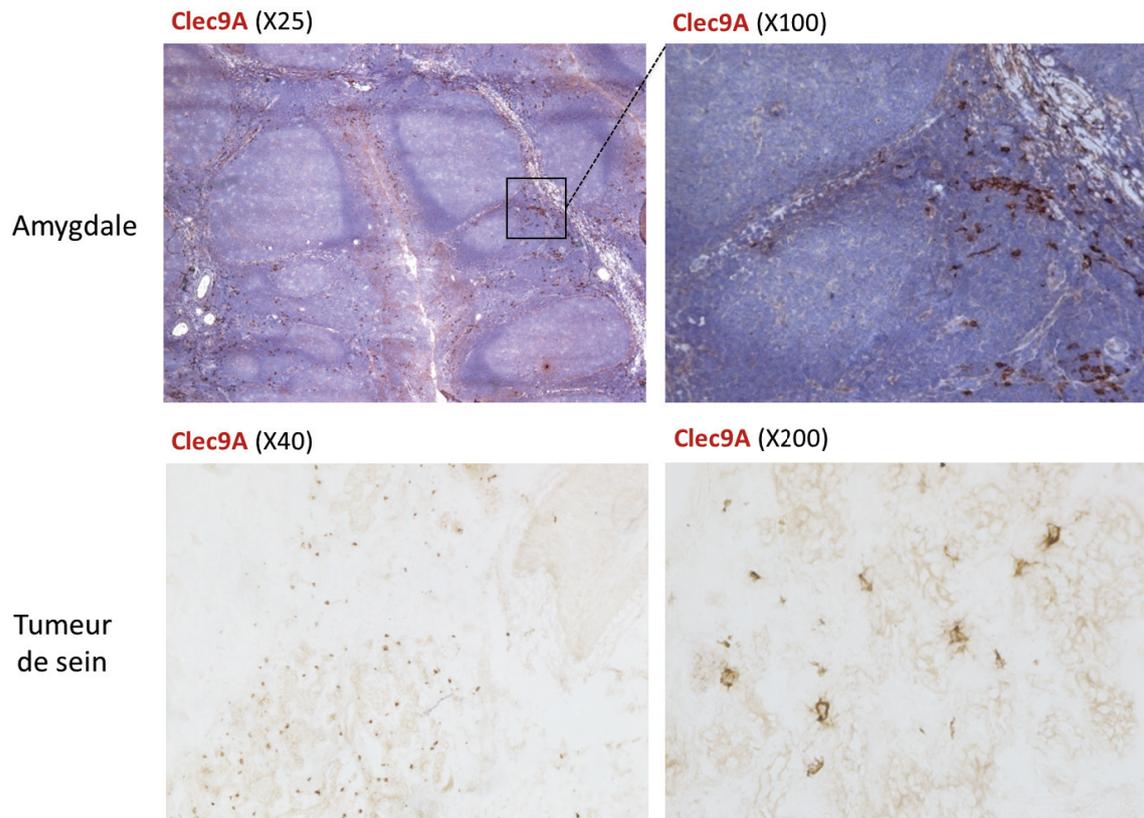
II. Cellules dendritiques BDCA3^{high} associés aux tumeurs

Nos travaux ont révélé que les DC BDCA3^{high} étaient présentes dans les tumeurs. Ces dernières répondent à une stimulation combinée de ligands de TLR3 et de TLR7/8 mais l'environnement tumoral semble inhiber leur production de cytokine.

A) Validation de l'identité des cellules dendritiques BDCA3^{high} associées aux tumeurs

L'étude des DC BDCA3^{high} est compliquée par leur rareté (0,01% des cellules hématopoïétiques du sang). L'amélioration de la prise en charge des patientes atteintes de tumeurs de sein ainsi que la collecte de tissu par les anatomopathologistes pour l'évaluation du type histologique de la tumeur, la conservation de tissu pour des études ultérieures et la validation de la qualité du geste chirurgical, réduisent la taille des prélèvements destinés à la recherche. Ainsi, pour une population de cellules aussi rare, il est parfois compliqué d'obtenir un nombre de cellules permettant de caractériser tous les paramètres voulus. Par ailleurs, l'intérêt envers les DC BDCA3^{high} étant récent, les outils permettant de les étudier sont encore rares.

Nous possédons aujourd'hui quelques éléments laissant penser que les DC BDCA3^{high} associés aux tumeurs sont équivalentes à celles du sang, sur la base de leur expression de XCR1 et leur absence d'expression de CD11b et SIRP α . Elles sont par ailleurs productrices d'IFN- λ , alors que les DC BDCA1⁺ n'en produisent ni dans le sang, ni dans la tumeur. Afin de nous assurer de leur identité, nous envisageons cependant d'employer une méthode complémentaire. Nous avons mis au point un marquage multiparamétrique permettant de trier en parallèle les cDC, les pDC et les macrophages (Annexe 2), à partir d'échantillons de sang et de tumeurs. Nous pourrions ainsi à l'instar des études précédemment réalisées, et comparant les DC entre différentes espèces ou tissus, nous assurer de l'homologie des DC BDCA3^{high} des tumeurs avec celles du sang. Pour pouvoir effectuer cette étude nous avons choisi d'utiliser une méthode de plus en plus utilisée,



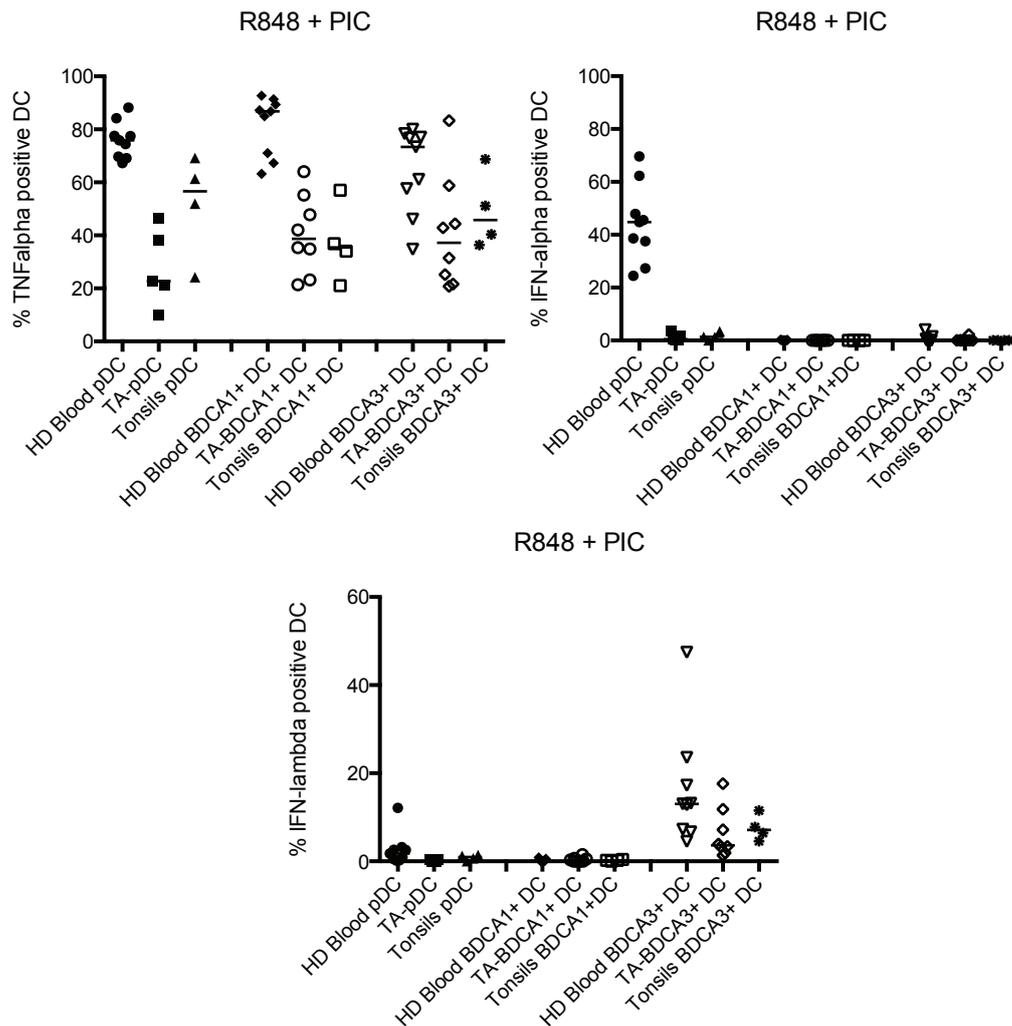
Annexe 3 : Marquage immunohistochimique des DC Clec9A⁺ de l'amygdale et d'une tumeur de sein. Dans l'amygdale les DC Clec9A⁺ sont principalement localisées dans les zones T, que l'on différencie des zones germinales B plus claires. Ceci est en accord avec ce qui est décrit pour les ganglions lymphatiques (Segura et al., 2012). Dans les tumeurs de sein, les DC Clec9A⁺ semblent plus éparpillées mais nous n'avons pas de contre coloration pour évaluer leur localisation exacte. Ces résultats ont besoin d'être précisés et reproduits.

appelée « RNA sequencing », nécessitant un nombre réduit de cellules (<1000). Ces travaux se feront en collaboration avec l'équipe de Vassili Soumelis à Paris, et nécessiteront un certain temps afin d'analyser finement les résultats obtenus. A plus court terme, nous espérons également valider la présence de DC BDCA3^{high} sur coupes de tumeurs par immunofluorescence. Nous espérons préalablement les détecter par immunohistochimie mais aucun anticorps dirigé contre Clec9A et validé sur coupes congelées d'amygdale n'a permis de révéler efficacement la présence de DC Clec9A⁺ dans les tumeurs, à l'exception d'un marquage sur coupe de tumeur de sein congelée (Annexe 3). Il se peut ainsi que l'absence de Clec9A observée en cytométrie pour les DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs ne soient pas dû à la digestion enzymatique mais à une expression réellement plus faible de cette lectine à la surface des DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs. Ceci pourrait être lié à une internalisation du récepteur en présence de cellules nécrotiques ou à une inhibition de son expression par des facteurs présents dans l'environnement tumoral. La maturation des DC BDCA3^{high} a aussi été décrite pour diminuer l'expression de ce récepteur (Schreibelt et al., 2012). Ces hypothèses pourront être évaluées à l'aide des DC obtenues *in vitro* et mises en contact de surnageant de tumeurs ou de cellules nécrotiques. L'analyse de leur transcriptome devrait également éclaircir cette question en révélant si elles expriment ou non l'ARN messager codant pour Clec9A. De plus, l'immunofluorescence sur coupes de tumeurs, congelées ou déparaffinées, devrait palier aux problèmes rencontrés en immunohistochimie en nous permettant d'évaluer la présence de DC BDCA3^{high}, à l'aide de combinaison bien réfléchies d'anticorps dirigés contre des récepteurs, tels que BDCA3 et CD11c et/ou des facteurs de transcription tels qu'IRF8 et Batf3.

B) Localisation, maturation et fonction des cellules dendritiques BDCA3^{high} associées aux tumeurs

Nous avons vu dans la partie **introduction** que les DC peuvent infiltrer les tumeurs ou être situées en zone péri-tumorales et que leur état de maturation diffère d'une localisation à une autre. Les marquages sur coupes de tumeurs devraient ainsi permettre de définir où se situent les DC BDCA3^{high} dans les tumeurs de sein. Cette donnée est importante pour déterminer si les DC BDCA3^{high} sont en contact direct avec les cellules tumorales, élément qui n'a jamais été déterminé jusqu'à présent.

Nous investiguerons également leur proximité avec d'autres populations immunitaires. Il serait en particulier intéressant d'étudier la présence de DC BDCA3^{high} dans les structures lymphoïdes tertiaires riches en DC matures, lymphocytes T et lymphocytes B (Goc et al., 2013). Nous pourrions ainsi révéler des interactions possibles avec les lymphocytes T CD8. Par ailleurs, au vue de nos résultats obtenus *in vitro*, une proximité avec les cellules NK serait également révélatrice d'une possible collaboration permettant une meilleure présentation croisée par les DC BDCA3^{high}.



Annexe 4 : Pourcentage de DC produisant du TNF α , de l'IFN- α ou de l'IFN- λ après stimulation avec R848 et polyI:C. Le pourcentage de DC produisant ces cytokines est plus faible pour les DC provenant d'amygdale comparativement à celles du sang. Comparativement aux DC de tumeurs, le pourcentage de DC productrices de cytokine est globalement similaire ou supérieure pour les DC provenant d'amygdale comparativement à celles issues de tumeurs de sein.

De plus, nous avons montré que les DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs sont capables de produire du TNF α et de l'IFN- λ . Il s'agit de la première observation montrant une production d'IFN- λ par des DC BDCA3^{high} issues de tumeurs. A l'inverse nous avons montré que les pDC issues de tumeurs sont pour leurs parts incapables d'en produire, à l'instar de l'IFN- α , au contraire des pDC circulantes. Cette différence peut tout d'abord être liée au protocole consistant à stimuler une suspension cellulaire. Il est ainsi possible que l'absence de production d'interférons, en particulier l'IFN- λ , par les pDC ne soit pas due à une déficience fonctionnelle plus importante de celle des DC BDCA3^{high} mais plutôt à l'absence, dans la suspension de cellules tumorales, d'un partenaire les aidant à en produire. En effet, elles produisent par ailleurs autant de TNF α que les DC BDCA3^{high}. Il est également possible que certains facteurs solubles présents dans le microenvironnement affectent plus fortement les pDC que les DC BDCA3^{high}, par exemple en raison d'une expression plus forte de récepteurs dédiés à la reconnaissance de ces facteurs solubles. Enfin, l'activateur choisi n'était peut-être pas optimal pour les pDC non circulantes. Une activation par le virus influenza aurait ainsi pu être plus efficace pour induire une production d'IFN- λ par cette sous population. Notre équipe a en effet montré que les pDC associées aux tumeurs peuvent être efficacement réactivées, chez la souris par un ligand de TLR7, alors qu'elles sont déficientes pour une réponse aux ligands de TLR9 (Le, I et al., 2013).

Nos résultats soutiennent cependant l'hypothèse selon laquelle les DC BDCA3^{high} pourraient potentiellement répondre à une stimulation, *in vivo*, et exercer ainsi une fonction anti-tumorale. Notons que certains points restent malgré tout à être élucidés. En particulier, nous ne disposons pas de tissu de sein sain nous permettant de nous assurer que l'inhibition de la sécrétion d'IFN- λ par les DC BDCA3^{high} est spécifiquement liée à des facteurs présents dans les tumeurs. A l'inverse nous ne disposons pas de DC BDCA3^{high} de sein sain permettant d'évaluer la capacité de sécrétion de cytokine et le niveau de maturation initial des DC BDCA3^{high} situées dans ce tissu. Nous ne pouvons donc pas affirmer définitivement que les DC BDCA3^{high} sont altérées dans les tumeurs. Nous avons par ailleurs obtenu des données montrant que des DC BDCA3^{high} provenant d'amygdale produisent également moins de cytokines que les DC BDCA3^{high} du sang (Annexe 4). L'environnement de ces DC est cependant tellement riche en lymphocytes qu'il est difficile d'en tirer des conclusions extensibles aux tumeurs. Nous pouvons uniquement en conclure que les DC répondent différemment en fonction de leur tissu d'origine, et tester l'action de différentes cytokines recombinantes connues pour être inhibitrices, telle que le TGF- β , sur la production de cytokines par les DC BDCA3^{high}.

Enfin, leur état de maturation reste à définir, que ce soit par immunofluorescence, immunohistochimie ou par cytométrie en flux. En effet, maintenant que nous avons validé leur capacité à répondre à des ligands de TLR, nous pourrions consacrer les prochains échantillons de tumeurs à l'évaluation de l'expression de marqueurs tels que CD83, CD86 ou le CMH de classe I, par les DC BDCA3^{high}. En plus de nous donner une

indication sur leur capacité à présenter les Ag aux lymphocytes T CD8, ces résultats nous apporteront également des clés de compréhension sur les différences de réponse fonctionnelle observée vis-à-vis des DC BDCA3^{high} du sang. Dans le cas, où elles seraient aussi immatures que les DC BDCA3^{high} du sang, l'hypothèse d'une altération par le microenvironnement tumoral serait confortée, alors qu'un état mature pourrait expliquer une moindre réponse à des ligands de TLR.

C) Recrutement des cellules dendritiques BDCA3^{high} dans les tumeurs et leur rôle potentiel ?

Les DC BDCA3^{high} issues de progéniteurs CD34⁺, expriment CXCR4 (données non présentées). Il est donc probable que les DC BDCA3^{high} soient recrutées par SDF1 dans les cancers du sein où cette chimiokine est exprimée (Aravindan et al., 2015). Par ailleurs, les DC BDCA3^{high} expriment également CXCR3 et leur recrutement pourrait donc également être potentialisé par CXCL9, CXCL10 et CXCL11. L'expression de XCR1 à leur surface joue également potentiellement un rôle lorsqu'une réponse immunitaire est installée, les DC BDCA3^{high} étant parfaitement aptes à migrer en présence de XCL1 (Croizat et al., 2010). Notons enfin que les analyses transcriptomiques montrent un niveau d'expression similaire de CCR7 entre les pDC, les DC BDCA1⁺ et les DC BDCA3^{high} circulantes (Balan et al., 2014). Il est probable que les DC BDCA3^{high} soient soumis aux mêmes mécanismes d'inhibition de ce récepteur que les autres sous populations, les empêchant de migrer jusqu'aux organes lymphoïdes. Dans ce cas, il serait malgré tout possible qu'elles initient une réponse T au sein des structures lymphoïdes tertiaires situées à proximité. Cependant, l'analyse du niveau d'expression de ces récepteurs par les DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs serait intéressante pour valider cette hypothèse.

D) Rôle pro- ou anti-tumorale des cellules dendritiques BDCA3^{high} associées aux tumeurs ?

La réponse à cette question, déjà en partie abordée précédemment dans la discussion concernant la présentation croisée d'Ag, est primordiale avant d'envisager toute stratégie thérapeutique. En effet, leur participation à la progression tumorale nous inciterait à inhiber leur fonction, alors que l'initiation d'une réponse T cytotoxique dans le par les DC BDCA3^{high} nous inciterait plutôt à les stimuler.

Un article publié récemment associe un fort ratio en gènes spécifiques des DC BDCA3^{high} vis-à-vis de ceux des autres cellules myéloïdes à un meilleur pronostic clinique dans les cancers du poumon, de la tête et du cou ainsi que dans les mélanomes (Broz et al., 2014). Comme il s'agit d'un ratio, il est possible que cette corrélation soit en fait due à une moindre présence d'autres populations immunosuppressives telles que les macrophages M2. D'autres raisons laissent cependant supposer que les DC BDCA3^{high} puissent agir favorablement sur l'évolution clinique des patients. Tout d'abord, leur expression de Clec9A associé à l'absence d'expression de SIRPα favorise tous deux

l'internalisation d'Ag issues des cellules tumorales et donc potentiellement la présentation croisée de ces derniers aux lymphocytes T CD8 (Murata et al., 2014b; Schreibelt et al., 2012). Ensuite, les travaux effectués chez la souris laissent envisager une interaction avec les cellules NK et les lymphocytes T CD8 activés, par l'intermédiaire des ligands de CRTAM et de XCR1 (Arase et al., 2005; Yamazaki et al., 2010). Nos observations montrent également que les DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs sont capables de produire de l'IFN-λ lorsqu'on les stimule *ex vivo*. Les données actuellement publiées chez la souris montrent que l'IFN-λ induit une réponse anti-tumorale par l'intermédiaire des cellules NK principalement (Lasfar et al., 2006; Sato et al., 2006). Cette cytokine pourrait ainsi prendre le relai de l'IFN-α dont la production est fortement altérée dans les tumeurs. Cependant nous pouvons émettre des doutes sur la reproductibilité de ces résultats chez l'homme à cause de l'absence d'expression de l'IFNLR à la surface des cellules NK chez l'homme. L'hypothèse selon laquelle dans certaines conditions d'activation les cellules NK expriment ce récepteur n'est pas à exclure mais à l'état basal, nous n'avons jamais observé son expression. Les inhibiteurs d'histones déacétylases, déjà utilisées en clinique, pourraient permettre de palier cet obstacle en levant l'inhibition épigénétique de l'expression de l'IFNLR (Ding et al., 2014; West and Johnstone, 2014).

A l'inverse le rôle anti-tumoral des DC BDCA3^{high} peut être modéré par les résultats montrant que des DC traitées avec de l'IFN-λ peuvent tout aussi bien induire la prolifération de Treg ou orienter la différenciation des lymphocytes T vers un profil Th1 (Jordan et al., 2007; Koltsida et al., 2011; Mennechet and Uze, 2006; Sato et al., 2006). Il n'est donc pas certains que l'IFN-λ possède des effets anti-tumoraux aussi importants chez l'homme que ce qui fut observé chez la souris. Pour s'assurer de l'orientation de la réponse immunitaire induite par les DC BDCA3^{high} il faudrait donc élargir le panel de cytokines étudiées. Nous avons commencé l'analyse de leur production d'IL-12 et il apparaît que les DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs sont capables d'en produire (analyse en cours). Ceci laisse supposer qu'elles peuvent induire une réponse de type Th1. Cependant, il nous faudrait aussi analyser leur production d'IL-10 après stimulation mais aucun outil ne permet de le faire correctement par cytométrie chez l'homme aujourd'hui et les trier afin de les stimuler *ex vivo* pour mesurer leur sécrétion d'IL-10 semble également inenvisageable au vue de leur rareté. Il nous faudrait enfin étudier leur capacité à produire des cytokines orientant la différenciation des lymphocytes vers un profil Th2, telle que l'IL-13, en parallèle de l'IL-12, pour déterminer si elles en produisent et si différentes populations émergent sur la base de l'expression exclusive ou de la co-expression de l'IL-12 et de l'IL-13.

En parallèle, il serait important de déterminer si la présentation d'Ag par ces cellules induit une réponse CTL ou une tolérogénicité vis-à-vis de l'Ag présenté. Ceci pourrait être testé, lorsque des échantillons de tumeurs de grande taille et enrichies en cellules immunitaires, nous permettrait d'obtenir après tri quelques milliers de DC BDCA3^{high} que nous pourrions co-cultiver avec des lymphocytes T naïfs. Enfin, l'analyse de

l'expression d'IDO, de PD-1 ou PD-L1 par les DC BDCA3^{high} associées aux tumeurs permettrait également de vérifier qu'elles n'ont pas un rôle pro-tumoral.

E) *Stratégies thérapeutiques basées sur les cellules dendritiques* BDCA3^{high} ?

Lorsque les réponses aux interrogations précédemment discutées auront été apportées il sera possible d'imaginer des stratégies thérapeutiques basées sur la modulation des DC BDCA3^{high} dans le cas où elles ont un impact significatif sur le développement de la réponse immunitaire.

Si, comme les pDC, elles sont détournées de leur fonction initiale et facilitent le développement tumoral, nous pourrions envisager de bloquer leur fonction immunosuppressive. Par exemple, si elles acquièrent l'expression de PD-1 ou PD-L1 comme cela a été montré chez la souris pour les DC (Krempski et al., 2011; Scarlett et al., 2012), cela signifierait que les traitements neutralisant ces récepteurs, et déjà utilisés dans les mélanomes, agissent également sur les DC BDCA3^{high}. Il pourrait alors être intéressant d'appliquer ces traitements aux patients dont les cellules tumorales n'expriment pas PD-1 ou PD-L1 mais dont les DC l'expriment. Par ailleurs, si leur fonction immunosuppressive vient de leur capacité à sécréter de l'IFN- λ , l'utilisation d'anticorps neutralisant pourrait être envisagée. Enfin, si leur immaturité participe à l'induction d'une tolérance suite à la présentation croisée d'Ag tumoraux, une stratégie basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre Clec9A couplés à des molécules cytotoxiques ou des toxines bactériennes pourrait permettre d'éliminer temporairement cette population de DC pour améliorer l'efficacité des traitements, par exemple basés sur le ciblage des « immune checkpoints ».

Au contraire, dans le cas où les DC BDCA3^{high} seraient de bon pronostic mais inhibées par l'environnement tumoral, des stratégies basées sur leur réactivation pourraient être une solution intéressante. L'utilisation d'anticorps dirigés contre Clec9A ou XCR1 et couplés à des antigènes tumoraux permettent d'induire une bonne présentation croisée d'Ag par les DC CD8 α^+ chez la souris (Hartung et al., 2015). Cependant, cette méthode est limitée car elle ne permet pas d'induire une réponse T cytotoxique dirigée contre un large panel d'Ag et autorise donc le développement de résistances par des cellules cancéreuses sous exprimant l'Ag concerné. L'expression de TLR3 par les DC BDCA3^{high} permet aussi d'envisager des thérapies basées sur l'utilisation de polyI:C pour les réactiver. Cette molécule est actuellement utilisée comme adjuvant, à faible dose, car elle peut entraîner de fortes réactions immunitaires à trop forte dose. C'est pourquoi il semble nécessaire de développer des vecteurs permettant de délivrer de façon prolongée ce ligand à proximité des DC BDCA3^{high} infiltrant la tumeur, à l'aide d'anticorps spécifiques, afin de les activer le plus efficacement possible. De nombreuses nanoparticules polymériques sont aujourd'hui en cours de développement et devrait permettre d'améliorer l'efficacité des traitements en augmentant la demi-vie des molécules injectées ainsi que leur concentration au niveau du site tumoral (Prabhu et al.,

2015). Enfin, la vaccination des patients avec des DC obtenues à partir de progéniteurs, *in vitro*, n'est pas abandonnée mais nécessite encore des améliorations pour induire une réponse T cytotoxique efficace.

III. Autres questions liées aux cellules dendritiques BDCA3^{high}

A) Interactions entre les cellules dendritiques BDCA3^{high} et les cellules NK

Les DC et les cellules NK sont connues pour s'activer les unes les autres. Ainsi les DC matures activent la cytotoxicité des cellules NK et leur sécrétion d'IFN- γ par l'intermédiaire de l'IL-12 (Gerosa et al., 2002; Perrot et al., 2010). A l'inverse les cellules NK activées induisent la maturation et la production d'IL-12 par les cellules dendritiques (Gerosa et al., 2002). Les cellules NK, par leur sécrétion d'IL-18, participent aussi à l'induction d'une réponse Th1 et l'activation des lymphocytes T CD8 par les DC (Dao et al., 2005).

Nous avons vu dans la partie **introduction** que les DC BDCA3^{high} expriment les récepteurs XCR1 et Necl2, dont les ligands sont tous deux exprimés chez la souris à la fois par les cellules NK et les lymphocytes T CD8 activés. Il serait intéressant d'étudier la source du ligand XCL1 et l'expression de CRTAM chez l'homme, en activant les différentes sous populations de cellules immunitaires, en commençant par les cellules NK et les lymphocytes T CD8. Par ailleurs, les DC BDCA3^{high} produisent des interférons de type I et de type III après activation par polyI:C. Les interférons de type I, participent chez la souris et chez l'homme à l'induction de la cytotoxicité des cellules NK (Nguyen et al., 2002; Perrot et al., 2010). Chez la souris, ils induisent également la production d'IL-15 par les cellules NK qui participe à la stimulation des lymphocytes T CD8 mémoires (Nguyen et al., 2002; Zhang et al., 1998). L'IFN- λ possédant des propriétés proches de celles de l'IFN- β , il serait intéressant de regarder si cette cytokine agit sur les cellules NK, en évaluant l'induction d'ISG ou la phosphorylation de STAT-1 malgré l'absence de récepteur détecté à la surface des cellules NK. Ceci permettrait de conclure définitivement sur la sensibilité des cellules NK à l'IFN- λ .

Il est également intéressant de noter que des analyses TCGA ont révélé une corrélation entre l'expression de l'IL-12 et les facteurs de transcription Batf3 et IRF8 dans les tumeurs de sein (Ruffell et al., 2014). Ces résultats laissent envisager la présence de cellules BDCA3^{high} sécrétrices d'IL-12 dans ces tumeurs. Cette étude révèle également une corrélation entre les gènes précités et l'expression du Granzyme B et de l'IFN- γ . Ceci ne permet pas de déterminer si la présence de DC corrèle avec la présence de CTL ou de cellules NK car le Granzyme B et l'IFN- γ peuvent être abondamment produit par ces deux populations. Mais cela laisse au moins supposer que la présence de DC BDCA3^{high} est associée à des populations connues pour être de bons pronostics (Galon et al., 2006). La réponse complète aux traitements est d'ailleurs multipliée par deux chez les patientes exprimant fortement ces gènes (Ruffell et al., 2014).

Enfin, nous avons observé que l'IFN- γ et le TFN α , deux cytokines produites par les cellules NK, induisent la présentation croisée d'Ag cellulaire par les DC BDCA3^{high}. Bien que la spécificité de cette induction n'ait pas été vérifiée, elle révèle malgré tout une autre interaction intéressante entre les cellules NK et les DC BDCA3^{high}.

B) Rareté des cellules dendritiques BDCA3^{high} et importance physiologique de cette sous population ?

La rareté des DC BDCA3^{high} questionne leur importance physiologique et en particulier la transposition à l'homme des résultats obtenus chez la souris sur les DC CD8 α ⁺ et CD103⁺.

Tout d'abord, la production d'IFN- λ par les DC BDCA3^{high} est-elle suffisamment forte pour avoir des répercussions plus importantes que l'IFN- λ produit par les pDC qui sont plus nombreuses ? Ensuite, est ce que la réponse à un ligand de TLR3, donc un ARN double brin, a du sens dans un contexte cancéreux ? Il serait ainsi intéressant d'explorer d'autres voies aboutissant à la production d'IFN- λ et pouvant être activées au sein des tumeurs.

De la même manière, est ce que les capacités de présentation croisée des DC BDCA3^{high} sont suffisamment forte pour penser qu'elles puissent avoir un rôle plus important que les DC BDCA1⁺ dans l'initiation d'une réponse T CD8 cytotoxique ? Sachant que les DC BDCA3^{high} ne représentent en moyenne qu'une cellule immunitaire sur cinq cent, il est difficile d'imaginer qu'elles puissent avoir un rôle primordial. Cependant, cette intuition peut également être modérée par le rôle majeure que joue les pDC ou les lymphocytes Treg malgré leur faible nombre. Il est donc difficile d'évaluer l'impact des DC BDCA3^{high} avant d'avoir plus de données, notamment concernant leur corrélation avec le pronostic clinique des patients.

A l'inverse, l'enrichissement en DC BDCA3^{high} dans le foie et le thymus laisse supposer que leur présence possède un intérêt (Dresch et al., 2011; Kelly et al., 2014; Shortman and Heath, 2010; Kelly et al., 2014). Dans le thymus, les DC BDCA3^{high} ont en effet de grandes chances de participer à l'induction de la tolérance centrale en présentant en continue des Ag du soi expliquant leur concentration importante. Elles y produisent également de forte quantité d'IFN- λ après stimulation par un ligand de TLR3, indiquant qu'elles participent aussi probablement à l'immunité antivirale en cas d'infection (Martinez et al., 2015). Dans le foie, nous avons vu qu'elles produisent également de grande quantité d'IFN- λ participant activement à l'immunité contre HCV. L'enrichissement en DC BDCA3^{high} dans cet organe est peut-être lié à leur absence d'expression de SIRP α leur permettant de participer à l'élimination des globules rouges exprimant CD47 et de détecter la présence de certains parasites tels que le *plasmodium*. La grande quantité de sang circulant à travers le foie rend également cet organe intéressant pour la détection de certains virus.

Les réponses à ces questions apparaîtront au fil du temps et donneront alors probablement naissance à de nouvelles questions.

Références

Références

Aarntzen,E.H., Schreibelt,G., Bol,K., Lesterhuis,W.J., Croockewit,A.J., de Wilt,J.H., van Rossum,M.M., Blokx,W.A., Jacobs,J.F., Duiveman-de,B.T., Schuurhuis,D.H., Mus,R., Thielemans,K., de Vries,I.J., Figdor,C.G., Punt,C.J., and Adema,G.J. (2012). Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells responses in stage III and IV melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 18, 5460-5470.

Abushahba,W., Balan,M., Castaneda,I., Yuan,Y., Reuhl,K., Raveche,E., de la Torre,A., Lasfar,A., and Kotenko,S.V. (2010). Antitumor activity of type I and type III interferons in BNL hepatoma model. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1059-1071.

Ahrens,S., Zelenay,S., Sancho,D., Hanc,P., Kjaer,S., Feest,C., Fletcher,G., Durkin,C., Postigo,A., Skehel,M., Batista,F., Thompson,B., Way,M., Reis e Sousa, and Schulz,O. (2012). F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity.* 36, 635-645.

Allan,R.S., Smith,C.M., Belz,G.T., van Lint,A.L., Wakim,L.M., Heath,W.R., and Carbone,F.R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8 α + dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301, 1925-1928.

Ananiev,J., Gulubova,M.V., and Manolova,I.M. (2011). Prognostic significance of CD83 positive tumor-infiltrating dendritic cells and expression of TGF-beta 1 in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 58, 1834-1840.

Ank,N., Iversen,M.B., Bartholdy,C., Staeheli,P., Hartmann,R., Jensen,U.B., Dagnaes-Hansen,F., Thomsen,A.R., Chen,Z., Haugen,H., Klucher,K., and Paludan,S.R. (2008). An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J. Immunol.* 180, 2474-2485.

Arase,N., Takeuchi,A., Unno,M., Hirano,S., Yokosuka,T., Arase,H., and Saito,T. (2005). Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *Int. Immunol.* 17, 1227-1237.

Aravindan,B.K., Prabhakar,J., Somanathan,T., and Subhadra,L. (2015). The role of chemokine receptor 4 and its ligand stromal cell derived factor 1 in breast cancer. *Ann. Transl. Med.* 3, 23.

Artyomov,M.N., Munk,A., Gorvel,L., Korenfeld,D., Cella,M., Tung,T., and Klechevsky,E. (2015). Modular expression analysis reveals functional conservation between human Langerhans cells and mouse cross-priming dendritic cells. *J. Exp. Med.*

Bachelot,T., Ray-Coquard,I., Menetrier-Caux,C., Rastkha,M., Duc,A., and Blay,J.Y. (2003). Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 88, 1721-1726.

Bachem,A., Guttler,S., Hartung,E., Ebstein,F., Schaefer,M., Tannert,A., Salama,A., Movassaghi,K., Opitz,C., Mages,H.W., Henn,V., Kloetzl,P.M., Gurka,S., and Kroczeck,R.A. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1273-1281.

Balan,S., Ollion,V., Colletti,N., Chelbi,R., Montanana-Sanchis,F., Liu,H., Vu Manh,T.P., Sanchez,C., Savoret,J., Perrot,I., Doffin,A.C., Fossum,E., Bechlian,D., Chabannon,C., Bogen,B., Asselin-Paturel,C., Shaw,M., Soos,T., Caux,C., Valladeau-Guilemond,J., and Dalod,M. (2014). Human XCR1+

dendritic cells derived in vitro from CD34+ progenitors closely resemble blood dendritic cells, including their adjuvant responsiveness, contrary to monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 193, 1622-1635.

Balzarolo, M., Karrich, J.J., Engels, S., Blom, B., Medema, J.P., and Wolkers, M.C. (2012). The transcriptional regulator NAB2 reveals a two-step induction of TRAIL in activated plasmacytoid DCs. *Eur. J. Immunol.* 42, 3019-3027.

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

Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Basler, M., Kirk, C.J., and Groettrup, M. (2013). The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 74-80.

Becker, M., Guttler, S., Bachem, A., Hartung, E., Mora, A., Jakel, A., Hutloff, A., Henn, V., Mages, H.W., Gurka, S., and Kroczyk, R.A. (2014). Ontogenic, Phenotypic, and Functional Characterization of XCR1(+) Dendritic Cells Leads to a Consistent Classification of Intestinal Dendritic Cells Based on the Expression of XCR1 and SIRPalpha. *Front Immunol.* 5, 326.

Beitnes, A.C., Raki, M., Brottveit, M., Lundin, K.E., Jahnsen, F.L., and Sollid, L.M. (2012). Rapid accumulation of CD14+CD11c+ dendritic cells in gut mucosa of celiac disease after in vivo gluten challenge. *PLoS. One.* 7, e33556.

Bekeredjian-Ding, I., Schafer, M., Hartmann, E., Pries, R., Parcina, M., Schneider, P., Giese, T., Endres, S., Wollenberg, B., and Hartmann, G. (2009). Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 128, 439-450.

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

Bennaceur, K., Popa, I., Portoukalian, J., Berthier-Vergnes, O., and Peguet-Navarro, J. (2006). Melanoma-derived gangliosides impair migratory and antigen-presenting function of human epidermal Langerhans cells and induce their apoptosis. *Int. Immunol.* 18, 879-886.

Berthier-Vergnes, O., Gaucherand, M., Peguet-Navarro, J., Plouet, J., Pageaux, J.F., Schmitt, D., and Staquet, M.J. (2001). Human melanoma cells inhibit the earliest differentiation steps of human Langerhans cell precursors but failed to affect the functional maturation of epidermal Langerhans cells. *Br. J. Cancer* 85, 1944-1951.

Bethwaite, P.B., Holloway, L.J., Thornton, A., and Delahunt, B. (1996). Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. *Pathology* 28, 321-327.

Bibert, S., Roger, T., Calandra, T., Bochud, M., Cerny, A., Semmo, N., Duong, F.H., Gerlach, T., Malinverni, R., Moradpour, D., Negro, F., Mullhaupt, B., and Bochud, P.Y. (2013). IL28B expression depends on a novel TT/G polymorphism which improves HCV clearance prediction. *J. Exp. Med.* 210, 1109-1116.

Bigley,V., Haniffa,M., Doulatov,S., Wang,X.N., Dickinson,R., McGovern,N., Jardine,L., Pagan,S., Dimmick,I., Chua,I., Wallis,J., Lordan,J., Morgan,C., Kumararatne,D.S., Doffinger,R., van der Burg,M., van,D.J., Cant,A., Dick,J.E., Hambleton,S., and Collin,M. (2011). The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J. Exp. Med.* 208, 227-234.

Bigley,V., McGovern,N., Milne,P., Dickinson,R., Pagan,S., Cookson,S., Haniffa,M., and Collin,M. (2015). Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c+ dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141high XCR1+ dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 97, 627-634.

Blazek,K., Eames,H.L., Weiss,M., Byrne,A.J., Perocheau,D., Pease,J.E., Doyle,S., McCann,F., Williams,R.O., and Udalova,I.A. (2015). IFN-lambda resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1beta production. *J. Exp. Med.* 212, 845-853.

Boles,K.S., Barchet,W., Diacovo,T., Cella,M., and Colonna,M. (2005). The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood* 106, 779-786.

Bonifaz,L., Cervantes-Silva,M., Ontiveros-Dotor,E., Lopez-Villegas,E., and Sanchez-Garcia,F. (2014). A Role For Mitochondria In Antigen Processing And Presentation. *Immunology*.

Borkowski,T.A., Letterio,J.J., Farr,A.G., and Udey,M.C. (1996). A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 184, 2417-2422.

Brahmer,J.R., Tykodi,S.S., Chow,L.Q., Hwu,W.J., Topalian,S.L., Hwu,P., Drake,C.G., Camacho,L.H., Kauh,J., Odunsi,K., Pitot,H.C., Hamid,O., Bhatia,S., Martins,R., Eaton,K., Chen,S., Salay,T.M., Alaparthi,S., Grosso,J.F., Korman,A.J., Parker,S.M., Agrawal,S., Goldberg,S.M., Pardoll,D.M., Gupta,A., and Wigginton,J.M. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2455-2465.

Brand,S., Beigel,F., Olszak,T., Zitzmann,K., Eichhorst,S.T., Otte,J.M., Diebold,J., Diepolder,H., Adler,B., Auernhammer,C.J., Goke,B., and Dambacher,J. (2005a). IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 289, G960-G968.

Brand,S., Zitzmann,K., Dambacher,J., Beigel,F., Olszak,T., Vlotides,G., Eichhorst,S.T., Goke,B., Diepolder,H., and Auernhammer,C.J. (2005b). SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 543-548.

Braun,D., Longman,R.S., and Albert,M.L. (2005). A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 106, 2375-2381.

Breton,G., Lee,J., Zhou,Y.J., Schreiber,J.J., Keler,T., Puhr,S., Anandasabapathy,N., Schlesinger,S., Caskey,M., Liu,K., and Nussenzweig,M.C. (2015). Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 212, 401-413.

Broz,M.L., Binnewies,M., Boldajipour,B., Nelson,A.E., Pollack,J.L., Erle,D.J., Barczak,A., Rosenblum,M.D., Daud,A., Barber,D.L., Amigorena,S., Van't Veer,L.J., Sperling,A.I., Wolf,D.M., and Krummel,M.F. (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell* 26, 638-652.

- Buelens,C., Willems,F., Delvaux,A., Pierard,G., Delville,J.P., Velu,T., and Goldman,M. (1995). Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 2668-2672.
- Burgdorf,S., Kautz,A., Bohnert,V., Knolle,P.A., and Kurts,C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612-616.
- Caminschi,I., Proietto,A.I., Ahmet,F., Kitsoulis,S., Shin,T.J., Lo,J.C., Rizzitelli,A., Wu,L., Vremec,D., van Dommelen,S.L., Campbell,I.K., Maraskovsky,E., Braley,H., Davey,G.M., Mottram,P., van,d., V, Jensen,K., Lew,A.M., Wright,M.D., Heath,W.R., Shortman,K., and Lahoud,M.H. (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112, 3264-3273.
- Carbone,F.R., Belz,G.T., and Heath,W.R. (2004). Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity. *Trends Immunol.* 25, 655-658.
- Casrouge,A., Zhang,S.Y., Eidenschenk,C., Jouanguy,E., Puel,A., Yang,K., Alcais,A., Picard,C., Mahfoufi,N., Nicolas,N., Lorenzo,L., Plancoulaine,S., Senechal,B., Geissmann,F., Tabeta,K., Hoebe,K., Du,X., Miller,R.L., Heron,B., Mignot,C., de Villemeur,T.B., Lebon,P., Dulac,O., Rozenberg,F., Beutler,B., Tardieu,M., Abel,L., and Casanova,J.L. (2006). Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314, 308-312.
- Caux,C., Ait-Yahia,S., Chemin,K., de,B.O., Dieu-Nosjean,M.C., Homey,B., Massacrier,C., Vanbervliet,B., Zlotnik,A., and Vicari,A. (2000). Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin. Immunopathol.* 22, 345-369.
- Caux,C., Dezutter-Dambuyant,C., Schmitt,D., and Banchereau,J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258-261.
- Caux,C., Massacrier,C., Dubois,B., Valladeau,J., Dezutter-Dambuyant,C., Durand,I., Schmitt,D., and Saeland,S. (1999). Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors. *J. Leukoc. Biol.* 66, 781-791.
- Caux,C., Massacrier,C., Vanbervliet,B., Barthelemy,C., Liu,Y.J., and Banchereau,J. (1994). Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int. Immunol.* 6, 1177-1185.
- Caux,C., Vanbervliet,B., Massacrier,C., Dezutter-Dambuyant,C., de Saint-Vis,B., Jacquet,C., Yoneda,K., Imamura,S., Schmitt,D., and Banchereau,J. (1996). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med.* 184, 695-706.
- Cella,M., Jarrossay,D., Facchetti,F., Alebardi,O., Nakajima,H., Lanzavecchia,A., and Colonna,M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5, 919-923.
- Chaperot,L., Blum,A., Manches,O., Lui,G., Angel,J., Molens,J.P., and Plumas,J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 176, 248-255.
- Charles,J., Di,D.J., Salameire,D., Bendriss-Vermare,N., Aspord,C., Muhammad,R., Lefebvre,C., Plumas,J., Leccia,M.T., and Chaperot,L. (2010). Characterization of circulating dendritic cells in

melanoma: role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor. *J. Invest Dermatol.* 130, 1646-1656.

Chatterjee,B., Smed-Sorensen,A., Cohn,L., Chalouni,C., Vandlen,R., Lee,B.C., Widger,J., Keler,T., Delamarre,L., and Mellman,I. (2012). Internalization and endosomal degradation of receptor-bound antigens regulate the efficiency of cross presentation by human dendritic cells. *Blood* 120, 2011-2020.

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

Chiba,S., Baghdadi,M., Akiba,H., Yoshiyama,H., Kinoshita,I., Dosaka-Akita,H., Fujioka,Y., Ohba,Y., Gorman,J.V., Colgan,J.D., Hirashima,M., Uede,T., Takaoka,A., Yagita,H., and Jinushi,M. (2012). Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat. Immunol.* 13, 832-842.

Chicha,L., Jarrossay,D., and Manz,M.G. (2004). Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J. Exp. Med.* 200, 1519-1524.

Chittezhath,M., Dhillon,M.K., Lim,J.Y., Laoui,D., Shalova,I.N., Teo,Y.L., Chen,J., Kamaraj,R., Raman,L., Lum,J., Thamboo,T.P., Chiong,E., Zolezzi,F., Yang,H., Van Ginderachter,J.A., Poidinger,M., Wong,A.S., and Biswas,S.K. (2014). Molecular profiling reveals a tumor-promoting phenotype of monocytes and macrophages in human cancer progression. *Immunity.* 41, 815-829.

Chu,C.C., Ali,N., Karagiannis,P., Di,M.P., Skowera,A., Napolitano,L., Barinaga,G., Grys,K., Sharif-Paghaleh,E., Karagiannis,S.N., Peakman,M., Lombardi,G., and Nestle,F.O. (2012). Resident CD141 (BDCA3)⁺ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J. Exp. Med.* 209, 935-945.

Clark,I.A. and Allison,A.C. (1974). *Babesia microti* and *Plasmodium berghei yoelii* infections in nude mice. *Nature* 252, 328-329.

Coccia,E.M., Severa,M., Giacomini,E., Monneron,D., Remoli,M.E., Julkunen,I., Cella,M., Lande,R., and Uze,G. (2004). Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 796-805.

Cohen,I.R., Globerson,A., and Feldman,M. (1971). Rejection of tumor allografts by mouse spleen cells sensitized in vitro. *J. Exp. Med.* 133, 821-833.

Cohn,L., Chatterjee,B., Esselborn,F., Smed-Sorensen,A., Nakamura,N., Chalouni,C., Lee,B.C., Vandlen,R., Keler,T., Lauer,P., Brockstedt,D., Mellman,I., and Delamarre,L. (2013). Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3⁺ dendritic cells at cross presentation. *J. Exp. Med.* 210, 1049-1063.

Contreras,V., Urien,C., Guiton,R., Alexandre,Y., Vu Manh,T.P., Andrieu,T., Crozat,K., Jouneau,L., Bertho,N., Epardaud,M., Hope,J., Savina,A., Amigorena,S., Bonneau,M., Dalod,M., and Schwartz-Cornil,I. (2010). Existence of CD8alpha-like dendritic cells with a conserved functional specialization and a common molecular signature in distant mammalian species. *J. Immunol.* 185, 3313-3325.

- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757-1764.
- Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342, 1432-1433.
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.A., Ventre, E., Vu Manh, T.P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., Boudinot, P., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., and Dalod, M. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1283-1292.
- Curiel, T.J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K.L., Daniel, B., Zimmermann, M.C., David, O., Burow, M., Gordon, A., Dhurandhar, N., Myers, L., Berggren, R., Hemminki, A., Alvarez, R.D., Emilie, D., Curiel, D.T., Chen, L., and Zou, W. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* 9, 562-567.
- Dadabayev, A.R., Sandel, M.H., Menon, A.G., Morreau, H., Melief, C.J., Offringa, R., van der Burg, S.H., Janssen-van, R.C., Ensink, N.G., Tollenaar, R.A., van de Velde, C.J., and Kuppen, P.J. (2004). Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 978-986.
- Dao, T., Gomez-Nunez, M., Antczak, C., Kappel, B., Jaggi, J.S., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., and Scheinberg, D.A. (2005). Natural killer cells license dendritic cell cross-presentation of B lymphoma cell-associated antigens. *Clin. Cancer Res.* 11, 8763-8772.
- de Groen, R.A., Boltjes, A., Hou, J., Liu, B.S., McPhee, F., Friborg, J., Janssen, H.L., and Boonstra, A. (2015). IFN-lambda-mediated IL-12 production in macrophages induces IFN-gamma production in human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 45, 250-259.
- de Vries, I.J., Lesterhuis, W.J., Scharenborg, N.M., Engelen, L.P., Ruiter, D.J., Gerritsen, M.J., Croockewit, S., Britten, C.M., Torensma, R., Adema, G.J., Figdor, C.G., and Punt, C.J. (2003). Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 9, 5091-5100.
- Deauvieu, F., Ollion, V., Doffin, A.C., Achard, C., Fonteneau, J.F., Verronese, E., Durand, I., Ghittoni, R., Marvel, J., Dezutter-Dambuyant, C., Walzer, T., Vie, H., Perrot, I., Goutagny, N., Caux, C., and Valladeau-Guilemond, J. (2015). Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells. *Int. J. Cancer* 136, 1085-1094.
- del Rio, M.L., Rodriguez-Barbosa, J.I., Kremmer, E., and Forster, R. (2007). *C. J. Immunol.* 178, 6861-6866.
- Della, B.S., Gennaro, M., Vaccari, M., Ferraris, C., Nicola, S., Riva, A., Clerici, M., Greco, M., and Villa, M.L. (2003). Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* 89, 1463-1472.
- Deonarain, R., Verma, A., Porter, A.C., Gewert, D.R., Plataniias, L.C., and Fish, E.N. (2003). Critical roles for IFN-beta in lymphoid development, myelopoiesis, and tumor development: links to tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 13453-13458.

- Dessarthe,B., Thedrez,A., Latouche,J.B., Cabillic,F., Drouet,A., Daniel,P., de La Pintiere,C.T., Catros,V., and Toutirais,O. (2013). CRTAM receptor engagement by Necl-2 on tumor cells triggers cell death of activated Vgamma9Vdelta2 T cells. *J. Immunol.* 190, 4868-4876.
- Dhodapkar,M.V., Steinman,R.M., Krasovsky,J., Munz,C., and Bhardwaj,N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193, 233-238.
- Di,I.J., Ciuffi,A., Fitzmaurice,K., Kelleher,D., Rotger,M., Fellay,J., Martinez,R., Pulit,S., Furrer,H., Gunthard,H.F., Battegay,M., Bernasconi,E., Schmid,P., Hirschel,B., Barnes,E., Klenerman,P., Telenti,A., and Rauch,A. (2011). Estimating the net contribution of interleukin-28B variation to spontaneous hepatitis C virus clearance. *Hepatology* 53, 1446-1454.
- Diamond,M.S., Kinder,M., Matsushita,H., Mashayekhi,M., Dunn,G.P., Archambault,J.M., Lee,H., Arthur,C.D., White,J.M., Kalinke,U., Murphy,K.M., and Schreiber,R.D. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.* 208, 1989-2003.
- Dickensheets,H., Sheikh,F., Park,O., Gao,B., and Donnelly,R.P. (2013). Interferon-lambda (IFN-lambda) induces signal transduction and gene expression in human hepatocytes, but not in lymphocytes or monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 93, 377-385.
- Dieu-Nosjean,M.C., Antoine,M., Danel,C., Heudes,D., Wislez,M., Poulot,V., Rabbe,N., Laurans,L., Tartour,E., de,C.L., Lebecque,S., Fridman,W.H., and Cadranet,J. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol.* 26, 4410-4417.
- Dieu-Nosjean,M.C., Goc,J., Giraldo,N.A., Sautes-Fridman,C., and Fridman,W.H. (2014). Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol.* 35, 571-580.
- Dill,M.T., Duong,F.H., Vogt,J.E., Bibert,S., Bochud,P.Y., Terracciano,L., Papassotiropoulos,A., Roth,V., and Heim,M.H. (2011). Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* 140, 1021-1031.
- Dill,M.T., Makowska,Z., Duong,F.H., Merkofer,F., Filipowicz,M., Baumert,T.F., Tornillo,L., Terracciano,L., and Heim,M.H. (2012). Interferon-gamma-stimulated genes, but not USP18, are expressed in livers of patients with acute hepatitis C. *Gastroenterology* 143, 777-786.
- Ding,S., Khoury-Hanold,W., Iwasaki,A., and Robek,M.D. (2014). Epigenetic reprogramming of the type III interferon response potentiates antiviral activity and suppresses tumor growth. *PLoS. Biol.* 12, e1001758.
- Dolganiuc,A., Kodys,K., Marshall,C., Saha,B., Zhang,S., Bala,S., and Szabo,G. (2012). Type III interferons, IL-28 and IL-29, are increased in chronic HCV infection and induce myeloid dendritic cell-mediated FoxP3+ regulatory T cells. *PLoS. One.* 7, e44915.
- Domanski,P. and Colamonici,O.R. (1996). The type-I interferon receptor. The long and short of it. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 143-151.
- Donnelly,R.P. and Kotenko,S.V. (2010). Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res.* 30, 555-564.

- Donnelly,R.P., Sheikh,F., Kottenko,S.V., and Dickensheets,H. (2004). The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *J. Leukoc. Biol.* 76, 314-321.
- Dorner,B.G., Dorner,M.B., Zhou,X., Opitz,C., Mora,A., Guttler,S., Hutloff,A., Mages,H.W., Ranke,K., Schaefer,M., Jack,R.S., Henn,V., and KroczeK,R.A. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity.* 31, 823-833.
- Doyle,S.E., Schreckhise,H., Khuu-Duong,K., Henderson,K., Rosler,R., Storey,H., Yao,L., Liu,H., Barahmand-pour,F., Sivakumar,P., Chan,C., Birks,C., Foster,D., Clegg,C.H., Wietzke-Braun,P., Mihm,S., and Klucher,K.M. (2006). Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes. *Hepatology* 44, 896-906.
- Dresch,C., Ackermann,M., Vogt,B., de Andrade,P.B., Shortman,K., and Fraefel,C. (2011). Thymic but not splenic CD8(+) DCs can efficiently cross-prime T cells in the absence of licensing factors. *Eur. J. Immunol.* 41, 2544-2555.
- Dumoutier,L., Tounsi,A., Michiels,T., Sommereyns,C., Kottenko,S.V., and Renaud,J.C. (2004). Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 32269-32274.
- Dunn,G.P., Bruce,A.T., Sheehan,K.C., Shankaran,V., Uppaluri,R., Bui,J.D., Diamond,M.S., Koebel,C.M., Arthur,C., White,J.M., and Schreiber,R.D. (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* 6, 722-729.
- Durand,M. and Segura,E. (2015). The known unknowns of the human dendritic cell network. *Front Immunol.* 6, 129.
- Dutertre,C.A., Jourdain,J.P., Rancez,M., Amraoui,S., Fossum,E., Bogen,B., Sanchez,C., Couedel-Court, Richard,Y., Dalod,M., Feuillet,V., Cheyner,R., and Hosmalin,A. (2014). TLR3-responsive, XCR1+, CD141(BDCA-3)+/CD8alpha+-equivalent dendritic cells uncovered in healthy and simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J. Immunol.* 192, 4697-4708.
- Eck,M., Schmausser,B., Scheller,K., Brandlein,S., and Muller-Hermelink,H.K. (2003). Pleiotropic effects of CXC chemokines in gastric carcinoma: differences in CXCL8 and CXCL1 expression between diffuse and intestinal types of gastric carcinoma. *Clin. Exp. Immunol.* 134, 508-515.
- Edelson,B.T., KC,W., Juang,R., Kohyama,M., Benoit,L.A., Klekotka,P.A., Moon,C., Albring,J.C., Ise,W., Michael,D.G., Bhattacharya,D., Stappenbeck,T.S., Holtzman,M.J., Sung,S.S., Murphy,T.L., Hildner,K., and Murphy,K.M. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 823-836.
- Esche,C., Gambotto,A., Satoh,Y., Gerein,V., Robbins,P.D., Watkins,S.C., Lotze,M.T., and Shurin,M.R. (1999a). CD154 inhibits tumor-induced apoptosis in dendritic cells and tumor growth. *Eur. J. Immunol.* 29, 2148-2155.
- Esche,C., Lokshin,A., Shurin,G.V., Gastman,B.R., Rabinowich,H., Watkins,S.C., Lotze,M.T., and Shurin,M.R. (1999b). Tumor's other immune targets: dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 66, 336-344.
- Esche,C., Shurin,G.V., Kirkwood,J.M., Wang,G.Q., Rabinowich,H., Pirtskhalaishvili,G., and Shurin,M.R. (2001). Tumor necrosis factor-alpha-promoted expression of Bcl-2 and inhibition of mitochondrial cytochrome c release mediate resistance of mature dendritic cells to melanoma-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 7, 974s-979s.

- Faget,J., Bendriss-Vermare,N., Gobert,M., Durand,I., Olive,D., Biota,C., Bachelot,T., Treilleux,I., Goddard-Leon,S., Lavergne,E., Chabaud,S., Blay,J.Y., Caux,C., and Menetrier-Caux,C. (2012). ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells. *Cancer Res.* 72, 6130-6141.
- Fallarino,F., Grohmann,U., You,S., McGrath,B.C., Cavener,D.R., Vacca,C., Orabona,C., Bianchi,R., Belladonna,M.L., Volpi,C., Santamaria,P., Fioretti,M.C., and Puccetti,P. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.* 176, 6752-6761.
- Farache,J., Koren,I., Milo,I., Gurevich,I., Kim,K.W., Zigmond,E., Furtado,G.C., Lira,S.A., and Shakhar,G. (2013). Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity.* 38, 581-595.
- Flacher,V., Tripp,C.H., Mairhofer,D.G., Steinman,R.M., Stoitzner,P., Idoyaga,J., and Romani,N. (2014). Murine Langerin+ dermal dendritic cells prime CD8+ T cells while Langerhans cells induce cross-tolerance. *EMBO Mol. Med.* 6, 1191-1204.
- Foucher,E.D., Blanchard,S., Preisser,L., Garo,E., Ifrah,N., Guardiola,P., Delneste,Y., and Jeannin,P. (2013). IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS. One.* 8, e56045.
- Fox,J.C., Nakayama,T., Tyler,R.C., Sander,T.L., Yoshie,O., and Volkman,B.F. (2015). Structural and agonist properties of XCL2, the other member of the C-chemokine subfamily. *Cytokine* 71, 302-311.
- Francois-Newton,V., Magno de Freitas,A.G., Payelle-Brogard,B., Monneron,D., Pichard-Garcia,L., Piehler,J., Pellegrini,S., and Uze,G. (2011). USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon alpha response. *PLoS. One.* 6, e22200.
- Fuertes,M.B., Kacha,A.K., Kline,J., Woo,S.R., Kranz,D.M., Murphy,K.M., and Gajewski,T.F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 α dendritic cells. *J. Exp. Med.* 208, 2005-2016.
- Fujie,H., Tanaka,T., Tagawa,M., Kaijun,N., Watanabe,M., Suzuki,T., Nakayama,K., and Numasaki,M. (2011). Antitumor activity of type III interferon alone or in combination with type I interferon against human non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 102, 1977-1990.
- Fukami,T., Fukuhara,H., Kuramochi,M., Maruyama,T., Isogai,K., Sakamoto,M., Takamoto,S., and Murakami,Y. (2003). Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 107, 53-59.
- Gabrilovich,D., Ishida,T., Oyama,T., Ran,S., Kravtsov,V., Nadaf,S., and Carbone,D.P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92, 4150-4166.
- Gabrilovich,D.I., Corak,J., Ciernik,I.F., Kavanaugh,D., and Carbone,D.P. (1997). Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 3, 483-490.
- Galibert,L., Diemer,G.S., Liu,Z., Johnson,R.S., Smith,J.L., Walzer,T., Comeau,M.R., Rauch,C.T., Wolfson,M.F., Sorensen,R.A., Van der Vuurst de Vries AR, Branstetter,D.G., Koelling,R.M., Scholler,J., Fanslow,W.C., Baum,P.R., Derry,J.M., and Yan,W. (2005). Nectin-like protein 2 defines

a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J. Biol. Chem.* 280, 21955-21964.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H., and Pages, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.

Garon, E.B., Rizvi, N.A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A.S., Eder, J.P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M.J., Felip, E., Lee, J.S., Hellmann, M.D., Hamid, O., Goldman, J.W., Soria, J.C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R.Z., Zhang, J., Luceford, J.K., Rangwala, R., Lubiniecki, G.M., Roach, C., Emancipator, K., and Gandhi, L. (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 372, 2018-2028.

Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., Sulkowski, M., McHutchison, J.G., and Goldstein, D.B. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461, 399-401.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 19, 71-82.

Gerlini, G., Di, G.P., Mariotti, G., Urso, C., Chiarugi, A., Pimpinelli, N., and Borgognoni, L. (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase+ cells correspond to the BDCA2+ plasmacytoid dendritic cells in human melanoma sentinel nodes. *J. Invest Dermatol.* 130, 898-901.

Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195, 327-333.

Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubreau, M., Dai, X.M., Stanley, E.R., Randolph, G.J., and Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* 7, 265-273.

Giraldo, N.A., Becht, E., Pages, F., Skliris, G., Verkarre, V., Vano, Y., Mejean, A., Saint-Aubert, N., Lacroix, L., Natario, I., Lupo, A., Alifano, M., Damotte, D., Cazes, A., Triebel, F., Freeman, G.J., Dieu-Nosjean, M.C., Oudard, S., Fridman, W.H., and Sautes-Fridman, C. (2015). Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin. Cancer Res.* 21, 3031-3040.

Goc, J., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M.C. (2013). Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. *Oncoimmunology*. 2, e26836.

Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de, C.L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., Validire, P., Remark, R., Hammond, S.A., Cremer, I., Damotte, D., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M.C. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* 74, 705-715.

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

Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L.P., Hood, L., and Zaller, D.M. (1993). Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* 72, 551-560.

- Gresser,I., Belardelli,F., Maury,C., Maunoury,M.T., and Tovey,M.G. (1983). Injection of mice with antibody to interferon enhances the growth of transplantable murine tumors. *J. Exp. Med.* 158, 2095-2107.
- Guilliams,M., Ginhoux,F., Jakubzick,C., Naik,S.H., Onai,N., Schraml,B.U., Segura,E., Tussiwand,R., and Yona,S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 571-578.
- Gurka,S., Hartung,E., Becker,M., and KroczeK,R.A. (2015). Mouse Conventional Dendritic Cells Can be Universally Classified Based on the Mutually Exclusive Expression of XCR1 and SIRPalpha. *Front Immunol.* 6, 35.
- Han,Y., Chen,Z., Yang,Y., Jiang,Z., Gu,Y., Liu,Y., Lin,C., Pan,Z., Yu,Y., Jiang,M., Zhou,W., and Cao,X. (2014). Human CD14+ CTLA-4+ regulatory dendritic cells suppress T-cell response by cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-dependent IL-10 and indoleamine-2,3-dioxygenase production in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 59, 567-579.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hanc,P., Fujii,T., Iborra,S., Yamada,Y., Huotari,J., Schulz,O., Ahrens,S., Kjaer,S., Way,M., Sancho,D., Namba,K., and Reis e Sousa (2015). Structure of the Complex of F-Actin and DNGR-1, a C-Type Lectin Receptor Involved in Dendritic Cell Cross-Presentation of Dead Cell-Associated Antigens. *Immunity.* 42, 839-849.
- Haniffa,M., Shin,A., Bigley,V., McGovern,N., Teo,P., See,P., Wasan,P.S., Wang,X.N., Malinarich,F., Malleret,B., Larbi,A., Tan,P., Zhao,H., Poidinger,M., Pagan,S., Cookson,S., Dickinson,R., Dimmick,I., Jarrett,R.F., Renia,L., Tam,J., Song,C., Connolly,J., Chan,J.K., Gehring,A., Bertoletti,A., Collin,M., and Ginhoux,F. (2012). Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity.* 37, 60-73.
- Hart,D.N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-3287.
- Hartmann,E., Wollenberg,B., Rothenfusser,S., Wagner,M., Wellisch,D., Mack,B., Giese,T., Gires,O., Endres,S., and Hartmann,G. (2003). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* 63, 6478-6487.
- Hartung,E., Becker,M., Bachem,A., Reeg,N., Jakel,A., Hutloff,A., Weber,H., Weise,C., Giesecke,C., Henn,V., Gurka,S., Anastassiadis,K., Mages,H.W., and KroczeK,R.A. (2015). Induction of potent CD8 T cell cytotoxicity by specific targeting of antigen to cross-presenting dendritic cells in vivo via murine or human XCR1. *J. Immunol.* 194, 1069-1079.
- Henri,S., Poulin,L.F., Tamoutounour,S., Ardouin,L., Guilliams,M., de,B.B., Devillard,E., Viret,C., Azukizawa,H., Kissenpfennig,A., and Malissen,B. (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 207, 189-206.
- Hespel,C. and Moser,M. (2012). Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Eur. J. Immunol.* 42, 2535-2543.

- Hildner,K., Edelson,B.T., Purtha,W.E., Diamond,M., Matsushita,H., Kohyama,M., Calderon,B., Schraml,B.U., Unanue,E.R., Diamond,M.S., Schreiber,R.D., Murphy,T.L., and Murphy,K.M. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100.
- Hillyer,P., Mane,V.P., Schramm,L.M., Puig,M., Verthelyi,D., Chen,A., Zhao,Z., Navarro,M.B., Kirschman,K.D., Bykadi,S., Jubin,R.G., and Rabin,R.L. (2012). Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent. *Immunol. Cell Biol.* 90, 774-783.
- Hochrein,H., Shortman,K., Vremec,D., Scott,B., Hertzog,P., and O'Keeffe,M. (2001). Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 166, 5448-5455.
- Hodi,F.S., O'Day,S.J., McDermott,D.F., Weber,R.W., Sosman,J.A., Haanen,J.B., Gonzalez,R., Robert,C., Schadendorf,D., Hassel,J.C., Akerley,W., van den Eertwegh,A.J., Lutzky,J., Lorigan,P., Vaubel,J.M., Linette,G.P., Hogg,D., Ottensmeier,C.H., Lebbe,C., Peschel,C., Quirt,I., Clark,J.I., Wolchok,J.D., Weber,J.S., Tian,J., Yellin,M.J., Nichol,G.M., Hoos,A., and Urba,W.J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711-723.
- Hoffmann,T.K., Muller-Berghaus,J., Ferris,R.L., Johnson,J.T., Storkus,W.J., and Whiteside,T.L. (2002). Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 8, 1787-1793.
- Honda,M., Sakai,A., Yamashita,T., Nakamoto,Y., Mizukoshi,E., Sakai,Y., Yamashita,T., Nakamura,M., Shirasaki,T., Horimoto,K., Tanaka,Y., Tokunaga,K., Mizokami,M., and Kaneko,S. (2010). Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 139, 499-509.
- Hou,W., Wang,X., Ye,L., Zhou,L., Yang,Z.Q., Riedel,E., and Ho,W.Z. (2009). Lambda interferon inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J. Virol.* 83, 3834-3842.
- Huang,J., Smirnov,S.V., Lewis-Antes,A., Balan,M., Li,W., Tang,S., Silke,G.V., Putz,M.M., Smith,G.L., and Kotenko,S.V. (2007). Inhibition of type I and type III interferons by a secreted glycoprotein from Yaba-like disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 9822-9827.
- Hwu,P., Du,M.X., Lapointe,R., Do,M., Taylor,M.W., and Young,H.A. (2000). Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* 164, 3596-3599.
- Igyarto,B.Z., Haley,K., Ortner,D., Bobr,A., Gerami-Nejad,M., Edelson,B.T., Zurawski,S.M., Malissen,B., Zurawski,G., Berman,J., and Kaplan,D.H. (2011). Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity.* 35, 260-272.
- Igyarto,B.Z. and Kaplan,D.H. (2013). Antigen presentation by Langerhans cells. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 115-119.
- Inaba,K., Inaba,M., Romani,N., Aya,H., Deguchi,M., Ikehara,S., Muramatsu,S., and Steinman,R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176, 1693-1702.

Inoshima,N., Nakanishi,Y., Minami,T., Izumi,M., Takayama,K., Yoshino,I., and Hara,N. (2002). The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 3480-3486.

ISAACS,A. and LINDENMANN,J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 147, 258-267.

Ishida,A., Ohta,M., Toda,M., Murata,T., Usui,T., Akita,K., Inoue,M., and Nakada,H. (2008). Mucin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells during maturation. *Proteomics.* 8, 3342-3349.

Iwamoto,M., Shinohara,H., Miyamoto,A., Okuzawa,M., Mabuchi,H., Nohara,T., Gon,G., Toyoda,M., and Tanigawa,N. (2003). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 104, 92-97.

Iwasaki,A. and Medzhitov,R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987-995.

James,B.R., Brincks,E.L., Kucaba,T.A., Boon,L., and Griffith,T.S. (2014). Effective TRAIL-based immunotherapy requires both plasmacytoid and CD8alpha dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 63, 685-697.

Jongbloed,S.L., Kassianos,A.J., McDonald,K.J., Clark,G.J., Ju,X., Angel,C.E., Chen,C.J., Dunbar,P.R., Wadley,R.B., Jeet,V., Vulink,A.J., Hart,D.N., and Radford,K.J. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* 207, 1247-1260.

Jordan,W.J., Eskdale,J., Srinivas,S., Pekarek,V., Kelner,D., Rodia,M., and Gallagher,G. (2007). Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. *Genes Immun.* 8, 254-261.

Kalb,M.L., Glaser,A., Stary,G., Koszik,F., and Stingl,G. (2012). TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN-alpha-mediated antitumor reactivity. *J. Immunol.* 188, 1583-1591.

Kel,J.M., Girard-Madoux,M.J., Reizis,B., and Clausen,B.E. (2010). TGF-beta is required to maintain the pool of immature Langerhans cells in the epidermis. *J. Immunol.* 185, 3248-3255.

Kelly,A., Fahey,R., Fletcher,J.M., Keogh,C., Carroll,A.G., Siddachari,R., Geoghegan,J., Hegarty,J.E., Ryan,E.J., and O'Farrelly,C. (2014). CD141(+) myeloid dendritic cells are enriched in healthy human liver. *J. Hepatol.* 60, 135-142.

Kim,M., Truong,N.R., James,V., Bosnjak,L., Sandgren,K.J., Harman,A.N., Nasr,N., Bertram,K.M., Olbourne,N., Sawleshwarkar,S., McKinnon,K., Cohen,R.C., and Cunningham,A.L. (2015). Relay of Herpes Simplex Virus between Langerhans Cells and Dermal Dendritic Cells in Human Skin. *PLoS. Pathog.* 11, e1004812.

Klareskog,L., Tjernlund,U., Forsum,U., and Peterson,P.A. (1977). Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268, 248-250.

Klechevsky,E., Morita,R., Liu,M., Cao,Y., Coquery,S., Thompson-Snipes,L., Briere,F., Chaussabel,D., Zurawski,G., Palucka,A.K., Reiter,Y., Banchereau,J., and Ueno,H. (2008). Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity.* 29, 497-510.

- Kobayashi,M., Suzuki,K., Yashi,M., Yuzawa,M., Takayashiki,N., and Morita,T. (2007). Tumor infiltrating dendritic cells predict treatment response to immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 27, 1137-1141.
- Koebel,C.M., Vermi,W., Swann,J.B., Zerafa,N., Rodig,S.J., Old,L.J., Smyth,M.J., and Schreiber,R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903-907.
- Koltsida,O., Hausding,M., Stavropoulos,A., Koch,S., Tzelepis,G., Ubel,C., Kotenko,S.V., Sideras,P., Lehr,H.A., Tepe,M., Klucher,K.M., Doyle,S.E., Neurath,M.F., Finotto,S., and Andreakos,E. (2011). IL-28A (IFN-lambda2) modulates lung DC function to promote Th1 immune skewing and suppress allergic airway disease. *EMBO Mol. Med.* 3, 348-361.
- Kondylis,V., van Nispen Tot Pannerden HE, van,D.S., Ten,B.T., Wubbolts,R., Geerts,W.J., Seinen,C., Mutis,T., and Heijnen,H.F. (2013). Endosome-mediated autophagy: an unconventional MHC-driven autophagic pathway operational in dendritic cells. *Autophagy.* 9, 861-880.
- Kotenko,S.V., Gallagher,G., Baurin,V.V., Lewis-Antes,A., Shen,M., Shah,N.K., Langer,J.A., Sheikh,F., Dickensheets,H., and Donnelly,R.P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4, 69-77.
- Kotenko,S.V. and Langer,J.A. (2004). Full house: 12 receptors for 27 cytokines. *Int. Immunopharmacol.* 4, 593-608.
- Krempski,J., Karyampudi,L., Behrens,M.D., Erskine,C.L., Hartmann,L., Dong,H., Goode,E.L., Kalli,K.R., and Knutson,K.L. (2011). Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. *J. Immunol.* 186, 6905-6913.
- Krishnan,K., Singh,B., and Krolewski,J.J. (1998). Identification of amino acid residues critical for the Src-homology 2 domain-dependent docking of Stat2 to the interferon alpha receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 19495-19501.
- Kroczyńska,B., Joshi,S., Eklund,E.A., Verma,A., Kotenko,S.V., Fish,E.N., and Plataniias,L.C. (2011). Regulatory effects of ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) in IFNlambda signaling. *J. Biol. Chem.* 286, 1147-1156.
- Kuales,M.A., Wenzel,J., Schmid-Wendtner,M.H., Bieber,T., and von,B.D. (2011). Myeloid CD11c+ S100+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase at the inflammatory border to invasive lower lip squamous cell carcinoma. *Histol. Histopathol.* 26, 997-1006.
- Kuwajima,S., Sato,T., Ishida,K., Tada,H., Tezuka,H., and Ohteki,T. (2006). Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat. Immunol.* 7, 740-746.
- Kyewski,B. and Klein,L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 571-606.
- Labidi-Galy,S.I., Sisirak,V., Meeus,P., Gobert,M., Treilleux,I., Bajard,A., Combes,J.D., Faget,J., Mithieux,F., Cassagnol,A., Tredan,O., Durand,I., Menetrier-Caux,C., Caux,C., Blay,J.Y., Ray-Coquard,I., and Bendriss-Vermare,N. (2011). Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 71, 5423-5434.

- Ladanyi,A., Kiss,J., Somlai,B., Gilde,K., Fejos,Z., Mohos,A., Gaudi,I., and Timar,J. (2007). Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 1459-1469.
- Lasfar,A., Abushahba,W., Balan,M., and Cohen-Solal,K.A. (2011). Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 349575.
- Lasfar,A., Lewis-Antes,A., Smirnov,S.V., Anantha,S., Abushahba,W., Tian,B., Reuhl,K., Dickensheets,H., Sheikh,F., Donnelly,R.P., Raveche,E., and Kotenko,S.V. (2006). Characterization of the mouse IFN-lambda ligand-receptor system: IFN-lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma. *Cancer Res.* 66, 4468-4477.
- Lauterbach,H., Bathke,B., Gilles,S., Traidl-Hoffmann,C., Lubber,C.A., Fejer,G., Freudenberg,M.A., Davey,G.M., Vremec,D., Kallies,A., Wu,L., Shortman,K., Chaplin,P., Suter,M., O'Keefe,M., and Hochrein,H. (2010). Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *J. Exp. Med.* 207, 2703-2717.
- Le,M., I, Poujol,D., Sanlaville,A., Sisirak,V., Gobert,M., Durand,I., Dubois,B., Treilleux,I., Marvel,J., Vlach,J., Blay,J.Y., Bendriss-Vermare,N., Caux,C., Puisieux,I., and Goutagny,N. (2013). Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer Res.* 73, 4629-4640.
- Leach,D.R., Krummel,M.F., and Allison,J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734-1736.
- Lee,H.C., Narayanan,S., Park,S.J., Seong,S.Y., and Hahn,Y.S. (2014). Transcriptional regulation of IFN-lambda genes in hepatitis C virus-infected hepatocytes via IRF-3,IRF-7,NF-kappaB complex. *J. Biol. Chem.* 289, 5310-5319.
- Lee,H.K., Mattei,L.M., Steinberg,B.E., Alberts,P., Lee,Y.H., Chervonsky,A., Mizushima,N., Grinstein,S., and Iwasaki,A. (2010). In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity.* 32, 227-239.
- Lee,J., Breton,G., Oliveira,T.Y., Zhou,Y.J., Aljoufi,A., Puhr,S., Cameron,M.J., Sekaly,R.P., Nussenzweig,M.C., and Liu,K. (2015). Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J. Exp. Med.* 212, 385-399.
- Lee,J.H., Chen,Y., Chan,J.L., Qian,Y.W., and Goydos,J.S. (2011). Molecular analysis of melanoma-induced sentinel lymph node immune dysfunction. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 685-692.
- Lei,Y., Ripen,A.M., Ishimaru,N., Ohigashi,I., Nagasawa,T., Jeker,L.T., Bosl,M.R., Hollander,G.A., Hayashi,Y., Malefyt,R.W., Nitta,T., and Takahama,Y. (2011). Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* 208, 383-394.
- Lespagnard,L., Gancberg,D., Rouas,G., Leclercq,G., de Saint-Aubain,S.N., Di,L.A., Piccart,M., Verhest,A., and Larsimont,D. (1999). Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. *Int. J. Cancer* 84, 309-314.
- Li,J., Ahmet,F., Sullivan,L.C., Brooks,A.G., Kent,S.J., De,R.R., Salazar,A.M., Reis e Sousa, Shortman,K., Lahoud,M.H., Heath,W.R., and Caminschi,I. (2015). Antibodies targeting Clec9A

promote strong humoral immunity without adjuvant in mice and non-human primates. *Eur. J. Immunol.* 45, 854-864.

Li,Q., Kawamura,K., Ma,G., Iwata,F., Numasaki,M., Suzuki,N., Shimada,H., and Tagawa,M. (2010). Interferon-lambda induces G1 phase arrest or apoptosis in oesophageal carcinoma cells and produces anti-tumour effects in combination with anti-cancer agents. *Eur. J. Cancer* 46, 180-190.

Li,W., Lewis-Antes,A., Huang,J., Balan,M., and Kotenko,S.V. (2008). Regulation of apoptosis by type III interferons. *Cell Prolif.* 41, 960-979.

Lin,M.L., Zhan,Y., Proietto,A.I., Prato,S., Wu,L., Heath,W.R., Villadangos,J.A., and Lew,A.M. (2008). Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 3029-3034.

LINDENMANN,J., BURKE,D.C., and ISAACS,A. (1957). Studies on the production, mode of action and properties of interferon. *Br. J. Exp. Pathol.* 38, 551-562.

Lindstedt,M., Lundberg,K., and Borrebaeck,C.A. (2005). Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J. Immunol.* 175, 4839-4846.

Lippitz,B.E. (2013). Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 14, e218-e228.

Liu,K., Victora,G.D., Schwickert,T.A., Guernonprez,P., Meredith,M.M., Yao,K., Chu,F.F., Randolph,G.J., Rudensky,A.Y., and Nussenzweig,M. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392-397.

Liu,M.Q., Zhou,D.J., Wang,X., Zhou,W., Ye,L., Li,J.L., Wang,Y.Z., and Ho,W.Z. (2012). IFN-lambda3 inhibits HIV infection of macrophages through the JAK-STAT pathway. *PLoS. One.* 7, e35902.

Lo,B.K., Yu,M., Zloty,D., Cowan,B., Shapiro,J., and McElwee,K.J. (2010). CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. *Am. J. Pathol.* 176, 2435-2446.

Lowes,M.A., Chamian,F., Abello,M.V., Fuentes-Duculan,J., Lin,S.L., Nussbaum,R., Novitskaya,I., Carbonaro,H., Cardinale,I., Kikuchi,T., Gilleaudeau,P., Sullivan-Whalen,M., Wittkowski,K.M., Papp,K., Garovoy,M., Dummer,W., Steinman,R.M., and Krueger,J.G. (2005). Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 19057-19062.

Ma,Y., Shurin,G.V., Peiyuan,Z., and Shurin,M.R. (2013). Dendritic cells in the cancer microenvironment. *J. Cancer* 4, 36-44.

Mant,A., Chinnery,F., Elliott,T., and Williams,A.P. (2012). The pathway of cross-presentation is influenced by the particle size of phagocytosed antigen. *Immunology* 136, 163-175.

Mantegazza,A.R., Magalhaes,J.G., Amigorena,S., and Marks,M.S. (2013). Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic.* 14, 135-152.

Marcello,T., Grakoui,A., Barba-Spaeth,G., Machlin,E.S., Kotenko,S.V., MacDonald,M.R., and Rice,C.M. (2006). Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 131, 1887-1898.

- Martinez,V.G., Canseco,N.M., Hidalgo,L., Valencia,J., Entrena,A., Fernandez-Sevilla,L.M., Hernandez-Lopez,C., Sacedon,R., Vicente,A., and Varas,A. (2015). A discrete population of IFN lambda-expressing BDCA3 dendritic cells is present in human thymus. *Immunol. Cell Biol.*
- Matsui,T., Connolly,J.E., Michnevitz,M., Chaussabel,D., Yu,C.I., Glaser,C., Tindle,S., Pypaert,M., Freitas,H., Piqueras,B., Banchereau,J., and Palucka,A.K. (2009). CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J. Immunol.* 182, 6815-6823.
- Maurya,N., Gujar,R., Gupta,M., Yadav,V., Verma,S., and Sen,P. (2014). Immunoregulation of dendritic cells by the receptor T cell Ig and mucin protein-3 via Bruton's tyrosine kinase and c-Src. *J. Immunol.* 193, 3417-3425.
- McDole,J.R., Wheeler,L.W., McDonald,K.G., Wang,B., Konjufca,V., Knoop,K.A., Newberry,R.D., and Miller,M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* 483, 345-349.
- McGovern,N., Schlitzer,A., Gunawan,M., Jardine,L., Shin,A., Poyner,E., Green,K., Dickinson,R., Wang,X.N., Low,D., Best,K., Covins,S., Milne,P., Pagan,S., Aljefri,K., Windebank,M., Miranda-Saavedra,D., Larbi,A., Wasan,P.S., Duan,K., Poidinger,M., Bigley,V., Ginhoux,F., Collin,M., and Haniffa,M. (2014). Human dermal CD14(+) cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity.* 41, 465-477.
- McLaughlin,P., Grillo-Lopez,A.J., Link,B.K., Levy,R., Czuczman,M.S., Williams,M.E., Heyman,M.R., Bence-Bruckler,I., White,C.A., Cabanillas,F., Jain,V., Ho,A.D., Lister,J., Wey,K., Shen,D., and Dallaire,B.K. (1998). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* 16, 2825-2833.
- Meager,A., Visvalingam,K., Dilger,P., Bryan,D., and Wadhwa,M. (2005). Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Cytokine* 31, 109-118.
- Megjugorac,N.J., Gallagher,G.E., and Gallagher,G. (2009). Modulation of human plasmacytoid DC function by IFN-lambda1 (IL-29). *J. Leukoc. Biol.* 86, 1359-1363.
- Meixlsperger,S., Leung,C.S., Ramer,P.C., Pack,M., Vanoaica,L.D., Breton,G., Pascolo,S., Salazar,A.M., Dzionek,A., Schmitz,J., Steinman,R.M., and Munz,C. (2013). CD141+ dendritic cells produce prominent amounts of IFN-alpha after dsRNA recognition and can be targeted via DEC-205 in humanized mice. *Blood* 121, 5034-5044.
- Mellman,I. and Steinman,R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.
- Menetrier-Caux,C., Montmain,G., Dieu,M.C., Bain,C., Favrot,M.C., Caux,C., and Blay,J.Y. (1998). Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92, 4778-4791.
- Mennechet,F.J. and Uze,G. (2006). Interferon-lambda-treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells. *Blood* 107, 4417-4423.
- Michielsen,A.J., Hogan,A.E., Marry,J., Tosetto,M., Cox,F., Hyland,J.M., Sheahan,K.D., O'Donoghue,D.P., Mulcahy,H.E., Ryan,E.J., and O'Sullivan,J.N. (2011). Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PLoS. One.* 6, e27944.

- Miknis,Z.J., Magracheva,E., Li,W., Zdanov,A., Kotenko,S.V., and Wlodawer,A. (2010). Crystal structure of human interferon-lambda1 in complex with its high-affinity receptor interferon-lambdaR1. *J. Mol. Biol.* 404, 650-664.
- Misumi,I. and Whitmire,J.K. (2014). IFN-lambda exerts opposing effects on T cell responses depending on the chronicity of the virus infection. *J. Immunol.* 192, 3596-3606.
- Mittal,D., Gubin,M.M., Schreiber,R.D., and Smyth,M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 16-25.
- Mittal,S.K. and Roche,P.A. (2015). Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr. Opin. Immunol.* 34C, 22-27.
- Mollah,S.A., Dobrin,J.S., Feder,R.E., Tse,S.W., Matos,I.G., Cheong,C., Steinman,R.M., and Anandasabapathy,N. (2014). Flt3L dependence helps define an uncharacterized subset of murine cutaneous dendritic cells. *J. Invest Dermatol.* 134, 1265-1275.
- Movassagh,M., Spatz,A., Davoust,J., Lebecque,S., Romero,P., Pittet,M., Rimoldi,D., Lienard,D., Gugerli,O., Ferradini,L., Robert,C., Avril,M.F., Zitvogel,L., and Angevin,E. (2004). Selective accumulation of mature DC-Lamp+ dendritic cells in tumor sites is associated with efficient T-cell-mediated antitumor response and control of metastatic dissemination in melanoma. *Cancer Res.* 64, 2192-2198.
- Mowat,A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331-341.
- Muir,A.J., Shiffman,M.L., Zaman,A., Yoffe,B., de la Torre,A., Flamm,S., Gordon,S.C., Marotta,P., Vierling,J.M., Lopez-Talavera,J.C., Byrnes-Blake,K., Fontana,D., Freeman,J., Gray,T., Hausman,D., Hunder,N.N., and Lawitz,E. (2010). Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52, 822-832.
- Muller,U., Steinhoff,U., Reis,L.F., Hemmi,S., Pavlovic,J., Zinkernagel,R.M., and Aguet,M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918-1921.
- Murakami,Y. (2005). Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci.* 96, 543-552.
- Murata,K., Sugiyama,M., Kimura,T., Yoshio,S., Kanto,T., Kirikae,I., Saito,H., Aoki,Y., Hiramane,S., Matsui,T., Ito,K., Korenaga,M., Imamura,M., Masaki,N., and Mizokami,M. (2014a). Ex vivo induction of IFN-lambda3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J. Gastroenterol.* 49, 126-137.
- Murata,Y., Kotani,T., Ohnishi,H., and Matozaki,T. (2014b). The CD47-SIRPalpha signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *J. Biochem.* 155, 335-344.
- Nagao,K., Ginhoux,F., Leitner,W.W., Motegi,S., Bennett,C.L., Clausen,B.E., Merad,M., and Udey,M.C. (2009). Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 3312-3317.

- Nagorsen,D., Voigt,S., Berg,E., Stein,H., Thiel,E., and Loddenkemper,C. (2007). Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J. Transl. Med.* 5, 62.
- Nakano,H., Moran,T.P., Nakano,K., Gerrish,K.E., Bortner,C.D., and Cook,D.N. (2015). Complement Receptor C5aR1/CD88 and Dipeptidyl Peptidase-4/CD26 Define Distinct Hematopoietic Lineages of Dendritic Cells. *J. Immunol.* 194, 3808-3819.
- Nakayama,M. (2014). Antigen Presentation by MHC-Dressed Cells. *Front Immunol.* 5, 672.
- Nestle,F.O., Burg,G., Fah,J., Wrone-Smith,T., and Nickoloff,B.J. (1997). Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am. J. Pathol.* 150, 641-651.
- Nestle,F.O., Conrad,C., Tun-Kyi,A., Homey,B., Gombert,M., Boyman,O., Burg,G., Liu,Y.J., and Gilliet,M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J. Exp. Med.* 202, 135-143.
- Nestle,F.O., Zheng,X.G., Thompson,C.B., Turka,L.A., and Nickoloff,B.J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol.* 151, 6535-6545.
- Nguyen,K.B., Watford,W.T., Salomon,R., Hofmann,S.R., Pien,G.C., Morinobu,A., Gadina,M., O'Shea,J.J., and Biron,C.A. (2002). Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297, 2063-2066.
- Nguyen,N.T., Kimura,A., Nakahama,T., Chinen,I., Masuda,K., Nohara,K., Fujii-Kuriyama,Y., and Kishimoto,T. (2010). Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 19961-19966.
- Nizzoli,G., Krietsch,J., Weick,A., Steinfelder,S., Facciotti,F., Gruarin,P., Bianco,A., Steckel,B., Moro,M., Crosti,M., Romagnani,C., Stolzel,K., Torretta,S., Pignataro,L., Scheibenbogen,C., Neddermann,P., De,F.R., Abrignani,S., and Geginat,J. (2013). Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 122, 932-942.
- Nowak,A.K., Lake,R.A., Marzo,A.L., Scott,B., Heath,W.R., Collins,E.J., Frelinger,J.A., and Robinson,B.W. (2003). Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J. Immunol.* 170, 4905-4913.
- Numasaki,M., Tagawa,M., Iwata,F., Suzuki,T., Nakamura,A., Okada,M., Iwakura,Y., Aiba,S., and Yamaya,M. (2007). IL-28 elicits antitumor responses against murine fibrosarcoma. *J. Immunol.* 178, 5086-5098.
- Nussenzweig,M.C., Steinman,R.M., Gutchinov,B., and Cohn,Z.A. (1980). Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 152, 1070-1084.
- Ochando,J.C., Homma,C., Yang,Y., Hidalgo,A., Garin,A., Tacke,F., Angeli,V., Li,Y., Boros,P., Ding,Y., Jessberger,R., Trinchieri,G., Lira,S.A., Randolph,G.J., and Bromberg,J.S. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* 7, 652-662.

- Ohtani,H., Jin,Z., Takegawa,S., Nakayama,T., and Yoshie,O. (2009). Abundant expression of CXCL9 (MIG) by stromal cells that include dendritic cells and accumulation of CXCR3+ T cells in lymphocyte-rich gastric carcinoma. *J. Pathol.* 217, 21-31.
- Onai,N., Obata-Onai,A., Schmid,M.A., Ohteki,T., Jarrossay,D., and Manz,M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* 8, 1207-1216.
- Onoguchi,K., Yoneyama,M., Takemura,A., Akira,S., Taniguchi,T., Namiki,H., and Fujita,T. (2007). Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J. Biol. Chem.* 282, 7576-7581.
- Osterlund,P.I., Pietila,T.E., Veckman,V., Kotenko,S.V., and Julkunen,I. (2007). IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J. Immunol.* 179, 3434-3442.
- Park,H.Y., Light,A., Lahoud,M.H., Caminschi,I., Tarlinton,D.M., and Shortman,K. (2013). Evolution of B cell responses to Clec9A-targeted antigen. *J. Immunol.* 191, 4919-4925.
- Peguet-Navarro,J., Sportouch,M., Popa,I., Berthier,O., Schmitt,D., and Portoukalian,J. (2003). Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J. Immunol.* 170, 3488-3494.
- Pekarek,V., Srinivas,S., Eskdale,J., and Gallagher,G. (2007). Interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) induces ELR(-) CXC chemokine mRNA in human peripheral blood mononuclear cells, in an IFN-gamma-independent manner. *Genes Immun.* 8, 177-180.
- Perrot,I., Deauvieu,F., Massacrier,C., Hughes,N., Garrone,P., Durand,I., Demaria,O., Viaud,N., Gauthier,L., Blery,M., Bonnefoy-Berard,N., Morel,Y., Tschopp,J., Alexopoulou,L., Trinchieri,G., Paturel,C., and Caux,C. (2010). TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J. Immunol.* 185, 2080-2088.
- Picco,G., Beatson,R., Taylor-Papadimitriou,J., and Burchell,J.M. (2014). Targeting DNGR-1 (CLEC9A) with antibody/MUC1 peptide conjugates as a vaccine for carcinomas. *Eur. J. Immunol.* 44, 1947-1955.
- Pinzon-Charry,A., Ho,C.S., Maxwell,T., McGuckin,M.A., Schmidt,C., Furnival,C., Pyke,C.M., and Lopez,J.A. (2007). Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br. J. Cancer* 97, 1251-1259.
- Pirtskhalaishvili,G., Shurin,G.V., Gambotto,A., Esche,C., Wahl,M., Yurkovetsky,Z.R., Robbins,P.D., and Shurin,M.R. (2000). Transduction of dendritic cells with Bcl-xL increases their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in mice. *J. Immunol.* 165, 1956-1964.
- Pizzurro,G.A. and Barrio,M.M. (2015). Dendritic cell-based vaccine efficacy: aiming for hot spots. *Front Immunol.* 6, 91.
- Platanias,L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 375-386.
- Platten,M., von Knebel,D.N., Oezen,I., Wick,W., and Ochs,K. (2014). Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Front Immunol.* 5, 673.

Poppema,S., Brocker,E.B., De,L.L., Terbrack,D., Visscher,T., Ter,H.A., Macher,E., The,T.H., and Sorg,C. (1983). In situ analysis of the mononuclear cell infiltrate in primary malignant melanoma of the skin. *Clin. Exp. Immunol.* 51, 77-82.

Porgador,A. and Gilboa,E. (1995). Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182, 255-260.

Poulin,L.F., Salio,M., Griessinger,E., Anjos-Afonso,F., Craciun,L., Chen,J.L., Keller,A.M., Joffre,O., Zelenay,S., Nye,E., Le,M.A., Faure,F., Donckier,V., Sancho,D., Cerundolo,V., Bonnet,D., and Reis e Sousa (2010). Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1261-1271.

Prabhu,R.H., Patravale,V.B., and Joshi,M.D. (2015). Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *Int. J. Nanomedicine.* 10, 1001-1018.

Prejean,C. and Colamonici,O.R. (2000). Role of the cytoplasmic domains of the type I interferon receptor subunits in signaling. *Semin. Cancer Biol.* 10, 83-92.

Proietto,A.I., Mittag,D., Roberts,A.W., Sprigg,N., and Wu,L. (2012). The equivalents of human blood and spleen dendritic cell subtypes can be generated in vitro from human CD34(+) stem cells in the presence of fms-like tyrosine kinase 3 ligand and thrombopoietin. *Cell Mol. Immunol.* 9, 446-454.

Prokunina-Olsson,L., Muchmore,B., Tang,W., Pfeiffer,R.M., Park,H., Dickensheets,H., Hergott,D., Porter-Gill,P., Mumy,A., Kohaar,I., Chen,S., Brand,N., Tarway,M., Liu,L., Sheikh,F., Astemborski,J., Bonkovsky,H.L., Edlin,B.R., Howell,C.D., Morgan,T.R., Thomas,D.L., Rehermann,B., Donnelly,R.P., and O'Brien,T.R. (2013). A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet.* 45, 164-171.

Qiu,C.H., Miyake,Y., Kaise,H., Kitamura,H., Ohara,O., and Tanaka,M. (2009). Novel subset of CD8{alpha}+ dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. *J. Immunol.* 182, 4127-4136.

Raetz,M., Kibardin,A., Sturge,C.R., Pifer,R., Li,H., Burstein,E., Ozato,K., Larin,S., and Yarovinsky,F. (2013). Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. *J. Immunol.* 191, 4818-4827.

Rajkumar,T., Vijayalakshmi,N., Gopal,G., Sabitha,K., Shirley,S., Raja,U.M., and Ramakrishnan,S.A. (2010). Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis. *Cancer Cell Int.* 10, 45.

Ramos,R.N., Chin,L.S., Dos Santos,A.P., Bergami-Santos,P.C., Laginha,F., and Barbuto,J.A. (2012). Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 92, 673-682.

Randolph,G.J., Beaulieu,S., Lebecque,S., Steinman,R.M., and Muller,W.A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282, 480-483.

Reichert,T.E., Scheuer,C., Day,R., Wagner,W., and Whiteside,T.L. (2001). The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 91, 2136-2147.

Reizis,B., Bunin,A., Ghosh,H.S., Lewis,K.L., and Sisirak,V. (2011). Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 163-183.

Rizvi,N.A., Hellmann,M.D., Snyder,A., Kvistborg,P., Makarov,V., Havel,J.J., Lee,W., Yuan,J., Wong,P., Ho,T.S., Miller,M.L., Rekhtman,N., Moreira,A.L., Ibrahim,F., Bruggeman,C., Gasmir,B., Zappasodi,R., Maeda,Y., Sander,C., Garon,E.B., Merghoub,T., Wolchok,J.D., Schumacher,T.N., and Chan,T.A. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348, 124-128.

Robbins,S.H., Walzer,T., Dembele,D., Thibault,C., Defays,A., Bessou,G., Xu,H., Vivier,E., Sellars,M., Pierre,P., Sharp,F.R., Chan,S., Kastner,P., and Dalod,M. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9, R17.

Romani,N., Gruner,S., Brang,D., Kampgen,E., Lenz,A., Trockenbacher,B., Konwalinka,G., Fritsch,P.O., Steinman,R.M., and Schuler,G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180, 83-93.

Rowden,G., Lewis,M.G., and Sullivan,A.K. (1977). Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268, 247-248.

Ruffell,B., Chang-Strachan,D., Chan,V., Rosenbusch,A., Ho,C.M., Pryer,N., Daniel,D., Hwang,E.S., Rugo,H.S., and Coussens,L.M. (2014). Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell* 26, 623-637.

Saitoh,T., Tun-Kyi,A., Ryo,A., Yamamoto,M., Finn,G., Fujita,T., Akira,S., Yamamoto,N., Lu,K.P., and Yamaoka,S. (2006). Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat. Immunol.* 7, 598-605.

Salem,S., Langlais,D., Lefebvre,F., Bourque,G., Bigley,V., Haniffa,M., Casanova,J.L., Burk,D., Berghuis,A., Butler,K.M., Leahy,T.R., Hambleton,S., and Gros,P. (2014). Functional characterization of the human dendritic cell immunodeficiency associated with the IRF8(K108E) mutation. *Blood* 124, 1894-1904.

Salio,M., Cella,M., Vermi,W., Facchetti,F., Palmowski,M.J., Smith,C.L., Shepherd,D., Colonna,M., and Cerundolo,V. (2003). Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur. J. Immunol.* 33, 1052-1062.

Sallusto,F. and Lanzavecchia,A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118.

Sancho,D., Joffre,O.P., Keller,A.M., Rogers,N.C., Martinez,D., Hernanz-Falcon,P., Rosewell,I., and Reis e Sousa (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458, 899-903.

Sancho,D., Mourao-Sa,D., Joffre,O.P., Schulz,O., Rogers,N.C., Pennington,D.J., Carlyle,J.R., and Reis e Sousa (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J. Clin. Invest* 118, 2098-2110.

- Sancho,D. and Reis e Sousa (2013). Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 46-52.
- Sathe,P., Pooley,J., Vremec,D., Mintern,J., Jin,J.O., Wu,L., Kwak,J.Y., Villadangos,J.A., and Shortman,K. (2011). The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. *J. Immunol.* 186, 5184-5192.
- Sathe,P., Vremec,D., Wu,L., Corcoran,L., and Shortman,K. (2013). Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 121, 11-19.
- Sato,A., Ohtsuki,M., Hata,M., Kobayashi,E., and Murakami,T. (2006). Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J. Immunol.* 176, 7686-7694.
- Satpathy,A.T., Wu,X., Albring,J.C., and Murphy,K.M. (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13, 1145-1154.
- Scarlett,U.K., Rutkowski,M.R., Rauwerdink,A.M., Fields,J., Escovar-Fadul,X., Baird,J., Cubillos-Ruiz,J.R., Jacobs,A.C., Gonzalez,J.L., Weaver,J., Fiering,S., and Conejo-Garcia,J.R. (2012). Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J. Exp. Med.* 209, 495-506.
- Schiavoni,G., Mattei,F., Sestili,P., Borghi,P., Venditti,M., Morse,H.C., III, Belardelli,F., and Gabriele,L. (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J. Exp. Med.* 196, 1415-1425.
- Schreibelt,G., Klinkenberg,L.J., Cruz,L.J., Tacke,P.J., Tel,J., Kreutz,M., Adema,G.J., Brown,G.D., Figdor,C.G., and de Vries,I.J. (2012). The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* 119, 2284-2292.
- Schreiber,R.D., Old,L.J., and Smyth,M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.
- Schuetz,V. and Burgdorf,S. (2014). The ins-and-outs of endosomal antigens for cross-presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 26, 63-68.
- Schulte,B.M., Gielen,P.R., Kers-Rebel,E.D., Schreibelt,G., van Kuppeveld,F.J., and Adema,G.J. (2015). Enterovirus-Infected beta-Cells Induce Distinct Response Patterns in BDCA1+ and BDCA3+ Human Dendritic Cells. *PLoS. One.* 10, e0121670.
- Scott,C.L., Tfp,Z.M., Beckham,K.S., Douce,G., and Mowat,A.M. (2014). Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates the homeostasis of CD103(+) CD11b(+) DCs in the intestinal lamina propria. *Eur. J. Immunol.* 44, 3658-3668.
- Segura,E. and Amigorena,S. (2015). Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. *Adv. Immunol.* 127, 1-31.
- Segura,E., Touzot,M., Bohineust,A., Cappuccio,A., Chiochia,G., Hosmalin,A., Dalod,M., Soumelis,V., and Amigorena,S. (2013). Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity.* 38, 336-348.

- Segura,E., Valladeau-Guilemond,J., Donnadieu,M.H., Sastre-Garau,X., Soumelis,V., and Amigorena,S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 209, 653-660.
- Semmrich,M., Plantinga,M., Svensson-Frej,M., Uronen-Hansson,H., Gustafsson,T., Mowat,A.M., Yrlid,U., Lambrecht,B.N., and Agace,W.W. (2012). Directed antigen targeting in vivo identifies a role for CD103+ dendritic cells in both tolerogenic and immunogenic T-cell responses. *Mucosal Immunol.* 5, 150-160.
- Serbina,N.V. and Pamer,E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7, 311-317.
- Serbina,N.V., Salazar-Mather,T.P., Biron,C.A., Kuziel,W.A., and Pamer,E.G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity.* 19, 59-70.
- Shankaran,V., Ikeda,H., Bruce,A.T., White,J.M., Swanson,P.E., Old,L.J., and Schreiber,R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Sheppard,P., Kindsvogel,W., Xu,W., Henderson,K., Schlutsmeyer,S., Whitmore,T.E., Kuestner,R., Garrigues,U., Birks,C., Roraback,J., Ostrander,C., Dong,D., Shin,J., Presnell,S., Fox,B., Haldeman,B., Cooper,E., Taft,D., Gilbert,T., Grant,F.J., Tackett,M., Krivan,W., McKnight,G., Clegg,C., Foster,D., and Klucher,K.M. (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4, 63-68.
- Shinkai,Y., Rathbun,G., Lam,K.P., Oltz,E.M., Stewart,V., Mendelsohn,M., Charron,J., Datta,M., Young,F., Stall,A.M., and . (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.
- Shortman,K. and Heath,W.R. (2010). The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* 234, 18-31.
- Shortman,K., Sathe,P., Vremec,D., Naik,S., and O'Keeffe,M. (2013). Plasmacytoid dendritic cell development. *Adv. Immunol.* 120, 105-126.
- Siegal,F.P., Kadowaki,N., Shodell,M., Fitzgerald-Bocarsly,P.A., Shah,K., Ho,S., Antonenko,S., and Liu,Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Siegel,R., Eskdale,J., and Gallagher,G. (2011). Regulation of IFN- λ 1 promoter activity (IFN- λ 1/IL-29) in human airway epithelial cells. *J. Immunol.* 187, 5636-5644.
- Silk,K.M., Silk,J.D., Ichiryu,N., Davies,T.J., Nolan,K.F., Leishman,A.J., Carpenter,L., Watt,S.M., Cerundolo,V., and Fairchild,P.J. (2012). Cross-presentation of tumour antigens by human induced pluripotent stem cell-derived CD141(+)XCR1+ dendritic cells. *Gene Ther.* 19, 1035-1040.
- Sioud,M., Saeboe-Larssen,S., Hetland,T.E., Kaern,J., Mobergslien,A., and Kvalheim,G. (2013). Silencing of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances dendritic cell immunogenicity and antitumour immunity in cancer patients. *Int. J. Oncol.* 43, 280-288.
- Siren,J., Pirhonen,J., Julkunen,I., and Matikainen,S. (2005). IFN- α regulates TLR-dependent gene expression of IFN- α , IFN- β , IL-28, and IL-29. *J. Immunol.* 174, 1932-1937.

Sisirak,V., Faget,J., Gobert,M., Goutagny,N., Vey,N., Treilleux,I., Renaudineau,S., Poyet,G., Labidi-Galy,S.I., Goddard-Leon,S., Durand,I., Le,M., I, Bajard,A., Bachelot,T., Puisieux,A., Puisieux,I., Blay,J.Y., Menetrier-Caux,C., Caux,C., and Bendriss-Vermare,N. (2012). Impaired IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res.* 72, 5188-5197.

Sisirak,V., Vey,N., Goutagny,N., Renaudineau,S., Malfroy,M., Thys,S., Treilleux,I., Labidi-Galy,S.I., Bachelot,T., Dezutter-Dambuyant,C., Menetrier-Caux,C., Blay,J.Y., Caux,C., and Bendriss-Vermare,N. (2013). Breast cancer-derived transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha compromise interferon-alpha production by tumor-associated plasmacytoid dendritic cells. *Int. J. Cancer* 133, 771-778.

Souza-Fonseca-Guimaraes,F., Young,A., Mittal,D., Martinet,L., Bruedigam,C., Takeda,K., Andoniou,C.E., Degli-Esposti,M.A., Hill,G.R., and Smyth,M.J. (2015). NK cells require IL-28R for optimal in vivo activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 112, E2376-E2384.

Steinbrink,K., Graulich,E., Kubsch,S., Knop,J., and Enk,A.H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99, 2468-2476.

Steinbrink,K., Jonuleit,H., Muller,G., Schuler,G., Knop,J., and Enk,A.H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93, 1634-1642.

Steinman,R.M., Adams,J.C., and Cohn,Z.A. (1975). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J. Exp. Med.* 141, 804-820.

Steinman,R.M. and Cohn,Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142-1162.

Steinman,R.M. and Cohn,Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* 139, 380-397.

Steinman,R.M., Gutchinov,B., Witmer,M.D., and Nussenzweig,M.C. (1983). Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J. Exp. Med.* 157, 613-627.

Steinman,R.M., Hawiger,D., and Nussenzweig,M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 685-711.

Steinman,R.M., Lustig,D.S., and Cohn,Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.* 139, 1431-1445.

Stephenson,R.M., Lim,C.M., Matthews,M., Dietsch,G., Hershberg,R., and Ferris,R.L. (2013). TLR8 stimulation enhances cetuximab-mediated natural killer cell lysis of head and neck cancer cells and dendritic cell cross-priming of EGFR-specific CD8+ T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 1347-1357.

Stewart,W.E., DeClercq,E., De,S.P., Berg,K., Ogburn,C.A., and Paucker,K. (1973). Antiviral and non-antiviral activity of highly purified interferon. *Nat. New Biol.* 246, 141-143.

Stingl,G., Katz,S.I., Clement,L., Green,I., and Shevach,E.M. (1978). Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* 121, 2005-2013.

Stingl,G., Wolff-Schreiner,E.C., Pichler,W.J., Gschnait,F., Knapp,W., and Wolff,K. (1977). Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268, 245-246.

Stone,A.E., Giugliano,S., Schnell,G., Cheng,L., Leahy,K.F., Golden-Mason,L., Gale,M., Jr., and Rosen,H.R. (2013). Hepatitis C virus pathogen associated molecular pattern (PAMP) triggers production of lambda-interferons by human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS. Pathog.* 9, e1003316.

Suppiah,V., Moldovan,M., Ahlenstiel,G., Berg,T., Weltman,M., Abate,M.L., Bassendine,M., Spengler,U., Dore,G.J., Powell,E., Riordan,S., Sheridan,D., Smedile,A., Fragomeli,V., Muller,T., Bahlo,M., Stewart,G.J., Booth,D.R., and George,J. (2009). IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* 41, 1100-1104.

Suzuki,A., Masuda,A., Nagata,H., Kameoka,S., Kikawada,Y., Yamakawa,M., and Kasajima,T. (2002). Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *J. Pathol.* 196, 37-43.

Swann,J.B., Hayakawa,Y., Zerafa,N., Sheehan,K.C., Scott,B., Schreiber,R.D., Hertzog,P., and Smyth,M.J. (2007). Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J. Immunol.* 178, 7540-7549.

Swider,A., Siegel,R., Eskdale,J., and Gallagher,G. (2014). Regulation of interferon lambda-1 (IFNL1/IFN-lambda1/IL-29) expression in human colon epithelial cells. *Cytokine* 65, 17-23.

Tabarkiewicz,J., Rybojad,P., Jablonka,A., and Rolinski,J. (2008). CD1c+ and CD303+ dendritic cells in peripheral blood, lymph nodes and tumor tissue of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 19, 237-243.

Takeda,K., Kaisho,T., and Akira,S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376.

Takeuchi,A., Itoh,Y., Takumi,A., Ishihara,C., Arase,N., Yokosuka,T., Koseki,H., Yamasaki,S., Takai,Y., Miyoshi,J., Ogasawara,K., and Saito,T. (2009). CRTAM confers late-stage activation of CD8+ T cells to regulate retention within lymph node. *J. Immunol.* 183, 4220-4228.

Tanaka,Y., Nishida,N., Sugiyama,M., Kurosaki,M., Matsuura,K., Sakamoto,N., Nakagawa,M., Korenaga,M., Hino,K., Hige,S., Ito,Y., Mita,E., Tanaka,E., Mochida,S., Murawaki,Y., Honda,M., Sakai,A., Hiasa,Y., Nishiguchi,S., Koike,A., Sakaida,I., Imamura,M., Ito,K., Yano,K., Masaki,N., Sugauchi,F., Izumi,N., Tokunaga,K., and Mizokami,M. (2009). Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 41, 1105-1109.

Tel,J., Sittig,S.P., Blom,R.A., Cruz,L.J., Schreiber,G., Figdor,C.G., and de Vries,I.J. (2013). Targeting uptake receptors on human plasmacytoid dendritic cells triggers antigen cross-presentation and robust type I IFN secretion. *J. Immunol.* 191, 5005-5012.

Thomas,D.L., Thio,C.L., Martin,M.P., Qi,Y., Ge,D., O'Huigin,C., Kidd,J., Kidd,K., Khakoo,S.I., Alexander,G., Goedert,J.J., Kirk,G.D., Donfield,S.M., Rosen,H.R., Tobler,L.H., Busch,M.P., McHutchison,J.G., Goldstein,D.B., and Carrington,M. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461, 798-801.

Thomson,S.J., Goh,F.G., Banks,H., Krausgruber,T., Kotenko,S.V., Foxwell,B.M., and Udalova,I.A. (2009). The role of transposable elements in the regulation of IFN-lambda1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 11564-11569.

- Tjomsland,V., Sandstrom,P., Spangeus,A., Messmer,D., Emilsson,J., Falkmer,U., Falkmer,S., Magnusson,K.E., Borch,K., and Larsson,M. (2010). Pancreatic adenocarcinoma exerts systemic effects on the peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells: an indicator of disease severity? *BMC. Cancer* 10, 87.
- Treilleux,I., Blay,J.Y., Bendriss-Vermare,N., Ray-Coquard,I., Bachelot,T., Guastalla,J.P., Bremond,A., Goddard,S., Pin,J.J., Barthelemy-Dubois,C., and Lebecque,S. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 7466-7474.
- Tsujitani,S., Kakeji,Y., Watanabe,A., Kohnoe,S., Maehara,Y., and Sugimachi,K. (1990). Infiltration of dendritic cells in relation to tumor invasion and lymph node metastasis in human gastric cancer. *Cancer* 66, 2012-2016.
- Tussiwand,R., Lee,W.L., Murphy,T.L., Mashayekhi,M., KC,W., Albring,J.C., Satpathy,A.T., Rotondo,J.A., Edelson,B.T., Kretzer,N.M., Wu,X., Weiss,L.A., Glasmacher,E., Li,P., Liao,W., Behnke,M., Lam,S.S., Aurthur,C.T., Leonard,W.J., Singh,H., Stallings,C.L., Sibley,L.D., Schreiber,R.D., and Murphy,K.M. (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* 490, 502-507.
- Urban,T.J., Thompson,A.J., Bradrick,S.S., Fellay,J., Schuppan,D., Cronin,K.D., Hong,L., McKenzie,A., Patel,K., Shianna,K.V., McHutchison,J.G., Goldstein,D.B., and Afdhal,N. (2010). IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 52, 1888-1896.
- Valladeau,J., Ravel,O., Dezutter-Dambuyant,C., Moore,K., Kleijmeer,M., Liu,Y., Duvert-Frances,V., Vincent,C., Schmitt,D., Davoust,J., Caux,C., Lebecque,S., and Saeland,S. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity.* 12, 71-81.
- Valladeau,J. and Saeland,S. (2005). Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.* 17, 273-283.
- van,d., V, de,W.L., de Vries,R.D., Litjens,M., de Jong,M.A., Fluitsma,D., de Swart,R.L., and Geijtenbeek,T.B. (2011). Human Langerhans cells capture measles virus through Langerin and present viral antigens to CD4(+) T cells but are incapable of cross-presentation. *Eur. J. Immunol.* 41, 2619-2631.
- Vanbervliet,B., Bendriss-Vermare,N., Massacrier,C., Homey,B., de,B.O., Briere,F., Trinchieri,G., and Caux,C. (2003). The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J. Exp. Med.* 198, 823-830.
- Vermi,W., Bonecchi,R., Facchetti,F., Bianchi,D., Sozzani,S., Festa,S., Berenzi,A., Cella,M., and Colonna,M. (2003). Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J. Pathol.* 200, 255-268.
- Vesely,M.D., Kershaw,M.H., Schreiber,R.D., and Smyth,M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235-271.
- von Bergwelt-Baildon,M.S., Popov,A., Saric,T., Chemnitz,J., Classen,S., Stoffel,M.S., Fiore,F., Roth,U., Beyer,M., Debey,S., Wickenhauser,C., Hanisch,F.G., and Schultze,J.L. (2006). CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood* 108, 228-237.

von, B.D., Bausinger, H., Matz, H., Koch, S., Hacker, G., Takikawa, O., Bieber, T., Hanau, D., and de la Salle, H. (2004). Human epidermal langerhans cells express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Invest Dermatol.* 123, 298-304.

Vu Manh, T.P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., and Dalod, M. (2015). Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions. *Front Immunol.* 6, 260.

Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., and Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106, 2252-2258.

Wang, Y. and Colonna, M. (2014). Interleukin-34, a cytokine crucial for the differentiation and maintenance of tissue resident macrophages and Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 1575-1581.

Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., and Colonna, M. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753-760.

Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., Hadeiba, H., and Butcher, E.C. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* 15, 98-108.

Watowich, S.S. and Liu, Y.J. (2010). Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol. Rev.* 238, 76-92.

West, A.C. and Johnstone, R.W. (2014). New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J. Clin. Invest* 124, 30-39.

Willingham, S.B., Volkmer, J.P., Gentles, A.J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S.S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J.D., Lovelace, P., Scheeren, F.A., Chao, M.P., Weiskopf, K., Tang, C., Volkmer, A.K., Naik, T.J., Storm, T.A., Mosley, A.R., Edris, B., Schmid, S.M., Sun, C.K., Chua, M.S., Murillo, O., Rajendran, P., Cha, A.C., Chin, R.K., Kim, D., Adorno, M., Raveh, T., Tseng, D., Jaiswal, S., Enger, P.O., Steinberg, G.K., Li, G., So, S.K., Majeti, R., Harsh, G.R., van de Rijn, M., Teng, N.N., Sunwoo, J.B., Alizadeh, A.A., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2012). The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 6662-6667.

Witte, K., Gruetz, G., Volk, H.D., Looman, A.C., Asadullah, K., Sterry, W., Sabat, R., and Wolk, K. (2009). Despite IFN-λ receptor expression, blood immune cells, but not keratinocytes or melanocytes, have an impaired response to type III interferons: implications for therapeutic applications of these cytokines. *Genes Immun.* 10, 702-714.

Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.A., Reed, K., Burke, M.M., Caldwell, A., Kronenberg, S.A., Agunwamba, B.U., Zhang, X., Lowy, I., Inzunza, H.D., Feely, W., Horak, C.E., Hong, Q., Korman, A.J., Wigginton, J.M., Gupta, A., and Sznol, M. (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369, 122-133.

Wolff, K. (1967). The fine structure of the Langerhans cell granule. *J. Cell Biol.* 35, 468-473.

Wolfl, M., Batten, W.Y., Posovszky, C., Bernhard, H., and Berthold, F. (2002). Gangliosides inhibit the development from monocytes to dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 130, 441-448.

- Xu,L., Wang,C., Wen,Z., Zhou,Y., Liu,Z., Liang,Y., Xu,Z., and Ren,T. (2010). CpG oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of adoptive cell transfer using tumor infiltrating lymphocytes by modifying the Th1 polarization and local infiltration of Th17 cells. *Clin. Dev. Immunol.* 2010, 410893.
- Yamazaki,C., Miyamoto,R., Hoshino,K., Fukuda,Y., Sasaki,I., Saito,M., Ishiguchi,H., Yano,T., Sugiyama,T., Hemmi,H., Tanaka,T., Hamada,E., Hirashima,T., Amakawa,R., Fukuhara,S., Nomura,S., Ito,T., and Kaisho,T. (2010). Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 756-761.
- Yin,Z., Dai,J., Deng,J., Sheikh,F., Natalia,M., Shih,T., Lewis-Antes,A., Amrute,S.B., Garrigues,U., Doyle,S., Donnelly,R.P., Kottenko,S.V., and Fitzgerald-Bocarsly,P. (2012). Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 189, 2735-2745.
- Yoneyama,H., Matsuno,K., Toda,E., Nishiwaki,T., Matsuo,N., Nakano,A., Narumi,S., Lu,B., Gerard,C., Ishikawa,S., and Matsushima,K. (2005). Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J. Exp. Med.* 202, 425-435.
- Yoshio,S., Kanto,T., Kuroda,S., Matsubara,T., Higashitani,K., Kakita,N., Ishida,H., Hiramatsu,N., Nagano,H., Sugiyama,M., Murata,K., Fukuhara,T., Matsuura,Y., Hayashi,N., Mizokami,M., and Takehara,T. (2013). Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 57, 1705-1715.
- Zaba,L.C., Fuentes-Duculan,J., Eungdamrong,N.J., Abello,M.V., Novitskaya,I., Pierson,K.C., Gonzalez,J., Krueger,J.G., and Lowes,M.A. (2009). Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J. Invest Dermatol.* 129, 79-88.
- Zdanov,A. (2010). Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 325-330.
- Zechmann,M., Reese,S., and Gobel,T.W. (2013). Chicken CRTAM binds nectin-like 2 ligand and is upregulated on CD8+ alphabeta and gammadelta T lymphocytes with different kinetics. *PLoS One.* 8, e81942.
- Zhan,Y., Carrington,E.M., van,N.A., Bedoui,S., Seah,S., Xu,Y., Wang,N., Mintern,J.D., Villadangos,J.A., Wicks,I.P., and Lew,A.M. (2011). GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8(+) spleen dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 2585-2595.
- Zhang,J.G., Czabotar,P.E., Policheni,A.N., Caminschi,I., Wan,S.S., Kitsoulis,S., Tullett,K.M., Robin,A.Y., Brammananth,R., van Delft,M.F., Lu,J., O'Reilly,L.A., Josefsson,E.C., Kile,B.T., Chin,W.J., Mintern,J.D., Olshina,M.A., Wong,W., Baum,J., Wright,M.D., Huang,D.C., Mohandas,N., Coppel,R.L., Colman,P.M., Nicola,N.A., Shortman,K., and Lahoud,M.H. (2012). The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity.* 36, 646-657.
- Zhang,S., Kodys,K., Li,K., and Szabo,G. (2013). Human type 2 myeloid dendritic cells produce interferon-lambda and amplify interferon-alpha in response to hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 144, 414-425.
- Zhang,S.Y., Jouanguy,E., Ugolini,S., Smahi,A., Elain,G., Romero,P., Segal,D., Sancho-Shimizu,V., Lorenzo,L., Puel,A., Picard,C., Chappier,A., Plancoulaine,S., Titeux,M., Cognet,C., von,B.H., Ku,C.L., Casrouge,A., Zhang,X.X., Barreiro,L., Leonard,J., Hamilton,C., Lebon,P., Heron,B., Vallee,L., Quintana-Murci,L., Hovnanian,A., Rozenberg,F., Vivier,E., Geissmann,F., Tardieu,M., Abel,L., and

Casanova, J.L. (2007). TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317, 1522-1527.

Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity*. 8, 591-599.

Zhou, Z., Hamming, O.J., Ank, N., Paludan, S.R., Nielsen, A.L., and Hartmann, R. (2007). Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J. Virol.* 81, 7749-7758.

Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2012). Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 1, 1223-1225.

Zitzmann, K., Brand, S., Baehs, S., Goke, B., Meinecke, J., Spottl, G., Meyer, H., and Auernhammer, C.J. (2006). Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 1334-1341.

Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gassel, I., Gordon, A., Pustilnik, T., Curiel, D.T., Galanaud, P., Capron, F., Emilie, D., and Curiel, T.J. (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* 7, 1339-1346.

Résumé en français

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle majeur dans l'induction de l'immunité anti-tumorale spécifique de l'antigène (Ag). Récemment, les DC BDCA3^{high} humaines sont apparues comme étant homologues aux DC CD8 α ⁺ connues pour activer très efficacement les lymphocytes T CD8 par présentation croisée d'Ag chez la souris. Par ailleurs, ces deux populations de DC sont les productrices principales d'interféron- λ (IFN- λ), une cytokine récemment découverte et possédant des propriétés antivirales, antiprolifératives et anti-tumorales. Mon travail de thèse a permis de mieux caractériser la présentation croisée d'Ag cellulaire par les DC BDCA3^{high} à l'aide d'un modèle *in vitro* et de mettre en lumière le rôle des cellules NK dans l'induction de ce processus. Ce travail a également aboutit à la mise en évidence des DC BDCA3^{high} dans les tumeurs de sein et de révéler l'inhibition de leur sécrétion d'IFN- λ par des facteurs solubles présents dans le microenvironnement tumoral. L'ensemble de ces résultats devraient permettre de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur le ciblage des DC BDCA3^{high}.

Titre en anglais

Characterization of BDCA3^{high} human dendritic cells and their modulation by tumor microenvironment

Résumé en anglais

Dendritic cells (DC) play a major role in the induction of antigen (Ag) specific anti-tumoral immunity. Recently, human BDCA3^{high} DC appeared to be homologous with CD8 α ⁺ DC known to activate very efficiently T CD8 lymphocyte by Ag cross-presentation in mice. Moreover, those two DC populations are the main producers of interferon- λ (IFN- λ), a recently discovered cytokine family with antiviral, anti-proliferative and anti-tumoral properties. My works participated to better characterize cell derived Ag cross-presentation by BDCA3^{high} DC using an *in vitro* model and enlightened the role of NK cells in its induction. This works also end up in revealing the presence of BDCA3^{high} DC in breast tumors and the inhibition of their IFN- λ secretion by soluble factor from tumor microenvironment. Altogether, those results should allow designing new anti-tumoral immunotherapeutic strategies based on BDCA3^{high} DC targeting.

Mots clés en français

Cellules dendritiques, BDCA3, tumeur du sein, interféron-lambda, présentation croisée d'antigène

Mots clés en anglais

Dendritic cells, BDCA3, breast tumor, interferon-lambda, antigen cross-presentation

Intitulé et adresse du laboratoire

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL)

Département Immunité, Virus et Microenvironnement ; UMR INSERM 1052 – CNRS 5286

Equipe « Ciblage thérapeutique de la cellule tumorale et de son environnement immunitaire »

Centre Léon Bérard, 28 rue Laënnec – 69373 Lyon cedex 08, France