



HAL
open science

Optimisation de l'activité immunostimulatrice des lymphocytes T Natural Killer invariants : conséquences sur l'immunité anti-tumorale

Reem Ghinnagow

► **To cite this version:**

Reem Ghinnagow. Optimisation de l'activité immunostimulatrice des lymphocytes T Natural Killer invariants : conséquences sur l'immunité anti-tumorale. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S007 . tel-01694143

HAL Id: tel-01694143

<https://theses.hal.science/tel-01694143>

Submitted on 26 Jan 2018

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.

Université de Lille II – Droit et Santé
Ecole Doctorale Biologie Santé



Thèse

Pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Reem GHINNAGOW

Le 24 Mai 2017

**Optimisation de l'activité immunostimulatrice des
lymphocytes T Natural Killer invariants: conséquences sur
l'immunité anti-tumorale**

Devant le jury composé de :

M. le professeur **Philippe DELANNOY**

Président du jury

Mme le Docteur **Maria LEITE DE MORAES**

Rapporteur

M. le Docteur **Marc DALOD**

Rapporteur

Mme le Docteur **Fathia MAMI-CHOUAIB**

Examineur

Mme le Docteur **Christelle FAVEEUW**

Directeur de thèse

M. le Docteur **François TROTTEIN**

Directeur de laboratoire

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude au Professeur **Philippe Delannoy** pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. Mes remerciements vont aux Docteurs **Maria Leite de Moraes** et **Marc Dalod**, qui ont accepté de participer au jury, de rapporter ce travail et de me faire profiter de leurs expériences. J'adresse mes vifs remerciements au Docteur **Fathia MAMI-CHOUAIB**, qui a accepté d'examiner ma thèse.

J'aimerais remercier vivement ma directrice de thèse Docteur **Christelle Faveeuw**, pour l'ensemble de ses conseils, la correction de la thèse ainsi que les encouragements qu'elle m'a donné durant la thèse. Malgré un emploi du temps très chargé, elle a toujours su trouver du temps pour répondre à mes questions et porter une grande attention à ce travail de recherche.

J'aimerais également remercier chaleureusement le Docteur **François Trottein** de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dès le Master2 et de m'avoir confié cet ambitieux projet. Il a su me diriger tout au long de cette thèse avec enthousiasme. Il a suivi ce travail avec rigueur en prodiguant ses conseils scientifiques et techniques. Ses conseils précieux tout au long de la rédaction me permettent d'aboutir à la production de cette thèse.

Je désire grandement remercier **Josette Fontaine** pour ton aide et pour tout ce que tu m'as appris scientifiquement. Un grand merci pour ta bonne humeur qui m'a aidé à supporter les périodes difficiles.

J'adresse aussi mes remerciements à **Julie De Meester** pour tout ce que tu as apporté à cette thèse. J'avais le plaisir de travailler avec toi.

Merci également à **Christophe Paget** et à **Isabelle Wolowczuk** pour vos remarques et vos conseils scientifiques.

Je remercie toute les personnes formidables que j'ai rencontrées dans ce labo : **Maya, Ranin, Moragne et Daphnée**. J'ai partagé avec vos des moments et des souvenirs inoubliables.

Je remercie de tout mon cœur toutes les personnes ayant travaillé dans l'équipe 12 pour tout ce que vous avez m'apporter durant ces 4 années.

Merci à **Eva, Gwen, Bachirou, laury-Anne et Mélina**. J'avais le plaisir de partager le bureau avec vous.

Mes remerciements s'adressent à : **Manu, Valentin, Adeline, Marie-Josée, Fahima, Olivia, Gaele, Laura, Delphine et Asma**. C'était un véritable plaisir d'être avec vous dans le labo.

Merci **Muriel, Philippe, Emilie, Christophe et Jean-Claude** pour vos questions et suggestions scientifiques lors des réunions Li3.

J'adresse toute mon affection à celle et ceux qui me sont chers. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. Je suis redevable à mes **parents** et mes **frères**.

Ghaith, mon cher mari, sans toi je n'aurai jamais pu réaliser mon rêve. Merci pour ton soutien, merci d'être toujours là pour moi.

Mon cher fils **Gad** et mon futur **bébé**, merci d'être dans ma vie. Vous êtes la vraie joie.

Je tiens à remercier mon cher pays, la Syrie, en priant que la paix et la sérénité reviennent dans le monde entier. Je tiens également à remercier la France, ce beau pays, qui m'a accueilli chaleureusement pour réaliser mon rêve d'être docteure en immunologie ainsi que de construire ma petite famille avec mon mari et mon très cher fils.

Résumé

Optimisation de l'activité immunostimulatrice des lymphocytes T Natural Killer invariants: conséquences sur l'immunité anti-tumorale

Pour optimiser les stratégies vaccinales anti-tumorales, l'activation des cellules du système immunitaire inné est cruciale pour générer l'expansion des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux. Les lymphocytes T Natural Killer invariant (iNKT) représentent une famille unique de lymphocytes T innés ayant des propriétés immunomodulatrices puissantes. Ces cellules reconnaissent via leur récepteur T des antigènes glycolipidiques présentés par la molécule CD1d exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes. L'alpha-galactosylcéramide (α -GalCer), un puissant activateur des cellules iNKT, est en développement clinique dans le cancer. Les cellules dendritiques (DCs) sont équipées pour activer les cellules iNKT and promouvoir de puissantes réponses immunitaires adaptatives. Considérant la capacité unique des DC $CD8\alpha^+$ à présenter de façon croisée les antigènes aux lymphocytes T $CD8^+$, notre objectif a visé à délivrer l' α -GalCer (considéré ici comme un adjuvant) et des antigènes tumoraux aux DC $CD8\alpha^+$ dans le but de générer de puissantes réponses T cytotoxiques anti-tumorales. Pour cela, les antigènes ont été incorporés dans des nanoparticules de PLGA décorées à leur surface avec des anticorps anti-Clec9a, un marqueur exprimé spécifiquement par les DC $CD8\alpha^+$. Nos résultats montrent chez la souris que la co-délivrance simultanée de l' α -GalCer et d'auto-antigènes tumoraux (Trp2 et gp100) aux DC $CD8\alpha^+$ promeut une forte réponse anti-tumorale dans un contexte prophylactique et thérapeutique. Nous démontrons que cet effet vaccinal est dû aux cellules iNKT (mais pas aux lymphocytes T auxiliaires) et aux lymphocytes T $CD8^+$. L'efficacité vaccinale est corrélée à un rapport supérieur entre les lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques des antigènes tumoraux et les lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs au sein des tumeurs. Chez l'homme, la co-administration de l' α -GalCer et de l'antigène tumoral (Mélan A) aux DC BDCA3⁺ (les équivalents humains des DC $CD8\alpha^+$) induit une forte expansion des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques du Mélan-A *in vitro*. Nos résultats montrent pour la première fois que la tolérance aux auto-antigènes tumoraux peut être levée en exploitant la fonction «helper» des cellules iNKT et mettent en évidence de nouvelles approches thérapeutiques contre le développement tumoral.

Abstract

Optimization of immune stimulatory activities of invariant Natural Killer T lymphocytes: consequences on anti-tumor responses

To optimize anti-tumor vaccine strategies, exploitation of cells of the innate immune system to assist the expansion of tumor antigen-specific T cells is of interest. Invariant Natural Killer T lymphocytes (iNKT) are a unique population of “innate-like” T cells endowed with potent immunomodulatory properties. These cells recognize through their T cell receptor glycolipids presented by the CD1d molecule expressed by antigen presenting cells. Alpha-galactosylceramide (α -GalCer), a potent iNKT cell activator, is in clinical development in cancer. Dendritic cells (DC) are well equipped to trigger iNKT cells activation and to promote adaptive immune responses. Regarding the unique ability of CD8 α^+ DCs to cross-present antigens to CD8 $^+$ T cell response, we intended to deliver α -GalCer (viewed here as an adjuvant) and tumor antigens to CD8 α^+ DCs with the aim to generate efficient antitumor cytotoxic T cells. To this end, antigens were incorporated in PLGA-based nanoparticles decorated with anti-Clec9a antibodies, a marker specifically expressed by CD8 α^+ DCs. Our results show (mouse system) that simultaneous co-delivery of α -GalCer and tumor self-antigens (Trp2 and gp100) to CD8 α^+ DCs promotes strong anti-tumor responses in prophylactic and therapeutic settings. We attributed the therapeutic effects of the vaccine to iNKT cells (but not to T-helper lymphocytes) and to CD8 $^+$ T lymphocytes. The efficacy was correlated with a high ratio of tumor antigen specific CD8 $^+$ T cells to CD4 $^+$ regulatory T lymphocytes infiltrating the tumor. In human, co-administration of α -GalCer and a tumor antigen (Melan A) to DC BDCA3 $^+$ (the human equivalent of CD8 α^+ DCs) strongly induces the expansion of Melan-A specific CD8 $^+$ T lymphocytes *in vitro*. Our results demonstrate that tolerance to self-antigens can be abrogated by manipulating the NKT cells' helper functions and shed light on novel therapeutic approaches for controlling tumor development.

Liste des abréviations

α -GalCer (α -GC) : alpha-galactosylcéramide
APC : cellule présentatrice d'antigène (antigen presenting cell)
BM-DC : cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse (bone marrow-derived dendritic cell)
CD : cluster de différenciation
cDC : cellule dendritique conventionnelle
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CTL : Cytotoxic T lymphocytes
DN : double négatif
DP : double positif
Flt3L : Fms-like tyrosine kinase 3 ligand
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gp100 : glycoprotein 100
GSL : glycosphingolipide
HPC : hematopoietic progenitor cells
HSC : hematopoietic stem cells
IFN : interféron
IL : interleukine
iNKT : invariant natural killer T
MDSC : Myeloid-derived-suppressor cells
NK : cellule Natural Killer
NP : nanoparticule
PLGA : poly(lactic-co-glycolic) acid
SCF : Stem Cell Factor
SR-1 : stemregenin-1
TAM : Tumor-associated macrophages
TCR : T cell receptor
TIL : Tumor-infiltrating lymphocytes
TLR : Toll like receptor
TPO : Thrombopoietin
Treg : Regulatory T cell
Trp2 : tyrosinase-related protein 2
vNKT : variant natural killer T

Table des matières

<u>Remerciements</u>	2
<u>Résumé</u>	4
<u>Abstract</u>	5
<u>Liste des abréviations</u>	6
1. La Classification des cellules NKT	11
1.1 Les cellules NKT type I : Les cellules Natural Killer T invariantes (iNKT)	11
1.2 Les cellules NKT type II: Les cellules Natural Killer T variantes (vNKT)	12
2. La localisation des cellules iNKT	13
3. Le développement des cellules iNKT et l'acquisition de la fonction effectrice	14
3.1 La sélection positive	14
3.2 La sélection négative	17
3.3 La maturation des cellules iNKT	17
3.4 Les facteurs régulant le développement et la maturation des cellules iNKT	18
4. Les différentes sous-populations de cellules iNKT:	20
A. Les cellules iNKT de type Th1 :	21
B. Les cellules iNKT de type Th2 :	22
C. Les cellules iNKT de type Th17 :	22
D. Autres sous-populations de cellules iNKT :	23
5. La molécule CD1d et les ligands glycolipidiques :	23
5.1. La molécule CD1d	23
5.2. Les antigènes glyco/lipidiques reconnus par les cellules iNKT :	25
5.2.1. Alpha-galactosylceramide (α -GalCer)	25
5.2.2. Antigènes lipidiques synthétiques	26
5.2.3. Les ligands exogènes - les glycolipides microbiens	28
5.2.4. Les antigènes endogènes:	31
A. Les glycosphingolipides	31
B. Les phospholipides	32
6. Mécanismes d'activation des cellules iNKT	34

6.1. Activation purement dépendante du TCR	34
6.2. Activation dépendante du TCR et de cytokines	34
6.3. Activation dépendante de cytokines	35
7. Etat d'activation des cellules iNKT en réponse à l' α -GalCer.....	35
7.1 Primo activation :.....	35
7.2 Activation secondaire «phénomène d'anergie»	36
7.3 Réponse IL-10 régulatrice	38
8. Rôle des cellules dendritiques dans l'activation des cellules iNKT	40
9. Les cellules dendritiques (DC)	41
9.1 Les sous-populations de DC	41
9.1.1 Les DC conventionnelles.....	42
A. Les cDC1 :	43
B. Les cDC2 :	47
9.1.2 Les DC plasmacytoïdes:.....	47
9.2 Les DC humaines	48
10. Le rôle adjuvant des cellules iNKT dans la régulation de la réponse immunitaire	50
11. Fonctions biologiques des cellules iNKT dans certaines maladies.....	53
11.1 Les cellules iNKT dans les maladies infectieuses	53
11.2 Les cellules iNKT dans les maladies allergiques	54
11.3 Les cellules iNKT dans les maladies auto-immunes	55
11.4 Les cellules iNKT et l'immunité antitumorale :.....	56
11.4.1 Les mécanismes par lesquels les cellules iNKT exercent ces effets antitumoraux.	57
A. Modulation indirecte des réponses antitumorales par les cytokines.....	57
B. Contrôle indirect de la croissance tumorale via l'altération du microenvironnement tumoral (TME)	58
C. Cytotoxicité Antitumorale Directe	59
11.4.2 Suppression de l'activation des cellules iNKT.....	60
11.4.3 Immunothérapie basée sur les cellules iNKT	61
11.4.3.1- L'immunothérapie du cancer.....	61

A- Immunostimulants	61
B- Anticorps monoclonaux (mAb)	61
C- Immunomodulateurs	62
D- Thérapie à base de lymphocytes T transférés de manière adoptive (ACT)	62
E- Vaccins du cancer	63
E-1-Vaccins à base de peptides ou de protéines.....	63
E-2-Vaccins à base des cellules tumorales entières autologues ou allogéniques	63
E-3-Vaccins à base de cellules dendritiques	64
E-4-Vaccin à base de nanoparticules	64
11.4.3.2- l'immunothérapie du cancer et les cellules iNKT	65
A. Essais précliniques	66
A.1 Co-administration d' α -GalCer avec un antigène	66
A.2 DC chargées par l' α -GalCer	66
A.3 Anticorps ciblant le complexe CD1d/ α -GalCer aux tumeurs	67
A.4 Vaccins à base de cellules tumorales entières chargées avec de l' α -GalCer	67
A.5 Vaccins synthétiques conjugués activant les cellules iNKT	68
A.6 Microorganismes / Nanoparticules	69
B. Essais cliniques	70
B.1 Injection intraveineuse d' α -GalCer	70
B.2 Transfert adoptif des APC chargées avec l' α -GalCer	70
B.3. Transfert adoptif de cellules iNKT activées ex vivo	72
Objectifs	75
Matériels et Méthodes	78
Discussion/Perspectives	106
ANNEXE	168

Introduction

1. La Classification des cellules NKT

Les cellules Natural Killer T (NKT) sont des lymphocytes qui ont la particularité d'appartenir à la fois aux systèmes immunitaire inné et adaptatif. Certaines d'entre elles expriment à la fois des récepteurs de surface caractéristiques des cellules Natural Killer (NK) (récepteurs NK1.1 chez la souris C57BL/6 et CD161 chez l'homme) et des lymphocytes T (complexe TCR et CD3) (Bendelac et al., 2007; Godfrey et al., 2015). Les cellules NKT murines expriment des récepteurs appartenant à la famille Ly49 et NKG2D. Les cellules NKT humaines expriment des molécules de surface similaires comprenant CD56, NKG2D et NKG2A. Les cellules NKT humaines et murines expriment une variété de récepteurs et ligands activateurs (par exemple CD28 et CD154) ou inhibiteurs (programmed death-1 (PD-1; CD279)) associés aux lymphocytes T, dont l'expression dépend de l'état d'activation de la cellule. Grâce à l'avancée technologique, la classification de ces lymphocytes non conventionnels distingue 3 types de cellules NKT : les NKT type I ou NKT invariantes (iNKT), les NKT type II ou NKT variantes (vNKT) et les NKT type III ou « NKT-like ».

1.1 Les cellules NKT type I : Les cellules Natural Killer T invariantes (iNKT)

Les cellules NKT de type I représentent la majorité de la sous-population de cellules NKT. Ces cellules expriment un TCR (T Cell Receptor) semi-invariant composé d'une chaîne α avec un réarrangement $V\alpha 14-J\alpha 18$ et d'un nombre limité de chaînes β $V\beta 8$, $V\beta 7$ ou $V\beta 2$ chez la souris et de $V\alpha 24-J\alpha 18$ et $V\beta 11$ chez l'homme (Godfrey et al., 2004; Lantz and Bendelac, 1994). Les souris transgéniques TCR $V\alpha 14$ ont un nombre de cellules iNKT plus élevé que les souris sauvages (Taniguchi et al., 1996), alors que les souris $J\alpha 18^{-/-}$ sont dépourvues en cellules iNKT (Cui et al., 1997). Le spectre de reconnaissance des antigènes reconnus par le TCR des cellules iNKT diffère complètement de celui des lymphocytes T conventionnels. Contrairement à ces derniers qui reconnaissent des antigènes peptidiques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II, les cellules iNKT reconnaissent des antigènes lipidiques ou glycolipidiques présentés par la molécule CD1d, une molécule atypique du CMH de classe I non polymorphique.

Kawano et ses collaborateurs ont été les premiers à découvrir la nature des antigènes des cellules iNKT (Kawano et al., 1997). En effet, lors d'un criblage de molécules potentiellement anti-tumorales, ce groupe a décrit l'existence à partir d'une éponge marine (espèces *Agelas*), d'une structure lipidique capable d'activer

ces cellules. Un analogue synthétique a été produit : l' α -galactosylcéramide (α -GalCer, KRN7000). Depuis cette découverte, un certain nombre d'antigènes lipidiques naturels et synthétiques ont été décrits comme étant capables d'activer, via la molécule CD1d, les cellules iNKT. Ces cellules sont maintenant identifiées en utilisant un tétramère de CD1d chargé en α -GalCer (PBS-57) ou avec un de ses analogues synthétiques (Benlagha et al., 2000). Cette technique a permis de redéfinir plus précisément la classification de ces cellules et d'en apprendre davantage sur leur développement et leur fonction, comme nous le verrons dans la suite de notre manuscrit.

1.2 Les cellules NKT type II: Les cellules Natural Killer T variantes (vNKT)

Les lymphocytes NKT de type II sont décrits comme des cellules NKT dépendants de CD1d mais avec un TCR non-invariant et non réactif à l' α -GalCer. Cette population de cellules, retrouvée à la fois chez la souris et chez l'homme, présente un répertoire de TCR plus hétérogène. La composition du TCR de cette population reste plus diversifiée par rapport aux cellules NKT de type I. Actuellement, aucun outil direct et spécifique n'existe pour identifier la population de cellules NKT de type II. Différentes approches ont été développées pour étudier ces cellules chez la souris. Une de ces approches consiste à comparer les réponses immunitaires entre les souris $J\alpha 18^{-/-}$ (dépourvues de cellules NKT de type I) et les souris $CD1d^{-/-}$ (dépourvues de cellules NKT de type I et de type II). En 2004, Jahng et al ont découvert un puissant ligand glycolipidique endogène des cellules NKT de type II : le sulfatide. Ce ligand est un constituant de la myéline et se retrouve dans le système nerveux central (SNC) (Jahng et al., 2004). La découverte du sulfatide a conduit à la génération d'un tétramère CD1d chargé avec le sulfatide (Jahng et al., 2004). Les cellules NKT de type II réactives au sulfatide isolées à partir de souris naïves ont un répertoire de TCR oligoclonal avec des segments de gènes $V\alpha 3/V\alpha 1$ - $J\alpha 7/J\alpha 9$ et $V\beta 8.1/V\beta 3.1$ - $J\beta 2.7$ (Arrenberg et al., 2010). De façon similaire au sulfatide, des tétramères CD1d chargés avec le β -glucosylcéramide (β -GlcCer) ou le glucosylsphingosine ont permis l'identification d'autres sous-populations de cellules NKT humaines et murines de type II (Nair et al., 2015). De nombreuses cellules NKT de type II semblent partager des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec des cellules NKT de type I telles qu'une auto-réactivité élevée (Gumperz et al., 2000), un développement thymique dépendant de PLZF et SAP (Zhao et al., 2014; Weng et al., 2014) , une expression constitutive d'ARNm d'IL-4 (Zhao et al., 2014) et la sécrétion rapide d'une

large gamme de cytokines après stimulation, y compris IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, GM-CSF et des médiateurs cytolytiques tels que la perforine (Zhao et al., 2014; Weng et al., 2014). En outre, de nombreuses cellules NKT de type II ont un phénotype actif/mémoire CD44^{hi}CD69⁺CD122⁺, tandis que le CD62L est plus ou moins exprimé (Zhao et al., 2014; Weng et al., 2014; Stenström et al., 2004; Zhang et al., 2011).

L'activation des cellules NKT de type II avec le sulfatide régule la protection contre les maladies auto-immunes. De façon intéressante, chez les souris développant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) ou un T1D (diabète type 1), les cellules NKT de type II réactives au sulfatide s'accumulent respectivement, dans le système nerveux central et dans les ganglions lymphatiques drainants. Ainsi, l'administration de sulfatides dérivés du cerveau ou de sulfatide synthétique protège contre l'EAE et le diabète (Jahng et al., 2004; Subramanian et al., 2012; Maricic et al., 2014). Il a été démontré que le transfert de cellules NKT de type II à des souris obèses entraîne une perte de poids et une tolérance au glucose améliorée (Hams et al., 2013). Dans les maladies inflammatoires du foie, les cellules NKT de type II activées par le sulfatide protègent contre les lésions hépatiques (Halder et al., 2007; Arrenberg et al., 2011). L'administration de sulfatide entraîne l'activation de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Les pDC activées produisent de l'IL-12 et MIP-2 induisant le recrutement des cellules iNKT dans le foie chez la souris. Les cellules iNKT recrutées deviennent anergisées, empêchant ainsi l'induction de l'hépatite induit par Concanavalin A (Con A) (Modèle murin de maladies du foie à médiation par les lymphocytes T) (Halder et al., 2007).

Dans le cas de l'infection par *Trypanosoma cruzi*, un parasite protozoaire, les cellules vNKT ont un rôle protecteur (Duthie et al., 2005). Dans le cancer, les cellules NKT de type II exercent une activité immunosuppressive régulant négativement l'immunosurveillance anti-tumorale (Ambrosino et al., 2007; Hix et al., 2011; Izhak et al., 2013; Renukaradhya et al., 2008).

Dans la suite de notre manuscrit, nous nous intéresserons uniquement aux cellules iNKT.

2. La localisation des cellules iNKT

Chez la souris, les cellules iNKT constituent 0,2-0,5% des lymphocytes (et 0,5-2% des lymphocytes T totaux) dans le thymus, la rate, le sang et la moelle osseuse et

15-35% des lymphocytes hépatiques (30-50% des lymphocytes T hépatiques) (Benlagha et al., 2000; Matsuda et al., 2000). Chez l'homme, la fréquence des cellules iNKT est plus faible. Les cellules iNKT représentent habituellement entre 0,001% et 3% (typiquement 0,01-0,1%) de cellules mononucléées sanguines (PBMC) (Lee et al., 2002; Chan et al., 2009). Cette fréquence est similaire dans la moelle osseuse et la rate chez l'homme (Chan et al., 2010). La fréquence des cellules iNKT humaines est plus faible dans le thymus (~ 0,001-0,01% des lymphocytes) (Baev et al., 2004; Berzins et al., 2005) et plus élevée dans le foie (~ 1%) et l'omentum (10%) (Lynch et al., 2009; Berzins et al., 2011).

3. Le développement des cellules iNKT et l'acquisition de la fonction effectrice

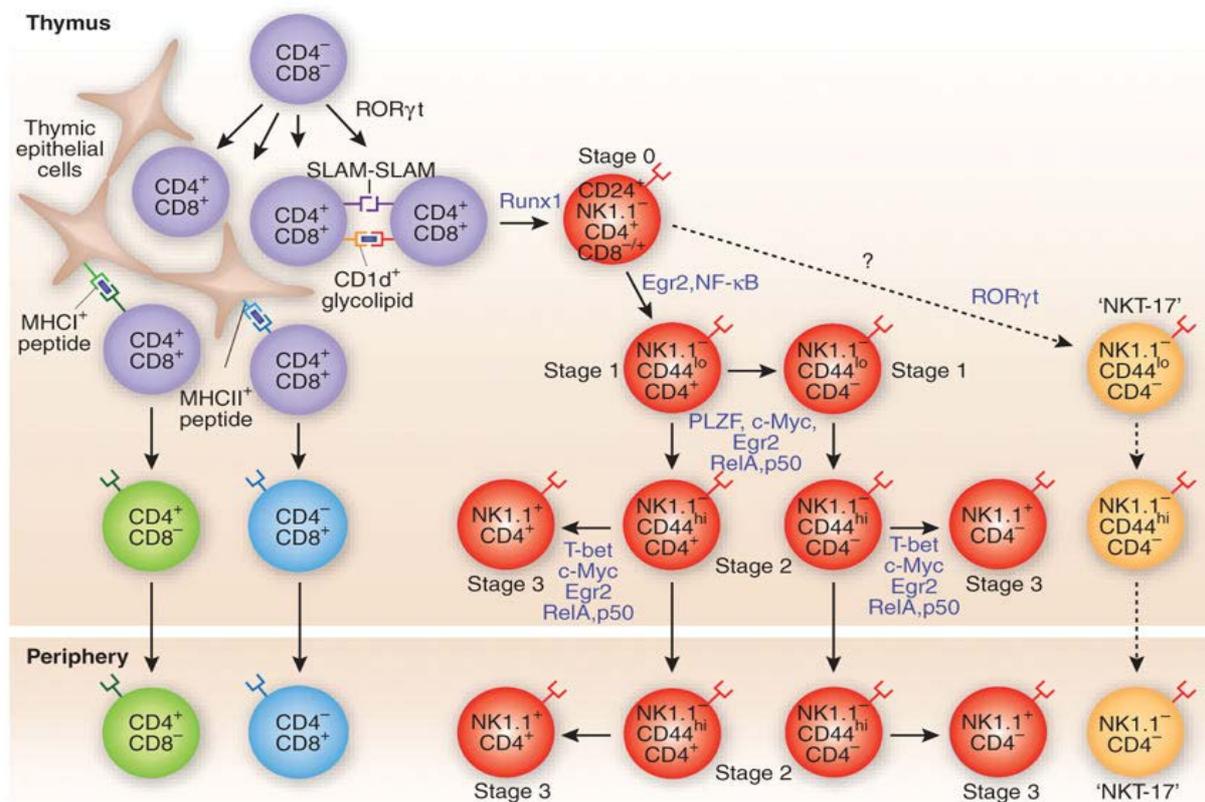
3.1 La sélection positive

Les lymphocytes T conventionnels subissent une sélection positive ou négative qui est déterminée principalement par l'avidité des interactions TCR/ligand. Lorsque les cellules T ont une réactivité faible à intermédiaire à l'auto-peptide/classe I ou classe II du CMH, elles sont positivement sélectionnées et se différencient en cellules T CD8⁺ ou CD4⁺ positives (SP) matures. D'autre part, les cellules T à haute réactivité pour le complexe auto-peptide/CMH sont éliminées par apoptose. Le résultat net de ces interactions permet la génération de lymphocytes T avec une faible ou pas de reconnaissance du soi et l'élimination des lymphocytes T auto-réactifs. Tout comme les lymphocytes T conventionnels, les cellules iNKT subissent également des événements de sélection positive et négative, qui permettent l'élimination de cellules hautement autoréactives tout en conservant un pool fonctionnel de cellules.

Les cellules iNKT se développent dans le thymus à partir de thymocytes CD4⁺CD8⁺ doubles positifs (DP) qui ont subi un réarrangement spécifique de leur TCR. En effet, les souris déficientes pour les protéines de recombinaison RAG-1 et RAG-2 et les souris J α 18^{-/-} sont dépourvues de cellules iNKT. La sélection positive des cellules iNKT est médiée par les interactions homotypiques des thymocytes DP et la reconnaissance du complexe antigène glycolipide/CD1d (figure 1). Les cellules iNKT sont absentes chez les souris CD1d^{-/-} (Coles and Raulet, 2000; Xu et al., 2003). Inversement, elles se développent normalement dans des souris transgéniques pLck-hCD1d où le CD1d est exprimé exclusivement sur des thymocytes corticaux (Schümann et al., 2005). Ces expériences démontrent que l'expression de CD1d, en particulier sur les thymocytes corticaux DP, est essentielle à la sélection positive des

cellules iNKT. De plus, pour une sélection efficace des cellules iNKT, le CD1d doit se recycler par des voies intracellulaires spécifiques, où il peut être chargé avec des antigènes dérivés des endosomes ou des lysosomes (Bendelac et al., 2007). La protéine adaptatrice AP-3 et la prosaposine jouent un rôle important dans le chargement des glycolipides dans le CD1d. En effet, les cellules présentatrices d'antigène (APC) dépourvues d'AP-3 ou de prosaposine ne parviennent pas à activer correctement les cellules iNKT (Kang and Cresswell, 2004). De plus, les souris déficientes en AP-3 et prosaposine présentent un développement des cellules iNKT altéré (Kang and Cresswell, 2004).

Il est de plus en plus admis que le ligand pour la sélection positive des cellules iNKT soit un auto-antigène. Bien que l' α -GalCer soit un agoniste puissant des cellules iNKT, il n'est pas exprimé dans les cellules de mammifères, qui n'expriment pas de glycolipides en anomérie alpha. L' α -GalCer n'est donc pas considéré comme un ligand endogène impliqué dans la sélection thymique. L'isoglobotrihexosylcéramide iGb3, un glycosphingolipide, a été proposé comme un ligand endogène potentiel (Zhou et al., 2004). Mais en 2007, Porubsky et al ont montré que les souris déficientes pour l'enzyme iGb3 synthase, une enzyme essentielle dans la biosynthèse de la molécule iGb3, présentent un développement normal de cellules iNKT (Porubsky et al., 2007).



« Tirée de (Godfrey DI et al, Nature Immunology 2010) »

Figure 1 : Le développement des cellules iNKT. Les cellules NKT apparaissent dans le thymus à partir d'un pool commun de précurseurs de thymocytes doublement positifs CD4⁺CD8⁺ qui ont subi un réarrangement et une expression de gène du TCR aléatoire. L'expression d'un TCR qui se lie avec une avidité appropriée au MHC de classe II ou I (MHCII ou MHCI plus auto-peptide) sur des cellules épithéliales thymiques conduit à la sélection positive de cellules T CD4⁺ conventionnels (vert) ou des cellules T CD8⁺ (bleu), respectivement. Les thymocytes qui expriment un TCR qui se lie au CD1d plus l'auto-lipide ou l'antigène glycolipidique, exprimé par d'autres thymocytes DP, entrent dans la lignée de cellules iNKT (rouge). Une fois sélectionnés, les précurseurs de cellules iNKT subissent une série d'étapes de différenciation qui aboutissent finalement au pool de cellules iNKT. Au moins quatre stades distincts de développement de cellules iNKT ont été définis en fonction de l'expression de CD24, CD44 et NK1.1; Ceux-ci sont contrôlés par une série de facteurs de transcription (bleu). Les cellules iNKT qui émigrent du thymus le font le plus souvent à l'étape 2 et passent à l'étape 3 en périphérie. Certaines cellules iNKT thymiques matures migrent également vers la périphérie mais beaucoup restent comme des cellules thymiques résidentes à long terme. Les cellules NKT CD4⁻ semblent se brancher à partir des cellules NKT CD4⁺ au stade 1 du développement, bien qu'elles le fassent peut-être plus tôt (flèche pointillée). Une voie distincte de développement de cellules iNKT donne naissance à une sous-population productrice d'IL-17 (NKT-17; orange) qui semble être régulée par le facteur de transcription ROR-γt. On en sait beaucoup moins sur la voie de développement de ces cellules (flèche pointillée).

De plus, chez l'homme, l'iGb3 synthase ne semble pas être exprimée et son gène porte également plusieurs mutations ponctuelles qui pourraient probablement inhiber sa fonction (Christiansen et al., 2008). Plusieurs classes de molécules telles que les phospholipides, les glycosphingolipides, les gangliosides et le galactosylcéramide (en anomérie β) et leurs dérivés ont été proposées comme des candidats possibles pour la sélection positive des cellules iNKT (Pour revue, Bendelac et al., 2007). Cependant, en raison du manque de preuves, leur rôle dans ce processus reste controversé.

3.2 La sélection négative

Pour les lymphocytes T conventionnels, la plupart des thymocytes en développement exprimant des TCR ayant une grande avidité pour les auto-peptides subissent une sélection négative. Cependant, cette étape n'est pas aussi clairement définie pour les cellules iNKT. Il a été montré que la surexpression de CD1d chez des souris transgéniques (Tg) entraîne un nombre réduit de cellules iNKT. Chez ces souris (Tg), les cellules iNKT résiduelles présentent à la fois une altération de V β et une sensibilité réduite à l'antigène. La même équipe a également rapporté que l'addition d' α -GalCer à une culture d'organe thymique fœtal (FTOC) induit une disparition dose-dépendante des cellules iNKT, suggérant que les cellules iNKT sont sensibles à la sélection négative (Chun et al., 2003). Une autre étude menée par Pellicci DG et al a montré que, la présence d' α -GalCer pendant que les cellules iNKT se développent ablate leur développement. En revanche, l'introduction retardée de ce composé *in vitro* ou *in vivo*, après que les cellules iNKT se soient développées, n'épuise pas ces cellules. Ces données indiquent que les cellules iNKT traversent une fenêtre de développement où elles sont sensibles à la sélection négative médiée par le TCR et suggèrent que ces cellules avec un niveau élevé d'auto-réactivité peuvent être éliminées avant qu'elles ne quittent le thymus (Pellicci et al., 2003). Cependant ces études sont critiquables car elles utilisent l' α -GalCer qui n'est pas un ligand physiologique. Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre si les cellules iNKT subissent, ou pas, une sélection négative et à quel stade de développement et par l'intermédiaire de quels mécanismes moléculaires ce processus se réalise.

3.3 La maturation des cellules iNKT

Après la sélection positive, les cellules iNKT subissent des stades distincts de maturation qui sont caractérisés par l'acquisition séquentielle de CD4, CD24, CD44 et NK1.1 (figure 1): CD4⁺CD24^{hi}CD44^{lo}NK1.1⁻ (Stade 0), CD4⁺CD24^{lo}CD44^{lo}NK1.1⁻ (stade 1), CD4⁺/DN CD24^{lo}CD44^{hi}NK1.1⁻ (stade 2), et finalement CD4⁺/DN CD24^{lo}CD44^{hi}NK1.1⁺ (stade 3) (Benlagha et al., 2002). Les lymphocytes iNKT de stade 0 sont de petite taille et présents en très faible nombre (environ 1 pour chaque million de thymocytes) (Godfrey and Berzins, 2007), cohérent avec l'observation que les cellules à ce stade ne subissent pas de prolifération. A l'inverse, les cellules iNKT de stade 1 prolifèrent rapidement, ce qui suggère que l'expansion post-sélection des cellules iNKT se produit à ce stade. Puis, au fur et à mesure que ces cellules se

développent, une majorité de cellules CD24^{lo}CD44^{hi}NK1.1⁻ émigrent vers les tissus périphériques, où elles cessent de proliférer et expriment des marqueurs de cellules NK (par exemple les récepteurs (NKG2D et Ly49), CD69 et CD122 (Matsuda et al., 2006). De façon intéressante, une fraction des cellules CD44^{hi} et NK1.1⁻ reste dans le thymus. Cette population, est en phase terminale de maturation et a une longue durée de vie (Berzins et al., 2006; Drennan et al., 2009). Rapidement après la sélection positive, et au cours de leur maturation dans le thymus, les cellules iNKT deviennent fonctionnellement compétentes et peuvent répondre à l'engagement de leur TCR, bien que la nature des cytokines qu'elles produisent varie selon le stade de développement. Par exemple, les cellules iNKT de stade 1 produisent typiquement de l'IL-4 après la stimulation du TCR *in vitro*, alors que les cellules iNKT de stade 2 produisent l'IL-4 et l'IFN- γ et les cellules iNKT matures (stade 3) produisent plus d'IFN- γ que d'IL-4 (Gadue and Stein, 2002). D'autres molécules, comme les effecteurs cytolytiques (perforine, granzyme B et FAS ligand) et des chimiokines et leurs récepteurs voient leur expression augmentée dans les cellules matures du stade 3 (Matsuda et al., 2006).

3.4 Les facteurs régulant le développement et la maturation des cellules iNKT

Comme les lymphocytes T conventionnels, le développement et la maturation des cellules iNKT au stade DP et au-delà dépend de la capacité à exprimer un TCR fonctionnel et une signalisation intacte. Les cellules iNKT sont profondément diminuées ou absentes chez des souris dépourvues en RAG, CD3 ζ , Lck, ZAP-70, SLP-76, ITK, LAT ou Vav (Jordan et al., 2008; Arase et al., 1995; Gadue et al., 1999; Zhang et al., 1999; Chan et al., 2001; Iwabuchi et al., 2001). Le développement des cellules iNKT est régulé par ROR γ t. Ce facteur de transcription prolonge la survie des thymocytes DP par une régulation positive de la molécule anti-apoptotique Bcl-XL et permet les réarrangements des segments de gènes V α 14-à-J α 18 au stade DP (Bezbradica et al., 2005a; Egawa et al., 2005).

Le développement des cellules iNKT dépend également de façon critique de signaux générés par l'engagement de la molécule de la famille des récepteurs de surface « Signaling Lymphocyte Activation Molecule » (SLAM), qui est exprimée sur les thymocytes DP.

Il a été montré que le facteur de transcription c-Myc (myelocytomatosis oncogene) joue un rôle critique dans le développement des cellules iNKT. En l'absence de c-Myc, les précurseurs de cellules iNKT sont bloqués à un stade immature CD44^{lo}

NK1.1⁻. Les cellules iNKT de stade 2 et 3 sont presque complètement absentes en l'absence de c-Myc (Mycko et al., 2009).

La sélection positive génère, via l'activation du TCR, des taux plus élevés de calcium intracellulaire induisant l'activation du facteur de transcription Egr2 (Early Growth Factor 2), un régulateur important du développement des cellules iNKT. Les souris déficientes en Egr2 ont une réduction significative du nombre de cellules iNKT thymiques et périphériques par rapport aux souris sauvages (Hu et al., 2011). Ainsi, l'expression persistante plus élevée d'Egr2 joue un rôle dans les stades précoces et tardifs de la différenciation de la lignée iNKT (Seiler et al., 2012).

L'acquisition des fonctions effectrices des cellules iNKT est étroitement régulée par plusieurs facteurs de transcription (Das et al., 2010). L'un des principaux régulateurs du développement des cellules iNKT et de l'acquisition d'un phénotype et de fonctions effecteur/mémoire est le facteur de transcription PLZF, dont l'expression, induite par Erg2, est la plus élevée dans les populations des stades 0 et 1 (figure 1) (Kovalovsky et al., 2008; Savage et al., 2008). Les animaux déficients en PLZF présentent une réduction sévère du nombre de cellules iNKT et les cellules iNKT déficitaires en PLZF sont incapables de sécréter les cytokines Th1 et Th2 suite à une stimulation (Kovalovsky et al., 2008; Savage et al., 2008). Le facteur de transcription T-bet est indispensable pour les stades finaux de la maturation des cellules iNKT (Townsend et al., 2004; Matsuda et al., 2007) et l'absence de ce facteur de transcription entraîne une diminution du nombre de cellules iNKT en bloquant le développement au stade 2. Les cellules iNKT déficitaires en T-bet ne parviennent pas à proliférer en réponse à l'IL-15. Ce phénomène est lié à une sous-expression de CD122, un composant du récepteur IL-15 (Matsuda et al., 2007). De plus, les cellules iNKT déficientes en T-bet ne parviennent pas à produire l'IFN- γ en réponse à la stimulation du TCR et présentent une activité cytolytique défectueuse (Townsend et al., 2004; Matsuda et al., 2007). Il semble que T-bet régule directement l'activation des gènes associés aux fonctions cellulaires des cellules iNKT matures, comme la perforine, le CD178 et l'IFN- γ (Matsuda et al., 2007).

La génération des cellules iNKT CD4⁺ et la production de cytokines de type Th2 sont régulées par le facteur de transcription GATA-3. De manière similaire aux cellules iNKT déficientes en PLZF, les cellules iNKT déficientes en GATA-3 ne produisent pas de cytokines Th1 ou Th2 en réponse à l' α -GalCer (Kim et al., 2006). Comme les cellules iNKT progressent à l'étape 1, une proportion de cellules régule négativement l'expression de CD4, donnant lieu aux cellules iNKT DN. Des études récentes ont

identifié une sous-population unique de cellules iNKT NK1.1⁻CD4⁻ régulée transcriptionnellement par ROR γ t et capable de produire de grandes quantités d'IL-17 lors de la stimulation (Michel et al., 2008). Au cours du développement dans le thymus, il a été rapporté que la signalisation de TGF- β est nécessaire pour la survie des cellules NKT17 (Havenar-Daughton et al., 2012).

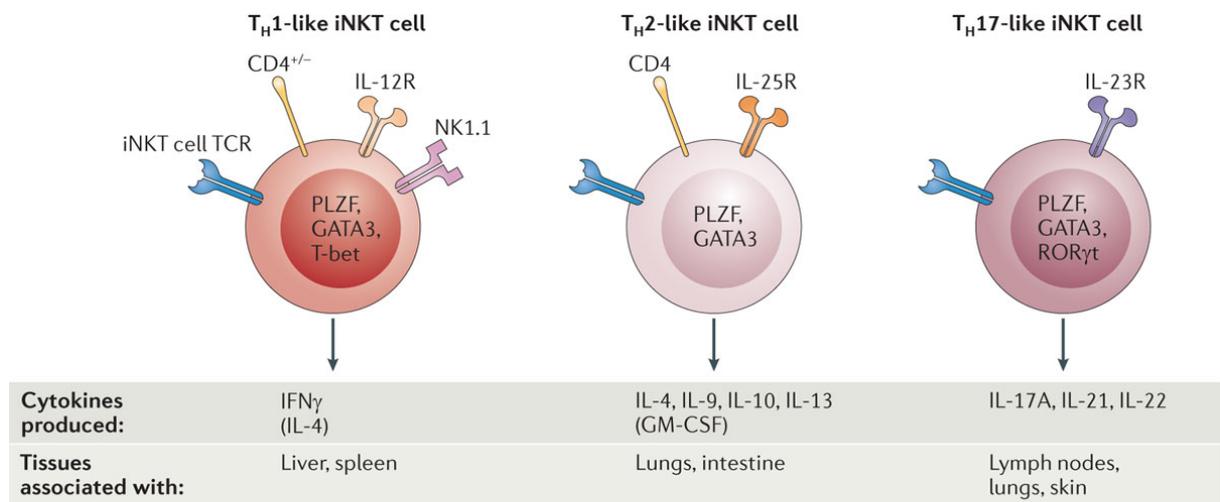
La voie de signalisation rapamycine (mTOR) a également été démontrée pour être importante dans la diversification des cellules iNKT et dans l'acquisition de leurs fonctions effectrices (Shin et al., 2014; Zhang et al., 2014; Wei et al., 2014). L'absence d'expression de mTOR2 peut entraîner une perte des cellules NKT17. Il est à noter que les cellules iNKT sont également parfois classées en NKT1, NKT2 et NKT17 sur la base de leurs profils de production de cytokines et l'expression respective de T-bet, GATA-3 et ROR γ t (Lee et al., 2013; Constantinides and Bendelac, 2013).

4. Les différentes sous-populations de cellules iNKT:

Les cellules NKT ont été caractérisées selon l'expression de CD4 et NK1.1 et selon leur capacité à produire des cytokines Th1 et Th2. Chez l'homme, les cellules iNKT CD4⁺ produisent des cytokines pro- inflammatoires (profil de réponse Th1) et anti-inflammatoires (profil de réponse Th2), alors que la sous-population CD4⁻, qui comprend à la fois les cellules CD8⁺ et double négatif (DN), produit principalement des cytokines Th1 (Godfrey et al., 2010). Ces populations CD4⁺ et CD4⁻ expriment également des récepteurs aux chimiokines différents tels que CCR2, CCR5 et CXCR3. Une partie des cellules iNKT humaines de type Th1 (CD4⁻) exprime CD8 α , et une très petite population exprime CD8 $\alpha\beta$ (Gumperz et al., 2002; Takahashi et al., 2002). Les cellules iNKT CD8 α ⁺ produisent plus d'IFN- γ et sont plus cytotoxiques que les sous-populations CD4⁺ ou CD4⁻CD8⁻ (O'Reilly et al., 2011).

Chez la souris, les cellules iNKT ne semblent pas exprimer le CD8 et l'expression de CD4 ne définit que partiellement les sous-populations distinctes de cellules iNKT (Coquet et al., 2008). D'autres marqueurs de surface cellulaire et l'expression de facteurs de transcription peuvent cependant permettre d'identifier des sous-populations de cellules iNKT fonctionnellement distinctes (figure 2). Deux marqueurs de surface peuvent être utilisés en combinaison avec CD4 pour subdiviser les populations de cellules iNKT chez la souris : le récepteur IL-17 B (IL-17RB, un composant du récepteur IL-25) et le marqueur NK1.1. Les cellules NK1.1⁺ et NK1.1⁻

sont aussi présentes chez l'homme mais les cellules NK1.1⁻ ne sont présentes que dans le thymus.



Nature Reviews | Immunology

« Tirée de (Brennan PJ *et al*, Nat Rev Immunol 2013) »

Figure 2: les différentes sous-populations des cellules iNKT murines. La figure compare les trois sous-populations majeures de cellules iNKT. Les facteurs de transcription cruciaux et les marqueurs de surface associés à chaque sous-population sont présentés. Ces sous-populations sont associées à l'expression constitutive des récepteurs des cytokines pour l'interleukine-12 (IL-12), l'IL-23 et / ou l'IL-25. Les principales cytokines produites par chaque sous-population et les tissus dans lesquels elles sont enrichies sont indiqués.

A. Les cellules iNKT de type Th1 :

Ces cellules constituent la majorité des cellules iNKT dans le foie et la rate chez la souris. Elles produisent de l'IFN- γ , n'expriment pas d'IL-17RB et peuvent présenter un phénotype CD4⁺ ou CD4⁻ (Terashima *et al.*, 2008; Watarai *et al.*, 2012). Les cellules iNKT productrices d'IFN- γ sont pour la plupart NK1.1⁺ (figure 2), bien qu'une partie des cellules iNKT NK1.1⁻ puissent également produire l'IFN- γ (Coquet *et al.*, 2008). Ces cellules peuvent produire certaines cytokines de type Th2, conjointement avec l'IFN- γ , en réponse à des stimuli forts (ligand du TCR) mais elles ne produisent que des cytokines de type Th1 en réponse à IL-12 (Watarai *et al.*, 2012). Les cellules iNKT de type Th1 expriment le facteur de transcription T-bet. Elles expriment également le CD122 (la chaîne β du récepteur IL-15) et requièrent l'IL-15 pour leur développement (Watarai *et al.*, 2012).

B. Les cellules iNKT de type Th2 :

Les cellules iNKT de type Th2 sont caractérisées par l'expression d'IL-17RB et de CD4 (figure 2). Elles peuvent produire l'IL-4, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13 après activation. Ces cellules peuvent être activées par l'IL-25 et sont enrichies dans les poumons où elles contribuent à l'hyperréactivité des voies aériennes de type Th2 d'une manière dépendante de l'IL-25 (Stock et al., 2009; Terashima et al., 2008; Watarai et al., 2012). Ces cellules n'expriment pas T-bet, le facteur de transcription associé aux cellules iNKT de type Th1. À ce stade, aucun facteur de transcription spécifique n'a été associé de façon unique à la production de cytokine de type Th2 dans des cellules iNKT.

GATA3, qui régule la production de cytokines de type Th2 dans les lymphocytes T CD4⁺ restreint au CMH, est exprimé par toutes les cellules iNKT et n'est pas exprimé à des niveaux plus élevés par les cellules iNKT de type Th2 (Watarai et al., 2012). Il est possible que l'expression de GATA3 en l'absence de T-bet ou de ROR γ t conduise au développement de cellules iNKT de type Th2.

Le facteur de transcription, E4 promoter-binding protein 4, (E4BP4, également connue sous le nom de NFIL3) peut avoir un rôle dans la production de cytokines de type Th2 par les cellules iNKT (Motomura et al., 2011), mais ce facteur de transcription est également requis pour la production de cytokines de type Th17 par les cellules iNKT et n'est donc pas spécifiquement associé aux cellules iNKT de type Th2 (Watarai et al., 2012).

C. Les cellules iNKT de type Th17 :

Les cellules iNKT productrices d'IL-17A sont majoritairement contenues dans la sous-population CD4⁺NK1.1⁻ (Doisne et al., 2009; Rachitskaya et al., 2008; Michel et al., 2007). Ces cellules ont également été décrites comme ayant un phénotype CD4⁺IL-17RB⁺ (Watarai et al., 2012). Ces cellules sont capables de produire de l'IL-21 et de l'IL-22 (Coquet et al., 2008; Paget et al., 2012). Comme les cellules Th17, la sous-population de cellules iNKT de type Th17 exprime CCR6 et nécessite ROR γ t pour son développement. Contrairement aux cellules Th17 restreintes au CMH, ces cellules se développent sous la forme d'une population distincte dans le thymus (Doisne et al., 2009; Watarai et al., 2012; Michel et al., 2008). Cette population exprime également l'IL-23R et produit de l'IL-17A en réponse à l'activation médiée par l'IL-23 (figure 2) (Doisne et al., 2009; Watarai et al., 2012). Les cellules iNKT de type Th17 sont enrichies dans les ganglions lymphatiques périphériques, les

poumons et la peau (Doisne et al., 2009; Coquet et al., 2008; Michel et al., 2007). Dans les poumons, ces cellules peuvent réagir à une infection microbienne et contribuer à une hyperréactivité de type neutrophile (Michel et al., 2007).

D. Autres sous-populations de cellules iNKT :

Des sous-populations de cellules iNKT analogues à d'autres populations de lymphocytes T CD4⁺ restreintes au CMH, y compris les cellules TFH 'follicular helper' et les cellules Treg (T regulateurs), ont également été identifiées.

La production d'IL-21 par la sous-population de iNKT 'follicular helper' dépend de BCL6 (B cell lymphoma 6). Cette sous-population exprime la molécule Programmed death-1(PD1) et CXCR5 (Chang et al., 2011a; King et al., 2011).

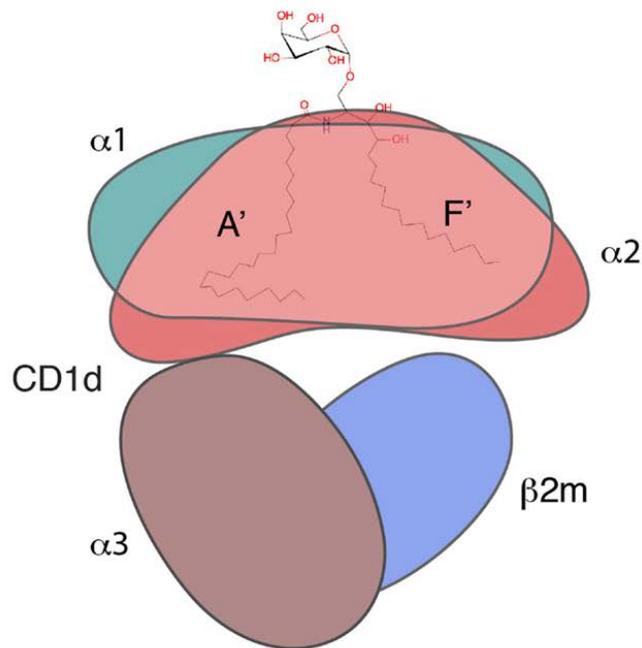
La présence de cellules iNKT exprimant Forkhead box P3 (FOXP3) a été démontrée *in vitro* (Monteiro et al., 2010). Par ailleurs des cellules iNKT productrices d'IL-10 mais FOXP3⁻ ont été identifiées à l'état physiologique, notamment dans le tissu adipeux, mais aussi dans divers états pathologiques (Ji et al., 2012; Lynch et al., 2012; Schipper et al., 2012; Wu et al., 2012; Sag et al., 2014) et notamment dans le sang périphérique de patients atteints de lupus érythémateux systémique (LES) (Bosma et al., 2012).

5. La molécule CD1d et les ligands glycolipidiques :

5.1. La molécule CD1d

Les molécules CD1 sont des glycoprotéines transmembranaires qui présentent des similarités structurales avec le CMH de classe I: une chaîne lourde composée de trois domaines (α 1, α 2 et α 3) liés de manière non-covalente à la β 2-microglobuline via le domaine α 3. Chez l'homme, il existe cinq isoformes du CD1 (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d et CD1e) alors que chez la souris, seule l'isoforme CD1d est exprimée.

La molécule CD1d est exprimée de façon constitutive par la majorité des cellules hématopoïétiques des organes lymphoïdes primaires et secondaires, par les APC telles que les cellules dendritiques (DC), les macrophages, les monocytes et les cellules B (Roark et al., 1998; Brossay et al., 1997), en particulier les cellules B de la zone marginale (Roark et al., 1998; Bialecki et al., 2009).



« Tirée de (Zajonc DM, Front Immunol 2015) »

Figure 3 : Représentation de la molécule CD1d murine. Le domaine $\alpha 1$ - $\alpha 2$ (vert, ombre du saumon) forme les deux poches principales A' et F' de CD1d qui se lient au squelette lipidique, tandis que l'épitope glucidique est exposé. Le domaine $\alpha 3$ (brun) se lie de façon non covalente à la $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$, bleu).

Le CD1d est également exprimé sur les thymocytes corticaux où il est essentiel pour le développement des cellules NKT (Bendelac, 1995). Il est aussi exprimé sur les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques (le foie est très riche en cellules iNKT) (Geissmann et al., 2005). Chez l'homme, les cellules épithéliales intestinales expriment et présentent des antigènes par la molécule CD1d (Dougan et al., 2007). Plus récemment, il a été montré que les adipocytes pouvaient exprimer le CD1d et ainsi présenter des Ags lipidiques aux cellules iNKT (Rakhshandehroo et al., 2014; Huh et al., 2013).

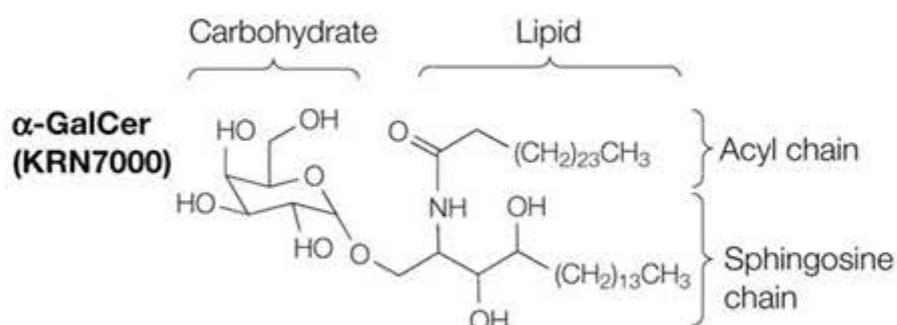
Le site de liaison CD1d/ligand est composé d'hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$, qui forment deux poches hydrophobes profondes, appelées A' et F' (figure 3). Les poches accueillent les chaînes hydrocarbonées des antigènes glycolipidiques conduisant à leur accessibilité au TCR (Koch et al., 2005; Zajonc et al., 2005). La structure de la molécule CD1d est particulièrement bien adaptée pour lier les glycosphingolipides avec la chaîne acyle dans la poche hydrophobe A' et la chaîne sphingosine dans le poche hydrophobe F'.

5.2. Les antigènes glyco/lipidiques reconnus par les cellules iNKT :

Les cellules iNKT peuvent reconnaître, via leur TCR, une variété importante d'antigènes lipidiques incluant l' α -GalCer, des ligands microbiens exogènes et une liste croissante d'auto-antigènes (Kawano et al., 1997; Godfrey et al., 2010; Taniguchi et al., 2010; Brutkiewicz, 2006; Zhou et al., 2004; Rossjohn et al., 2012).

5.2.1. Alpha-galactosylceramide (α -GalCer)

En 1997, Kawano *et al* ont identifié l' α -GalCer comme un ligand exceptionnellement puissant pour les cellules iNKT (Kawano et al., 1997), commercialement désigné sous le nom de KRN7000 par Kirin Brewery. Cet activateur puissant des cellules iNKT murines et humaines, est un glycosphingolipide (GSL) composé d'un squelette de céramide constitué d'une phytosphingosine en C18 avec des groupes hydroxyle en position carbone 3' et 4' et une chaîne d'acide gras en C26. Le lipide du céramide est conjugué au galactose via une liaison α -anomère (figure 4).



« Tirée de (Van Kaer L, Nat Rev Immunol 2005) »

Figure 4: La structure de l' α -GalCer. L' α -GalCer est la désignation générale des glycosphingolipides qui contiennent un galactose glucidique attaché par une liaison alpha à un lipide céramide qui a des chaînes acyle et sphingosine de longueurs variables. Le KRN7000 ((2S, 3S, 4R) -1-O- (alpha-D-galactopyranosyl) -N-hexacosanoyl-2-amino-1, 3, 4-octadécane-1,3,4-triol) est la forme synthétique la plus fréquemment utilisée dans les études expérimentales et est habituellement appelé α -GalCer.

Des études ont documenté l'affinité forte du TCR semi-invariant des iNKT pour les complexes α -GalCer/CD1d (Sidobre et al., 2002; Wun et al., 2011). Les sucres à liaison α fournissent une activation beaucoup plus puissante aux cellules iNKT. La

liaison glycosidique aux lipides est de type β chez les mammifères (Facciotti et al., 2012; Pei et al., 2011) .

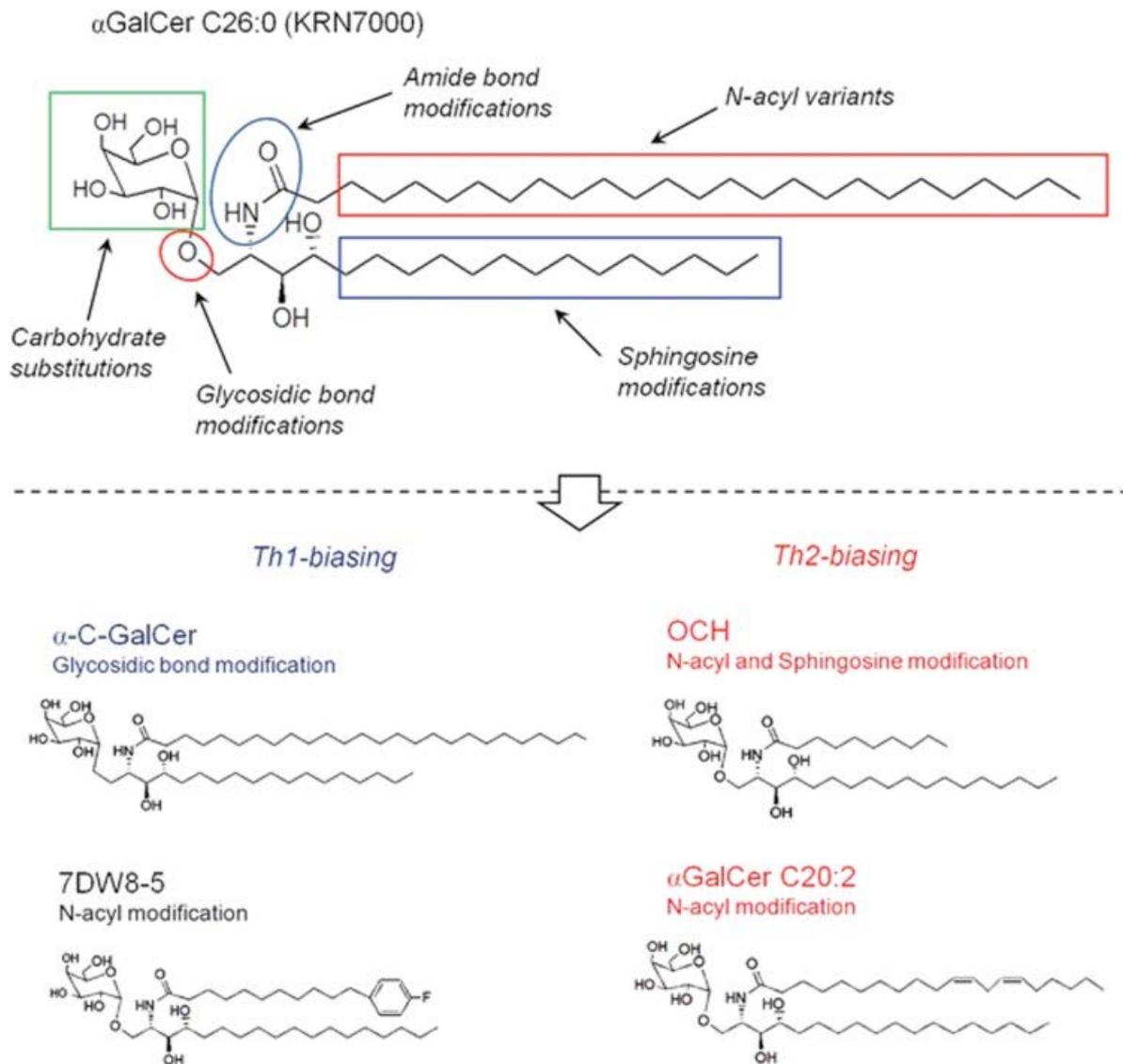
La liaison α est critique pour l'activité antigénique puissante de l' α -GalCer. L'isomère β -anomère (β GalCer) stimule très faiblement les cellules iNKT (Ortaldo et al., 2004). Des études récentes suggèrent toutefois qu'il existe des GSL avec des sucres en liaison α chez les mammifères (Brennan et al., 2014), bien que leur structure complète n'ait pas été déterminée et que ces GSL ne soient pas abondants (Kain et al., 2014).

Pendant de nombreuses années, l' α -GalCer a été le seul antigène décrit comme étant capable d'activer les cellules iNKT. L'activation des cellules iNKT par l' α -GalCer conduit à une réponse cytokinique de type Th1 et Th2, avec des quantités importantes d'IFN- γ et d'IL-4 pouvant être détectées dans le sérum dans les 3-4 heures qui suivent l'injection (Im et al., 2009). La réponse mixte *in vivo* a classé ce composé comme un ligand des cellules iNKT de type Th0 (Im et al., 2009; Arora et al., 2011). Il a été démontré que l'administration de l' α -GalCer chez la souris améliore la clairance d'une variété de pathogènes infectieux sur la base de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules iNKT (Tupin et al., 2007), alors que dans des maladies auto-immunes, l'administration d' α -GalCer améliore la maladie, un phénomène qui dépend de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Van Kaer, 2005).

5.2.2. Antigènes lipidiques synthétiques

La découverte du pouvoir immunoactivateur puissant de l' α -GalCer a conduit à la synthèse de nombreux analogues structuraux (Venkataswamy and Porcelli, 2010; Tyznik et al., 2011). L'objectif de ces recherches était d'identifier des analogues synthétiques capables d'induire une réponse cytokinique de type Th1 et pouvant être utilisés dans le cadre de traitement d'affections telles que le cancer, l'allergie et l'auto-immunité.

Les modifications apportées à cette structure ont inclus des changements dans la chaîne sphingosine, la chaîne N-acyl, la liaison glycosidique et dans la fraction glucidique (Venkataswamy and Porcelli, 2010; Im et al., 2009; Arora et al., 2011) (figure 5).



« Tirée de (Carreño LJ, Clin Transl Immunology 2016) »

Figure 5 : Structure de KRN7000 et ses analogues structuraux. Le KRN7000 est composé d'un α -galactose lié par une liaison 1'-O-glycosidique à une base phytosphingosine C18 et d'une chaîne d'acyle grasse C26 totalement saturée. Quelques exemples d'analogues de polarisation Th1 et Th2 représentatifs et leurs modifications chimiques par rapport à KRN7000 sont présentés sur la figure.

Deux agonistes capables de polariser la production de cytokines Th2 ont été identifiés. Il s'agit d'un analogue connu sous le nom d'OCH, qui contient une chaîne de phytosphingosine (C9) tronquée et une chaîne N-acyle légèrement plus courte (C24) que le KRN7000.

D'autres analogues de l' α -GalCer ont été obtenus en modifiant la longueur et le degré d'insaturation de la chaîne N-acyle : l'analogue C20: 2, qui est également un inducteur très puissant des cytokines Th2. Ces analogues, comparativement au

KRN7000, induisent une production d'IL-4 similaire mais une production d'IFN- γ beaucoup plus faible et plus transitoire chez la souris (Oki et al., 2005; Yu et al., 2005).

L'OCH et l'analogue C20: 2 ont montré des effets thérapeutiques supérieurs dans divers modèles murins de maladies auto-immunes ou inflammatoires comparativement aux agonistes non Th2 tels que le KRN7000 (Forestier et al., 2007; Ueno et al., 2005). Cependant, l'OCH a une capacité très faible à stimuler les cellules iNKT humaines (Forestier et al., 2007; Im et al., 2009). A l'inverse, l'analogue C20: 2 est un agoniste puissant des cellules iNKT humaines, et le profil de cytokines sécrétées est similaire entre le C20: 2 et le KRN7000 (Yu et al., 2005; Im et al., 2009; Silk et al., 2008).

L'analogue C-glycoside (α -C-GalCer) a été identifié chez la souris comme étant un composé induisant peu de sécrétion d'IL-4, mais une production forte et soutenue d'IFN- γ (Schmieg et al., 2003). Ce composé conduit à une transactivation prononcée des cellules NK murines et à une sécrétion d'IFN- γ (Schmieg et al., 2005). Cet analogue a montré des effets thérapeutiques supérieurs par rapport au KRN 7000, dans des modèles murins de cancer et d'infections chroniques (Schmieg et al., 2003). Cependant, l'analogue C-glycoside stimule faiblement les cellules iNKT humaines en culture (Lu et al., 2006; Li et al., 2009a).

Plus récemment, la molécule 7DW8-5 a été identifiée comme le glycolipide le plus puissant avec une bioactivité supérieure à celle de l' α -GalCer (Li et al., 2010). Cet analogue diffère de l' α -GalCer. En effet, il possède un anneau de benzène fluoré à la fin de la chaîne d'acyle gras de longueur C10 (Li et al., 2010). Neal *et al* ont montré que l'administration du composé 7DW8-5 protège de l'infection par le Plasmodium (l'agent du paludisme) et cela plus efficacement que le KRN7000 (Padte et al., 2013).

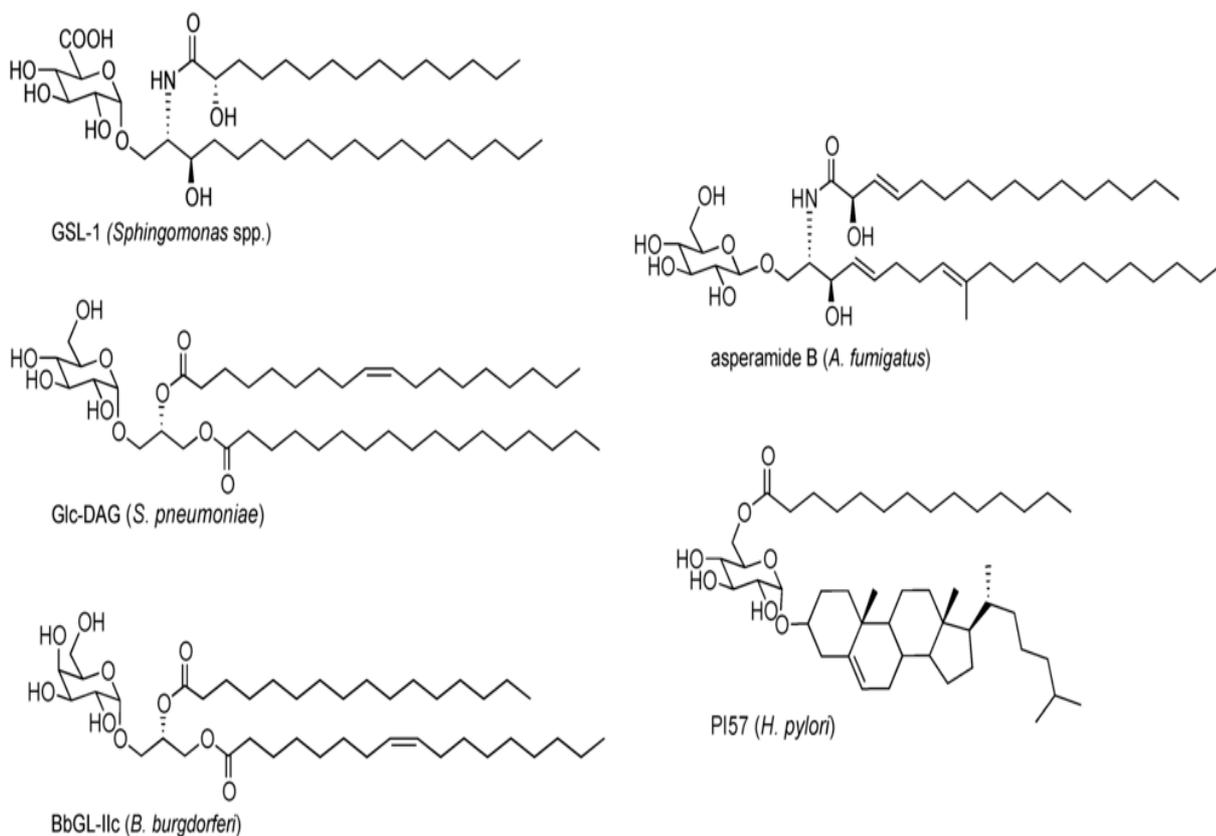
La liste des antigènes lipidiques synthétiques capables d'activer les cellules iNKT est croissante et leur capacité à induire des réponses immunitaires efficaces est très prometteur sur le plan thérapeutique (pour revue, Carreño et al., 2016).

5.2.3. Les ligands exogènes - les glycolipides microbiens

Un certain nombre de glycolipides présents dans les parois cellulaires des bactéries et capables d'activer les cellules iNKT a été identifié. Des études initiales ont démontré que les GSL des bactéries Sphingomonas (gram⁻) contenant un acide galacturonique (GalA) ou un acide glucuronique (GlcA) activaient de façon CD1d-

dépendante les cellules iNKT murines et humaines (figure 6) (Kinjo et al., 2013; Tupin et al., 2007; Mattner et al., 2005; Kinjo et al., 2008; Kronenberg and Rudensky, 2005). D'autres études ont démontré la présence de glycodiacylglycérols chez *Sphingomonas* spp (Mattner et al., 2005; Freigang et al., 2012; Sriram et al., 2005) Ehrlicha, et *Borrelia burgdorferi* (Kinjo et al., 2006) (l'agent de la maladie de Lyme). Par exemple, l' α -galactosyl-diacylglycérol (BbGL-II) de *Borrelia burgdorferi* stimule les cellules iNKT murines de manière dépendante de CD1d (Kinjo et al., 2006; Ben-Menachem et al., 2003).

La liste des antigènes lipidiques microbiens comprend également des glycolipides contenant du glucosyl-diacylglycérol (Glc-DAG) isolé de *Streptococcus pneumoniae* et des streptocoques du groupe B. Ces glycolipides induisent la production de cytokines par les cellules iNKT humaines et murines *in vivo* et cela de façon indépendante de la signalisation du TLR et de l'IL-12 (Kinjo et al., 2011, 2006). Ces pathogènes sont importants d'un point de vue clinique car ils peuvent provoquer des pneumonies, des septicémies et des méningites (Kinjo et al., 2013, 2011). Un autre composé appelé Phosphatidylinositol mannosides (PIM4) a été isolé chez *Mycobacterium bovis*. Celui-ci active les cellules iNKT humaines et murines via le CD1d, déclenchant ainsi la production d'IFN- γ et l'expression de marqueurs de cytotoxicité (Fischer et al., 2004). Il a été montré qu' *Helicobacter pylori*, une bactérie qui colonise l'estomac et est associé à la protection contre l'asthme (Matricardi et al., 2000; Reibman et al., 2008), produit un cholesteryl- α -glucoside (cholesteryl 6-O-acyl α -glucoside, AGlc-Chol) (Hirai et al., 1995) qui a été chimiquement synthétisé (PI57) (figure 6). Lorsque PI57 est administré en i.p. aux souris de 2 semaines, il augmente le nombre total de cellules iNKT DN dans le poumon fournissant une protection contre le développement de l'hyperréactivité des voies aériennes (AHR) chez la souris. Cette molécule (PI57) induit des niveaux plus élevés d'IFN- γ par les cellules iNKT murines et humaines de façon dépendante de CD1d (Chang et al., 2011b).



« Tirée de (Anderson BL *et al*, *Molecules*. 2013) »

Figure 6: Structure de différents ligands exogènes des cellules iNKT. De nombreuses sources de pathogènes activent les cellules iNKT via leur expression de molécules glycolipidiques comme : GSL-1 par *sphingomonas spp*, Glc-DAG par *S.pneumoniae*, BbGL-II c par *B.burgdorferi*, asperamide B par *A.fumigatus* et PI57 par *H.pylori*.

Dans un modèle d'infection fongique, Albacker *et al* ont décrit un glycolipide extrait d'*Aspergillus fumigatus*, un champignon se trouvant dans l'environnement et couramment associé à la sensibilisation allergique et à l'asthme sévère chez l'homme qui active directement les cellules iNKT via le CD1d. Ce glycosphingolipide, l'asperamide B, est le premier antigène fongique décrit comme étant capable d'être présenté par CD1d et de stimuler directement les cellules iNKT murines et humaines (Albacker *et al.*, 2013).

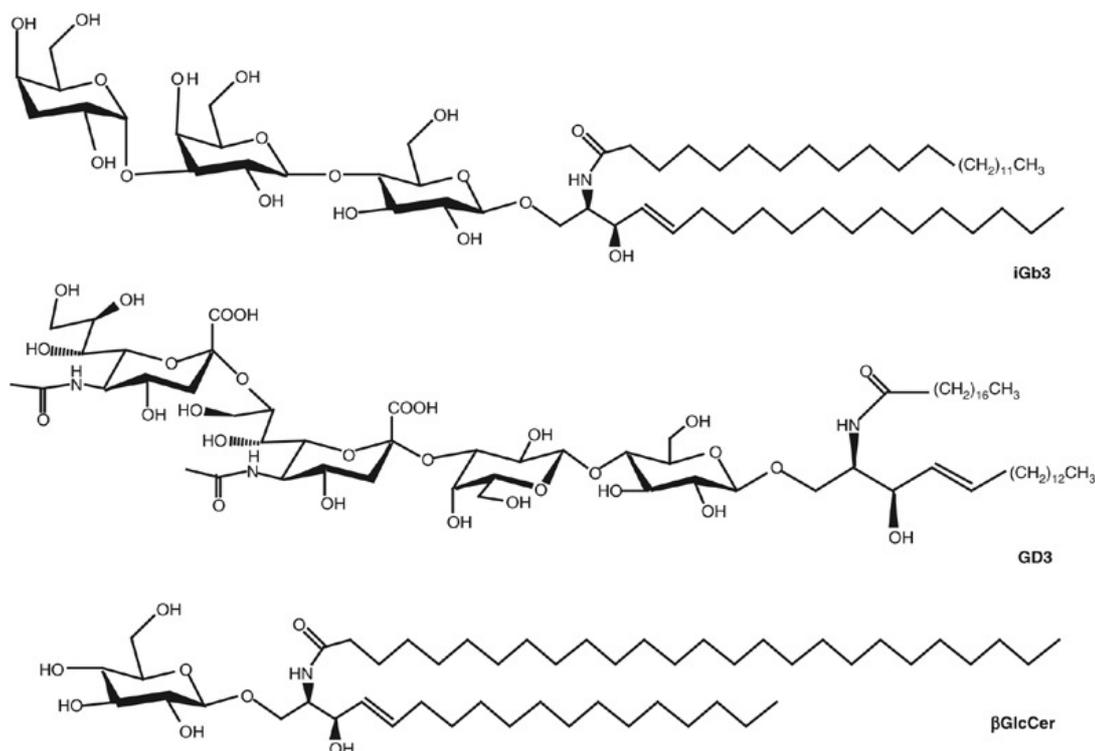
L'ensemble de ces travaux montre que le spectre de reconnaissance antigénique des cellules iNKT est assez large et que de nombreux agents pathogènes bactériens peuvent produire des structures lipidiques capables de les activer.

5.2.4. Les antigènes endogènes:

Ces auto-antigènes sont principalement des glycosphingolipides, mais la liste comprend également une variété de phospholipides. Les antigènes endogènes des cellules iNKT sont nécessaires à la sélection des cellules iNKT dans le thymus. Ils pourraient aussi contribuer à l'activation de ces dernières lors d'épisodes inflammatoires et infectieux (Brennan et al., 2011).

A. Les glycosphingolipides

L'isoglobotrihexosylcéramide (iGB3), un GSL issu de la dégradation de l'isoglobotétrahexosylceramide, est reconnu à la fois par les cellules iNKT murines et humaines (figure 7). Les souris ayant une déficience génétique de l'enzyme de dégradation du glycosphingolipide lysosomal, l'enzyme β -hexosaminidase b ($\text{Hexb}^{-/-}$) impliquée dans la synthèse de l'iGB3, présentent une réduction sévère du nombre de cellules $\text{V}\alpha 14$ NKT (environ 95% de réduction). Cela suggère que ce lipide favorise le développement des cellules iNKT chez la souris lors de la sélection positive (Zhou et al., 2004).



« Tirée de (Speak AO et al, Immunol Cell Biol 2008) »

Figure 7 : Les structures des ligands endogènes des cellules iNKT de type glycosphingolipidiques. L'isoglobotrihexosylcéramide (iGB3), le ganglioside GD3 et le Beta-glucosylceramide (β -GlcCer).

Cependant, un rapport plus récent a démontré que les souris déficientes en iGB3-synthase ont un nombre normal de cellules iNKT (Porubsky et al., 2007). Il a été suggéré que le défaut cellulaire des iNKT chez les souris Hexb^{-/-} pourrait être dû à une fonction lysosomale altérée plutôt qu'à une absence d'iGB3 (Gadola et al., 2006). En outre, l'iGB3 est présent à des niveaux pratiquement indétectables dans les tissus lymphoïdes murins (Li et al., 2009b; Speak et al., 2007).

Des études chez l'homme ont révélé que l'antigène iGB3 n'est pas présent sur les cellules de mammifères (Speak et al., 2007) car l'iGB3-synthase qui le génère est absente (Christiansen et al., 2008). Wu et ses collaborateurs ont suggéré que le ganglioside GD3, qui est fortement exprimé sur les tumeurs des cellules neuroectodermiques, pouvait stimuler les cellules iNKT (Wu et al., 2003).

Le laboratoire d'accueil a démontré l'existence de structures glycolipidiques chargées (probablement des gangliosides) exprimées au sein des DC (décrit ci-dessus) activées par le CpG ODN (un agoniste du TLR9) et capables d'activer les cellules iNKT (Paget et al., 2007). Un travail plus récent montre qu'en effet le GD3, mais aussi le GM3, sont des activateurs potentiels des cellules iNKT (Paget et al., en préparation).

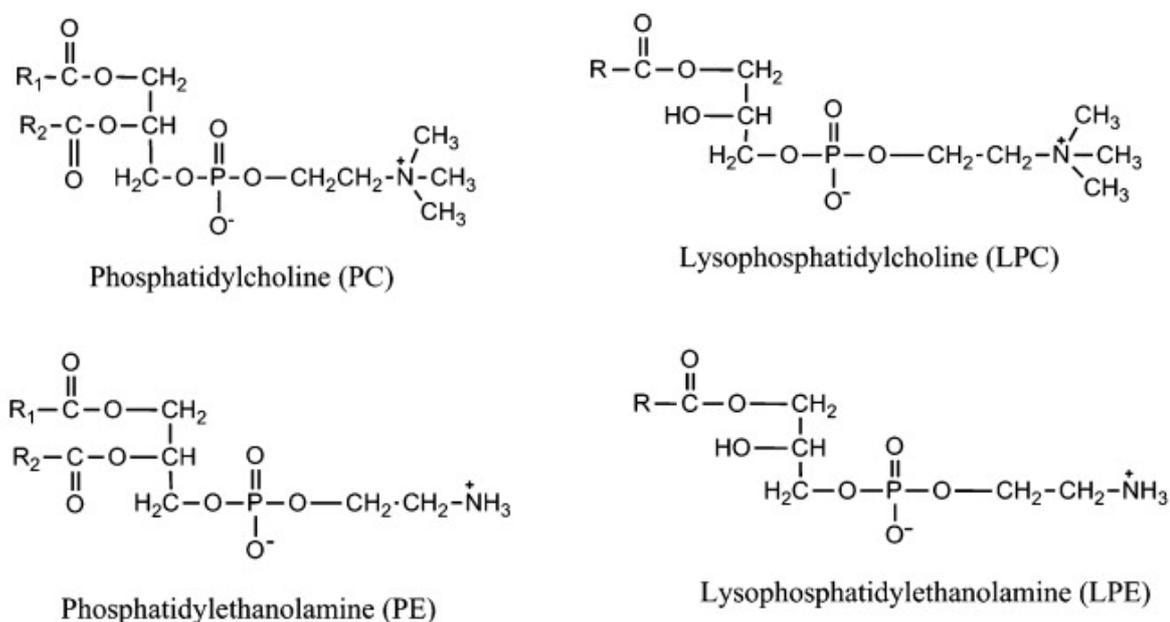
Récemment, Brennan PJ *et al* ont montré que le β -D-glucopyranosylcéramide (β -GluCer) était un ligand endogène capable de stimuler l'activité des cellules iNKT murines et humaines et que son activité dépendait de la composition de la chaîne N-acyle (Brennan et al., 2011).

De plus, le β -GlcCer, précurseur de la plupart des GSLs en dehors du système nerveux central, s'accumule dans l'APC après stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) et *in vivo* après une infection bactérienne. Le blocage de la synthèse de β -GlcCer dans des DC dérivées de moelle osseuse (BMDC) réduit l'activation des cellules iNKT en réponse au LPS, au CPG ODN ou à des bactéries entières (Paget et al., 2007; Brennan et al., 2011).

B. Les phospholipides

En plus des GSL, d'autres études ont identifié les phospholipides comme des auto-antigènes capables de stimuler les cellules iNKT. Ceux-ci incluent le phosphatidylcholine, le phosphatidylinositol et le phosphatidyléthanolamine (Bendelac et al., 2007; Venkataswamy and Porcelli, 2010). Ces composés activent un faible pourcentage de cellules iNKT de manière dépendante de CD1d (Bendelac et al., 2007). Bien que les phospholipides soient proposés comme des auto-

antigènes pour les cellules iNKT, leur activité stimulatrice est faible par rapport aux antigènes lipidiques à énantiomère α . De plus, ces composés n'activent qu'une faible proportion de cellules. Des études ont visé à analyser la structure des lipides présents, de façon naturelle, dans la poche hydrophobe de la molécule CD1d. Ainsi, Fox et coll ont identifié le lysophosphatidylcholine comme un auto-antigène capable d'activer une sous-population de cellules iNKT humaines (Fox et al., 2009) (figure 8). Dans une autre étude, le lysophosphatidylcholine a été isolé du plasma de patients atteints de myélome multiple et a également été montré comme stimulant l'activation des cellules iNKT (Chang et al., 2008). Le lysophosphatidylcholine contient une seule queue d'acide gras et est connu pour s'accumuler en conditions inflammatoires telles que l'auto-immunité, l'asthme et les cancers où les phospholipases sont activées. Contrairement aux cytokines sécrétées par les cellules iNKT telles que l'IFN- γ et l'IL-4 en réponse à d'autres stimuli, les cellules iNKT stimulées par les lysophospholipides ne sécrètent que le GM-CSF. Plus récemment, il a été montré que les lysophospholipides activent les cellules NKT de type II aussi puissamment que le sulfatide. Leur capacité à activer ces cellules pourrait être importante dans les maladies inflammatoires du foie en induisant l'anergie des cellules NKT de type I, ce qui protège contre l'hépatite induite par la concanavaline A (Maricic et al., 2015).



« Tirée de (Zhao YY et al, J Chromatogr A 2011) »

Figure 8 : Structures de ligands endogènes de type phospholipidique.

Le plasmalogène C16-lysophosphatidyléthanolamine (pLPE), un lipide à base de glycérol avec une seule chaîne d'acide gras, a été identifié comme un auto-antigène qui non seulement stimule l'activation des cellules iNKT mais est également nécessaire pour la génération d'un répertoire complet de cellules iNKT *in vivo* (Facciotti et al., 2012).

6. Mécanismes d'activation des cellules iNKT

Les cellules iNKT sont capables de s'activer très rapidement en réponse à une stimulation dépendante du TCR mais aussi en réponse à certaines cytokines. Plusieurs mécanismes d'activation ont été décrits.

6.1. Activation purement dépendante du TCR

L'activation classique des cellules iNKT se fait suite à la reconnaissance par son TCR, d'un glycolipide présenté par le CD1d. La plupart des études ont utilisé l' α -GalCer (Kronenberg, 2005; Bendelac et al., 2007). D'autres chercheurs ont utilisé la molécule CD1d soluble et ont montré *in vitro* après fixation du CD1d sur une plaque, que les glycolipides microbiens liés au CD1d étaient suffisants pour activer les cellules iNKT (Kronenberg, 2005). Ces résultats ont été confirmés physiologiquement avec plusieurs glycolipides microbiens récemment identifiés à partir d' α -protéobactéries, telles que *Sphingomonas*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, ainsi que *Borrelia*. Ces glycolipides agonistes peuvent activer directement les cellules iNKT (Kinjo et al., 2005, 2006; Mattner et al., 2005; Sriram et al., 2005) indépendamment des TLR ou de l'IL-12.

6.2. Activation dépendante du TCR et de cytokines

Les cellules iNKT sont capables de sécréter rapidement des cytokines au cours des processus infectieux même si l'agent infectieux ne produit pas de lipides restreints à la molécule CD1d, comme cela est le cas pour *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis* ou au cours des infections virales (Mattner et al., 2005; Brigl et al., 2003). Il semble en fait qu'au cours de ces infections, la stimulation des récepteurs innés de signalisation (Pattern recognition receptors, PRR), dont les récepteurs de type Toll (TLR) sur les DC joue un rôle clé. Il a été montré que l'activation des DC via les TLR pourrait contribuer à la synthèse de néoantigènes lipidiques capables d'activer les cellules iNKT, notamment de gangliosides. En parallèle, la sécrétion par les DC activées de cytokines telles que

l'IL-12, l'IL-18 et/ou l'IFN de type I participe au processus d'activation des cellules iNKT (Mattner et al., 2005; Brigl et al., 2003; Paget et al., 2007; Brigl et al., 2011).

6.3. Activation dépendante de cytokines

Les cellules iNKT expriment, parfois fortement, plusieurs récepteurs de cytokines. Par conséquent, des cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-18 peuvent conduire à l'activation des cellules iNKT et cela en l'absence d'engagement du TCR. Plusieurs études ont montré que les cellules iNKT libéraient de l'IFN- γ lorsqu'elles étaient stimulées par l'IL-12 et l'IL-18 (Leite-De-Moraes et al., 1999; Eberl and MacDonald, 1998; Park et al., 2003). Ces résultats ont été confirmés au cours d'une infection virale. En effet, l'infection par le cytomegalovirus murin (MCMV) conduit à l'activation des DC d'une manière dépendante du TLR9 et de la production d'IL-12 et d'IFN α/β . Ces 2 types de cytokines activent directement les cellules iNKT de façon indépendante du CD1d (Tyznik et al., 2008). De manière intéressante, en l'absence d'engagement du TCR, mais en coopération avec l'IL-12, IL-33 peut également induire la production de l'IFN- γ par les cellules iNKT (Bourgeois et al., 2009). Plus récemment, Paget et al ont montré qu'au cours de l'infection par le virus de l'Influenza A (IAV), l'IL-1 β et l'IL-23 produits par les DC infectées activent les cellules iNKT indépendamment de la molécule CD1d. Cette voie d'activation aboutit à la production de l'IL-22 par les cellules iNKT ce qui pourrait être bénéfique pour préserver l'intégrité de l'épithélium pulmonaire (Paget et al., 2012; Ivanov et al., 2013).

7. Etat d'activation des cellules iNKT en réponse à l' α -GalCer

7.1 Primo activation :

Lors de la stimulation du TCR par l' α -GalCer, les cellules iNKT modulent les réponses immunitaires en produisant rapidement et en grande quantité, diverses cytokines (Bendelac et al., 2007; Michel et al., 2007; Monteiro et al., 2013) et en exprimant à leur surface des molécules de co-stimulation, dont CD40. Ce processus aboutit à la trans-activation de nombreuses populations cellulaires dont les DC, les cellules NK, les macrophages, et les cellules T et B (Bendelac et al., 2007). Ainsi, les cellules iNKT jouent un rôle intermédiaire important entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. De par cette propriété unique, les cellules iNKT jouent un rôle central dans les réponses immunitaires associées au cancer, aux maladies auto-

immunes, aux infections et à l'inflammation (Terabe and Berzofsky, 2008; Simoni et al., 2013).

Après l'administration de l' α -GalCer chez la souris (8-12h), les cellules iNKT deviennent rapidement indétectables (internalisation transitoire du TCR) (Wilson et al., 2003; Crowe et al., 2003; Harada et al., 2004). Ces données ont clairement écarté la possibilité que l'administration de l' α -GalCer entraînait la mort cellulaire des cellules iNKT périphériques. Lors de l'activation avec l' α -GalCer, les cellules iNKT prolifèrent rapidement *in vivo* et atteignent un pic au troisième jour (Parekh et al., 2005; Wilson et al., 2003; Crowe et al., 2003). Après la période d'expansion, le nombre des cellules iNKT se réduit par des mécanismes impliquant le facteur proapoptotique Bim, membre de la famille Bcl-2 (Uldrich et al., 2005).

7.2 Activation secondaire «phénomène d'anergie»

Les cellules iNKT acquièrent un comportement anergique (état de non réponse) en réponse au traitement secondaire avec l' α -GalCer (Parekh et al., 2005; Uldrich et al., 2005; Ikarashi et al., 2005; Fujii et al., 2002). Cette anergie limite l'efficacité de l' α -GalCer et pose un obstacle majeur aux approches immunothérapeutiques basées sur l'activation des cellules iNKT.

Chez la souris, et à titre d'exemple, les cellules iNKT anergisées sont incapables de protéger contre le développement de mélanomes B16 métastatiques dans le poumon lors d'une nouvelle stimulation avec l' α -GalCer (Parekh et al., 2005).

L'anergie des cellules iNKT décrite par Parekh *et al* a plusieurs caractéristiques en commun avec l'anergie des lymphocytes T conventionnels : elle est durable, indépendante de l'antigène persistant et réversible avec l'administration de l'IL-2. Comme dans les lymphocytes T conventionnels, l'apport exogène d'IL-2, mais pas d'IL-15, restaure la prolifération de cellules iNKT anergiques et la production d'IL-4 mais pas d'IFN- γ (Iyoda et al., 2010).

Certaines études montrent que l'absence d'activation des cellules iNKT anergisées est liée à un défaut de signalisation du TCR, comme cela est le cas pour les lymphocytes T conventionnels. L'activité de Cbl-b, E3 ubiquitin-protein ligase, est critique pour l'induction de l'anergie. Cbl-b favorise la dégradation de CARMA1, une molécule critique impliquée dans l'activation de NF- κ B par le TCR. Les cellules iNKT CARMA1^{-/-} sont incapables de produire l'IFN- γ après stimulation par l' α -GalCer. La diminution de la production d'IFN- γ observée dans les cellules iNKT anergisées et l'échec du rejet de la tumeur sont restaurés chez les souris Cbl-b^{-/-} (Kojo et al.,

2009). Une analyse transcriptomique récente, réalisée par le laboratoire, montre que de nouvelles voies de signalisation pourraient être altérées au sein des cellules iNKT anergisées.

Les cellules iNKT anergisées expriment des taux élevés de la molécule Programmed death-1 (PD-1 ou CD279), un membre de la famille des récepteurs CD28. L'interaction de PD-1 sur des lymphocytes T avec ses ligands, PD-L1 (B7-H1 ou CD274) et PD-L2 (B7-DC ou CD273) sur les APC délivre des signaux inhibiteurs aux lymphocytes T. Parekh *et al* ont montré que les cellules iNKT des souris déficientes en PD-1 étaient résistantes au développement de l'anergie induite par l' α -GalCer. De plus, le blocage des interactions PD-1/PD1-L au moment du traitement par l' α -GalCer empêche l'induction de l'anergie des cellules iNKT et améliore l'activité antitumorale de l' α -GalCer chez la souris (Parekh *et al.*, 2009). Une étude plus récente réalisée par T Kamata *et al* en 2016 a montré que le blocage de PD-L1 sur des APC sensibilisées avec de l' α -GalCer augmentait la production de cytokines Th1, la fonction cytotoxique directe des cellules iNKT humaines et entraînait une cytotoxicité accrue des cellules NK chez les patients de NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) (Kamata *et al.*, 2016). Ces résultats sont en contradiction avec ceux d'Iyoda *et al* qui montrent que l'injection d' α -GalCer chez les souris déficientes en PD-1 conduit à l'anergie des iNKT. De plus, l'utilisation d'anti-PD-1 ne rétablit pas l'activation des cellules iNKT (Iyoda *et al.*, 2010).

La nature des APC pourrait jouer un rôle crucial dans l'induction de l'anergie des cellules iNKT. Il a été démontré que les DC chargées avec l' α -GalCer activent fortement les cellules iNKT et ne les rendent pas anergiques contrairement aux lymphocytes B sensibilisés avec l' α -GalCer. En effet, les lymphocytes B qui expriment de faibles niveaux de molécules co-stimulatrices anergisent puissamment les cellules iNKT (Parekh *et al.*, 2005). L'injection intradermique de l' α -GalCer par rapport à l'injection intraveineuse chez les souris active les cellules iNKT via les DC sans induire l'anergie et induit une protection tumorale supérieure (Bontkes *et al.*, 2010).

En accord avec les résultats obtenus chez la souris, il a été montré chez l'homme que le traitement répété par l' α -GalCer libre entraîne une diminution progressive du nombre de cellules iNKT circulantes tandis que la vaccination par les DC chargées avec l' α -GalCer induit une expansion des cellules iNKT (Giaccone *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2005).

De façon intéressante, les cellules iNKT pulmonaires ne s'anergisent pas après l'injection répétée d' α -GalCer par voie intranasale. Les DC et non les cellules B sont impliquées dans la présentation sélective de l' α -GalCer aux cellules iNKT dans le poumon (Courtney et al., 2011; Ivanov et al., 2012). De plus, l' α -GalCer administré en tant qu'adjuvant par voie intranasale conduit à une induction efficace des réponses immunitaires cellulaires aux antigènes co-administrés (Courtney et al., 2011). L'anergie des cellules iNKT a été décrite dans le contexte d'une infection microbienne (Chiba et al., 2008). Il a été montré que les cellules iNKT humaines expriment des taux plus élevés de PD-1 lors de l'infection par HIV (Moll et al., 2009), Mycobacterium tuberculosis (Kee et al., 2012) et lors de la sarcoïdose (Snyder-Cappione et al., 2013). L'expression de PD-1 chez ces patients corrélait négativement avec la prolifération et la production de l'IFN- γ par les cellules iNKT en réponse à l' α -GalCer.

L'acquisition d'un phénotype anergique par les cellules iNKT est peut-être une condition préalable essentielle pour éviter une inflammation incontrôlée et une destruction des tissus.

7.3 Réponse IL-10 régulatrice

Récemment, le phénotype «anergique» des iNKT a été remis en question (Sag et al., 2014). Sag et al ont montré que les cellules iNKT précédemment stimulées avec l' α -GalCer se divisent plus rapidement que les cellules iNKT non stimulées. De plus, ces cellules restent cytotoxiques et peuvent réagir à la restimulation avec l' α -GalCer. Les auteurs montrent dans cet article que les cellules dites iNKT «anergiques» ont des propriétés communes avec les lymphocytes T régulateurs, y compris l'expression accrue de CTLA4, PD1, Nrp-1 (Neuropilin-1) et le récepteur de folate 4 (FR4) ainsi que l'expression constitutive d'IL-10. Ces auteurs ont donc nommé ces cellules, les NKT10 (Sag et al., 2014).

De manière intéressante, les cellules NKT10 sont identifiées dans les tissus adipeux de souris ainsi que dans le sang périphérique humain. Les cellules NKT10 préviennent l'immunité anti-tumorale suite à une injection d' α -GalCer mais sont bénéfiques dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de la sclérose en plaques (Sag et al., 2014). L'identification de cette nouvelle sous population de cellules iNKT soulève des questions intéressantes. Il n'est pas encore clair si cette sous population se développe dans le thymus et s'expand suite à une stimulation, ou bien si cette sous-population se différencie plus précocement

dans le thymus. De plus, les mécanismes moléculaires régulant le développement et la différenciation des cellules NKT10 ne sont pas encore connus. Des données récentes provenant d'études sur les cellules T CD8⁺ effectrices indiquent que la protéine E2A régule l'expression de l'IL-10 en collaboration avec IRF4 (Masson et al., 2014). L'identification de la sous population NKT10 fournit cependant quelques réponses sur le rôle anti-inflammatoire attribué aux cellules iNKT dans diverses maladies. Dans un modèle allogénique de transplantation cutanée, l'activation répétée des cellules iNKT en utilisant l' α -GalCer a entraîné une réduction du rejet de transplantation (Oh et al., 2005). A l'époque, les auteurs avaient suggéré que ce phénomène pouvait être lié à la production d'IL-10. L'identification des cellules NKT10 endogènes pourrait aussi expliquer le rôle régulateur attribué aux cellules iNKT trouvées dans le tissu adipeux sous-cutané (Huh et al., 2013; Ji et al., 2012). L'activation avec l' α -GalCer des cellules iNKT isolées à partir du tissu adipeux sous-cutané de souris saines conduit à une augmentation de la production de l'IL-10, l'IL-4 et l'IL-2, ce qui favorise l'expansion des macrophages M2 suppresseurs et des cellules Treg adipeuses (Ji et al., 2012; Huh et al., 2013; Lynch et al., 2015). Ainsi, les cellules NKT10 semblent jouer un rôle tolérogène dans le maintien du tissu adipeux sain. La capacité de l' α -GalCer à induire le développement des cellules NKT10 *in vivo* est partagée avec quatre autres antigènes polarisant de type Th1 qui possèdent des structures apparentées (C-Gly, EF77, SMC124 et DB06-1) (Wingender et al., 2015; Birkholz et al., 2015). En revanche, aucune expansion de cellules NKT10 n'a été observée avec l'antigène de type OCH (à polarisation de type Th2). L'activation de cellules iNKT induite par les cytokines (IL-12 et IL-18 suite à l'administration du LPS) ou suite à une infection virale (MCMV, virus de la grippe) ou bactérienne (*Sphingobium yanoikuyae*), n'induit également pas d'expansion de cette sous-population (Wingender et al., 2015; Barthelemy et al., 2017).

8. Rôle des cellules dendritiques dans l'activation des cellules iNKT

Les cellules iNKT n'ont pas besoin de stimulation directe de leurs TCR pour être activées. Par exemple, les DC stimulées par un ligand de type TLR4 (LPS *Salmonella Typhimurium*), TLR7 (le ligand R848) ou TLR9 (CPG-ODN) induisent l'activation des cellules iNKT via la neosynthèse d'antigènes endogènes (GSL) au sein des DC. La production d'IL-12, IL-18 et/ou IFN de type I par les DC favorise l'activation des cellules iNKT (Brigl et al., 2003; Salio et al., 2007; Paget et al., 2007). Dans le cas d'*Escherichia coli*, qui exprime le LPS, les DC peuvent activer les cellules iNKT directement via l'IL-12 et l'IL-18 de façon indépendante du CD1d (Nagarajan and Kronenberg, 2007).

Il a été démontré que l'administration de DCs chargées en α -GalCer conduit à une production prolongée d'IFN- γ par les cellules iNKT par rapport aux souris ayant reçu une seule injection d' α -GalCer soluble. Cette activité n'est pas trouvée pour les cellules autres que les DC (les macrophages et les lymphocytes B) pulsées avec l' α -GalCer (Fujii et al., 2002). En éliminant les DC (en utilisant les souris CD11c-DTR), il a été montré que les DC sont cruciales pour l'activation *in vivo* des cellules iNKT (Bezbradica et al., 2005b; Schmiege et al., 2005). En outre, lorsque les souris sont immunisées avec de l' α -GalCer libre ou incorporé au sein d'APC peu de temps après l'administration de cellules de mélanome B16 *in vivo*, la formation de métastases dans le poumon est significativement réduite chez les souris ayant reçu des DC chargées d' α -GalCer par rapport à l' α -GalCer libre (Fujii et al., 2002; Parekh et al., 2005). Les effets antitumoraux sont en corrélation avec le nombre de cellules iNKT productrices d'IFN- γ .

En revanche, plusieurs groupes ont montré que, les cellules iNKT deviennent anergiques pendant de longues périodes de temps lorsqu'elles sont exposées à une seule injection d' α -GalCer libre (Fujii et al., 2002; Parekh et al., 2005; Uldrich et al., 2005). L'anergie des cellules iNKT pourrait être le résultat de la présentation non spécifique de l' α -GalCer par les cellules B (Fujii et al., 2002; Parekh et al., 2005).

Récemment, Veinotte L *et al* ont montré que l'interaction CXCR6/CXCL16, exprimés par les cellules iNKT et les DC respectivement, joue un rôle dans la régulation des réponses des cellules iNKT. Ces auteurs ont montré que le transfert de DC CXCL16^{hi} chargées d' α -GalCer aux souris WT augmente la production d'IFN γ par les cellules iNKT par rapport à la délivrance de DC CXCL16^{neg} ou de DC CXCL16^{-/-} chargées d' α -GalCer. En outre, les DC CXCL16^{hi} ou CXCL16^{+/+} chargées d' α -GalCer génèrent

une protection améliorée contre les métastases tumorales par rapport aux DC CXCL16^{neg} ou DC CXCL16^{-/-} (Veinotte et al., 2016).

Ces études révèlent un rôle crucial des DC dans la modulation et l'activation de cellules iNKT *in vivo*. Ils pourraient avoir des implications dans la conception d'immunothérapies qui exploitent les fonctions immunorégulatrices des cellules iNKT (Fujii, 2008).

9. Les cellules dendritiques (DC)

Les DC englobent une famille hétérogène de cellules dérivées de la moelle osseuse reconnues comme les cellules les plus spécialisées et les plus puissantes parmi les APC du système immunitaire (Banchereau et al., 2000; Steinman et al., 1975; Steinman, 2012). Il y a plus de quatre décennies, Ralph Steinman et Zanvil Cohn les identifiaient à l'origine comme une population rare de cellules «mobiles» avec une morphologie «stellate» distincte et des projections ramifiées étendues (Steinman et al., 1975). Des études ultérieures ont établi que les DC ont une capacité supérieure par rapport aux autres APC à activer les lymphocytes T naïfs dans les zones de lymphocytes T secondaires pour déclencher une réponse immunitaire primaire (Banchereau et al., 2000; Steinman et al., 1975; Steinman, 2012). Les DC sont spécialisés dans la capture des antigènes et dans leur présentation en association avec le CMH. Ces complexes sont efficacement reconnus par le TCR des lymphocytes T. De plus, les DC fournissent aux lymphocytes T de puissants signaux de co-stimulation pour amplifier et contrôler les réponses immunitaires (Banchereau et al., 2000; Steinman et al., 1975; Steinman, 2012). Il a été clairement établi que les DC jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'équilibre entre l'immunité et la tolérance (Banchereau and Steinman, 1998; Cools et al., 2007; Steinman and Banchereau, 2007). En raison de leurs propriétés au sein du système immunitaire, les DC sont largement étudiés en particulier dans les domaines de la transplantation, de l'allergie, des maladies auto-immunes, des maladies infectieuses et du cancer (Banchereau et al., 2000; Steinman et al., 1975; Steinman, 2012).

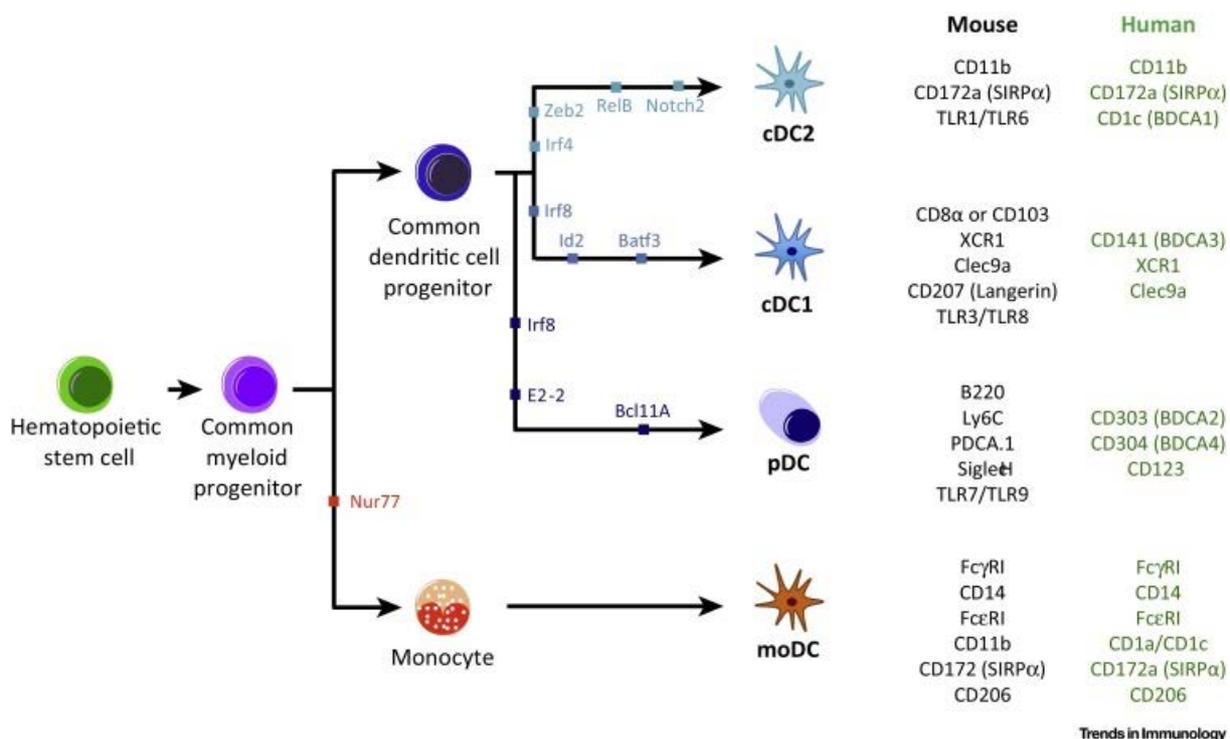
9.1 Les sous-populations de DC

Les DC ont été divisés en sous-populations sur la base de l'expression de certains marqueurs de surface: CD103 (également connu sous le nom d'intégrine α E), CD11b (également connu sous le nom d'intégrine α M), CX3C-récepteur de chimiokine 1 (CX3CR1), F4/80, CD8 α , CD24, CD172 α (également connu sous le nom de SIRP α

et SHPS1), XC-récepteur de chimiokine 1 (XCR1), CLEC9A (également connu sous le nom de DNGR1), E-cadhérine (également appelée cadhérine 1) et CD64 (FcγRI). Les DC peuvent se diviser en trois sous-types principaux : deux lignées principales de DC conventionnelles (cDC) : «cDC de type 1 (cDC1s)» pour les DC CD8α⁺ et CD103⁺ et «cDC2s» pour les DCs CD11b⁺ et CD172α⁺. Les DC plasmacytoïdes (pDC) représente le deuxième groupe de DC.

9.1.1 Les DC conventionnelles

Les cDC dérivent de progéniteurs (pré-cDC) qui proviennent eux même du progéniteur commun des DC (CDP). L'analyse transcriptomique a montré que les cDC possèdent une signature moléculaire spécifique qui les distingue des pDC et d'autres populations de cellules myéloïdes (Miller et al., 2012). En particulier, le facteur de transcription zbtb46 est spécifiquement exprimé par les cDCs (Satpathy et al., 2012; Meredith et al., 2012).



« Tirée de (Gardner A, Trends Immunol 2016) »

Figure 9. Différenciation des DC. Les DC font partie de la lignée cellulaire hématopoïétique, provenant de cellules souches hématopoïétiques, qui se différencient ensuite en progéniteurs communs des cellules myéloïdes (CMP). Le facteur de transcription Nur77 est important dans la différenciation des CMPs en monocytes. Ces derniers peuvent se différencier en DC dérivées de monocytes

(moDCs) dans des conditions inflammatoires. Les CMPs peuvent également générer des progéniteurs de cellules dendritiques (CDP) DC appelés CDP. Les sous-populations de DC conventionnelles, les (cDC1) et (cDC2), et les pDC proviennent du CDP, avec les facteurs de transcription critiques indiqués pour chaque lignée. Les marqueurs pour chaque sous-population de DC sont affichés à droite, pour les souris (noir) ou l'homme (vert). Les cDC1 chez la souris peuvent être identifiées par l'expression de CD8 α dans les organes lymphoïdes ou de CD103 dans les tissus périphériques.

Récemment, deux études ont identifié les précurseurs des cDC1 et cDC2 : les «pré-cDC1s» et «pré-cDC2s» (figure 9) (Grajales-Reyes et al., 2015; Schlitzer et al., 2015).

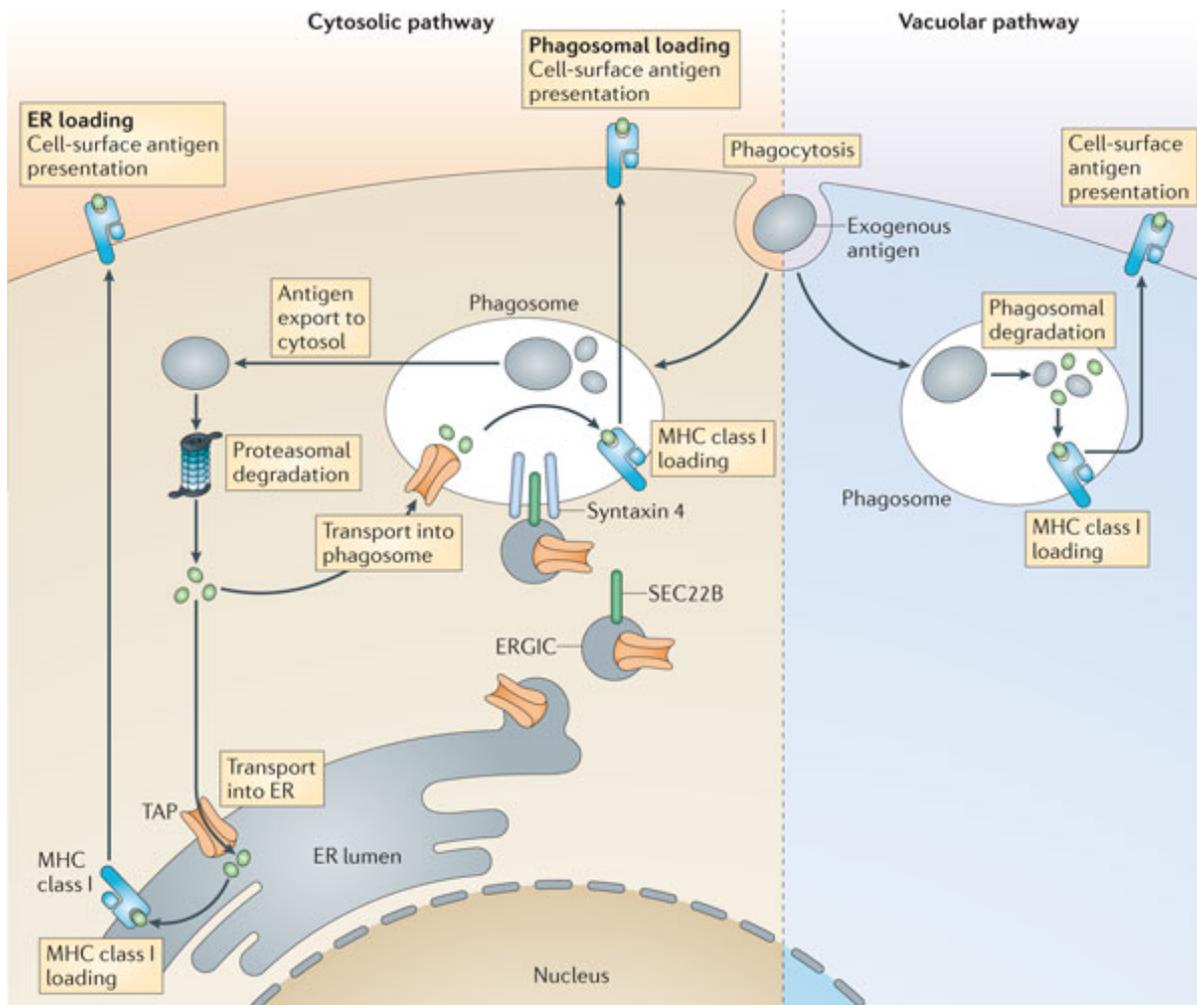
Bien que le développement de toutes les sous-populations de DC soit principalement dépendant du FLT3L (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) (McKenna et al., 2000; Ginhoux et al., 2009), la différenciation en sous-populations de DC est également contrôlée par de nombreux autres facteurs, notamment les facteurs de transcription.

A. Les cDC1 :

Ces cellules cDC1, également appelées DC dépendantes de Batf3, comprennent des DC CD8 α ⁺ résidents et des DC CD103⁺ langerin⁺ migrants. Ces cellules partagent une ontogénie commune et une signature moléculaire, y compris l'expression spécifique de XCR1 et TLR3 (Croizat et al., 2010; Miller et al., 2012). Leur développement dépend des facteurs de transcription IRF8 et Batf3 (Ginhoux et al., 2009; Hildner et al., 2008; Edelson et al., 2010). Les souris dépourvues d'IRF8 (IFN-regulatory factor 8) (Schiavoni et al., 2002), d'ID2 (DNA-binding protein inhibitor) (Ginhoux et al., 2009; Hacker et al., 2003), du BATF3 (basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3) (Hildner et al., 2008) ou du NFIL3 (nuclear factor interleukin (IL)-3-regulated protein) (Kashiwada et al., 2011) présentent un grave défaut dans le développement de cDC1. Les DC dépendantes de Batf3 sont spécialisées dans la présentation croisée (présentation d'antigènes exogènes par la molécule de CMH de classe I) en raison de caractéristiques spécifiques de leur voie endocytaire (Guilliams et al., 2016, 2014).

On a signalé deux voies intracellulaires principales pour la présentation croisée d'antigènes exogènes, les voies «cytosolique» et «vacuolaire» (figure 10). La présentation croisée via la voie cytosolique est sensible aux inhibiteurs du protéasome (Kovacsics-Bankowski and Rock, 1995), ce qui suggère que les

protéines internalisées accèdent au cytosol, où elles sont dégradées par le protéasome. Les peptides générés par le protéasome sont ensuite transportés et transloqués dans le réticulum endoplasmique (RE) par TAP1/2 (Transporter associated with antigen processing) et chargés ensuite sur des molécules du CMH de classe I nouvellement synthétisées. Il n'existe cependant aucune preuve directe que la charge de peptides sur les molécules du CMH de classe I se produise dans le RE. Le recrutement de TAP et du complexe de chargement de CMH de classe I/peptides, tels que la tapasin - la calreticuline et l'ERp57, vers les phagosomes et les endosomes suggère que le chargement des peptides pourrait se produire dans les compartiments endocytaires (Houde et al., 2003; Guermonprez et al., 2003; Burgdorf et al., 2008). De plus, les polypeptides générés par le protéasome doivent être coupés par des amino-terminal peptidases avant d'être chargés sur des molécules du CMH de classe I. ERAP1 (ER-associated aminopeptidase 1) et IRAP (endosomal insulin-responsive aminopeptidase), également connue sous le nom de cystinyl aminopeptidase, ont été mises en évidence pour être impliquées dans la présentation croisée (Firat et al., 2007; Saveanu et al., 2009).



Nature Reviews | Immunology

« Tirée de (Olivier P, Nature Reviews Immunology 2012) »

Figure 10: Intracellular pathways for cross-presentation in dendritic cells. Après la phagocytose, les antigènes exogènes peuvent être exportés dans le cytosol, où ils sont traités par le protéasome. Les antigènes traités peuvent ensuite être chargés sur des molécules du CMH de classe I dans le réticulum endoplasmique (RE) (la voie cytosolique avec chargement RE) ou réimportés dans le phagosome pour être chargés sur des molécules du CMH de classe I (voie cytosolique avec chargement phagosomal). En outre, les antigènes exogènes peuvent être dégradés en peptides dans le phagosome, où ils sont ensuite chargés sur des molécules de CMH de classe I (voie vacuolaire).

En revanche, la présentation croisée via la voie vacuolaire est résistante aux inhibiteurs du protéasome et est généralement indépendante de TAP, mais est sensible aux inhibiteurs de la protéolyse lysosomale (en particulier, les inhibiteurs de

la cathepsine S) (Bertholet et al., 2006; Shen et al., 2004). Ceci suggère que le traitement et le chargement de l'antigène sur les molécules du CMH de classe I se produisent tous les deux dans les compartiments endocytaires. Ajoutant à la confusion, il a été montré récemment que la voie cytosolique (protéasome-dépendante) peut également se produire indépendamment de TAP, éventuellement à travers un autre, encore non identifié, transporteur peptidique (Merzougui et al., 2011).

Après l'absorption de l'antigène, la dégradation de l'antigène dans les compartiments endocytaires reste limitée dans les DC CD8 α^+ par le maintien d'un pH alcalin dans les endosomes et les phagosomes. Ce phénomène est dû à la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) dans les compartiments endocytaires de DC CD8 α^+ suite au recrutement de NOX2 par RAC2 (Savina et al., 2009).

L'engagement de XCR1, exprimé par les DC CD8 α^+ , et le XCL1, une puissante chimiokine produite par les lymphocytes T CD8 $^+$ suite à la reconnaissance de l'antigène, a été proposé pour développer une réponse CTL efficace *in vivo* (Croizat et al., 2010; Dorner et al., 2009). XCL1 est un Chemoattractant pour les DC CD8 α^+ , via son récepteur XCR1, mais pas pour les DC CD8 $^-$ ou d'autres types cellulaires. Fonctionnellement, XCL1 augmente l'expansion de lymphocytes T CD8 $^+$ spécifiques de l'antigène et leur capacité à sécréter l'IFN- γ . L'absence de XCL1 altère le développement de la cytotoxicité aux antigènes présentés par les DC CD8 α^+ (Dorner et al., 2009).

De plus, l'ablation *in vivo* des DC dépendantes de Batf3 abroge la présentation croisée d'antigènes solubles ou associés à des cellules et d'antigènes dérivés de tumeurs ou de pathogènes (Hildner et al., 2008; Edelson et al., 2010; Igyártó et al., 2011; Helft et al., 2012).

En 2014, Arora et ses collègues ont montré, en utilisant des souris Batf3 $^{-/-}$, que les DC CD8 α^+ étaient fortement impliquées dans l'activation des cellules iNKT via la présentation des glycolipides, y compris l' α -GalCer, par le CD1d (Arora et al., 2014).

Ushida *et al* ont montré, en utilisant l' α -GalCer marqué avec un fluorophore, que les DC CD8 α^+ incorporaient de plus grandes quantités d' α -GalCer et le conservaient intact plus longtemps que les DC CD8 α^- où le Cy5- α GC est dégradé par le faible pH des endosomes (Ushida et al., 2015).

D'autres études ont montré que les DC CD8 α^+ sont particulièrement puissantes non seulement pour activer les cellules iNKT mais aussi pour déclencher des réponses immunitaires innées.

Dans notre laboratoire, nous avons développé une stratégie de ciblage active afin de délivrer l' α -GalCer au sein des DC CD8 α^+ . Pour ce faire, nous avons utilisé des nanoparticules (NPs) à base de PLGA (poly lactic coglycolic acid) couverts par un anticorps anti-DEC205, récepteur d'endocytose fortement exprimé sur les DC CD8 α^+ . La prise en charge de l' α -GalCer par les DC CD8 α^+ active fortement les cellules iNKT *in vitro* et *in vivo*. De façon intéressante, après une primo-activation par les NP/DEC205/ α -GalCer, les cellules iNKT sont capables de répondre de nouveau à une seconde stimulation en évitant l'anergie. De même, la co-délivrance d' α -GalCer et d'ovalbumine (OVA) dans les DC CD8 α^+ améliore les propriétés adjuvantes d' α -GalCer et induit des réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques de l'OVA plus importante comparativement à l'administration de ces composés sous une forme libre (Macho-Fernandez et al., 2014).

B. Les cDC2 :

Les cDC2 dépendants d'IRF4 comprennent les DC CD8 α^- CD11b $^+$ résidents et les DC CD11b $^+$ migrants. Leur développement dépend des facteurs de transcription tels que RelB et IRF4 (Wu et al., 1998; Suzuki et al., 2004; Schlitzer et al., 2013). Ces cellules sont spécialisées pour la présentation des antigènes restreints au CMH II (Dudziak et al., 2007; Vander Lugt et al., 2014). Il a été montré que les DC dépendantes d'IRF4 induisent la différenciation des cellules T CD4 $^+$ naïves en cellules de type Th2 et Th17 dans les ganglions lymphatiques drainants en réponse à un allergène ou à l'infection par un pathogène (Schlitzer et al., 2013; Plantinga et al., 2013; Persson et al., 2013; Gao et al., 2013; Williams et al., 2013).

9.1.2 Les DC plasmacytoïdes:

Les pDC sont considérées comme des DC résidentes qui sont complètement matures dans la moelle osseuse avant d'entrer dans la circulation sanguine. Cependant, elles peuvent être recrutées dans les tissus périphériques pendant l'inflammation (Reizis et al., 2011). Les pDCs dérivent du précurseur pré-pDC qui provient lui-même du progéniteur commun des DC (figure 9) (Naik et al., 2007; Onai et al., 2007). Leur développement dépend de Flt3-L et des facteurs de transcription BCL11A et E2-2 (Cisse et al., 2008; Ippolito et al., 2014). La reconnaissance des virus ou des auto-acides nucléiques par les pDCs est principalement médiée par les récepteurs TLR7 et TLR9. L'activation de ces récepteurs entraîne la sécrétion d'IFN

de type I via la voie MyD88-IRF7 ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines via la voie MyD88-NF- κ B (pour revue, Gilliet et al., 2008; Blasius and Beutler, 2010; Kawai and Akira, 2011). TLR7 détecte les ARNs viraux, l'ARN endogène et les oligoribonucléotides synthétiques, tandis que TLR9 détecte les ADN viraux contenant des séquences d'ADN riches en CpG non méthylées, l'ADN endogène et les oligodésoxyribonucléotides CpG synthétiques. Puisque les pDC expriment de manière constitutive des niveaux élevés d'IRF7 et produisent des IFN de type I (Kim et al., 2014), elles sont largement résistantes à l'infection virale (Kumagai et al., 2009; Lund et al., 2006; GeurtsvanKessel et al., 2008; Swiecki et al., 2010; Cervantes-Barragan et al., 2012).

9.2 Les DC humaines

Historiquement, les DC humaines trouvées dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes ont été classées en deux groupes principaux : les pDC et les DC «conventionnelles» ou «myéloïdes». Les DC conventionnelles ou myéloïdes ont été subdivisées en deux sous-groupes sur la base de leur expression de CD141 (également connu sous le nom de BDCA3 et de thrombomoduline) et de CD1c (également connu sous le nom de BDCA1) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010; Schlitzer et al., 2013; Segura et al., 2012; Yu et al., 2013). Il a été montré que les profils d'expression génique et les fonctions des DC CD141⁺ et des DC CD1c⁺ humaines ressemblent à ceux des cDC1 et cDC2 murines (Haniffa et al., 2012; Crozat et al., 2010; Jongbloed et al., 2010; Robbins et al., 2008). Il a été montré que l'injection de FLT3L chez des volontaires humains a considérablement augmenté le nombre de pDC de sang, cDCs CD141⁺ (cDC1s) et cDCs CD1c⁺ (cDC2s) (Pulendran et al., 2000). De plus, E2-2, BATF3 et IRF4 sont des facteurs de transcription importants respectivement pour les pDCs (Cisse et al., 2008), cDCs CD141⁺ (cDC1s) (Poulin et al., 2012) et cDCs CD1c⁺ humaines (cDC2s) (Schlitzer et al., 2013; Watchmaker et al., 2014). Certains marqueurs phénotypiques sont conservés entre les sous-populations de DC murines et humaines. D'autres facteurs de transcription impliqués peuvent être différents chez l'homme, comme les patients avec des mutations IRF8 manquent les deux sous-populations de cDC (Hambleton et al., 2011).

Récemment, plusieurs études ont montré que les DC BDCA3^{hi}CLEC9A⁺, également appelés DC BDCA3⁺, excellent dans la présentation croisée et l'activation des lymphocytes T CD8⁺ (Poulin et al., 2010; Jongbloed et al., 2010; Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010). Les DC BDCA3⁺ produisent de grandes quantités d'IFN

de type III (IFN- λ) en réponse aux virus ou à l'ARN synthétique polyI: C (Lauterbach et al., 2010; Zhang et al., 2013; Yoshio et al., 2013; Schulte et al., 2015). Cette cytokine favorise les réponses Th1 et augmente l'activité antivirale (hépatite B) (Egli et al., 2014; Wack et al., 2015).

La CLEC9A (C-type lectin domain family 9A, DNGR-1) est un récepteur de lectine de type C impliqué dans la détection et la présentation d'antigènes dérivés de cellules nécrotiques (Caminschi et al., 2008; Huysamen et al., 2008; Sancho et al., 2009). Cette molécule, également fortement exprimée chez les DC CD8 α^+ murines, est exprimée de manière quasiment sélective sur des mDC BDCA3 $^+$. Une faible expression sur les cellules B et les monocytes a aussi été décrite (Caminschi et al., 2008; Huysamen et al., 2008; Sancho et al., 2008). Chez l'homme, les DC BDCA3 $^+$ exprimant CLEC9A se retrouvent dans le sang, la rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales et la moelle osseuse (Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010). Il a été démontré, chez la souris, que le ciblage des DC CD8 α^+ , (protéine de fusion anticorps anti-clec9a et antigène) aboutissait à la présentation de l'antigène par le MHC de classe I et de classe II (Caminschi et al., 2008; Durant et al., 2014; Idoyaga et al., 2011; Joffre et al., 2010; Lahoud et al., 2011; Picco et al., 2014; Sancho et al., 2008). De manière intéressante, même en l'absence d'adjuvant, le ciblage d'antigène au sein des DC exprimant Clec9a peut également favoriser une puissante immunité humorale et entraîner un développement long et efficace des lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Lahoud et al., 2011). Une étude menée par Park HY *et al* a analysé la réponse des cellules B suite à l'injection de petites quantités de haptén nitrophenol (NP) conjuguées à l'anti-Clec9A en l'absence d'adjuvants. Des réponses Ab élevées et très prolongées, approchant celles obtenues par de fortes doses de protéine NP non ciblé avec de l'adjuvant alun ont été obtenues. La réponse à NP-anti-Clec9A comprenait la formation transitoire de centres germinatifs, la maturation de l'affinité des Ab et une certaine formation de cellules B mémoires. Les titres d'Ab du sérum sont restés élevés 35 semaines après la vaccination (Park et al., 2013a). L'administration ciblée *in vivo* d'antigènes tumoraux en combinaison avec un adjuvant induit une immunité antitumorale dans un modèle de mélanome murin (Sancho et al., 2008).

Zhongyi Yan *et al* ont découvert un nouveau peptide WH, qui peut se lier sélectivement aux DC Clec9a $^+$ murines induites par Flt3L. Lorsqu'il est couplé à l'épitope OVA257-264, le peptide WH améliore la présentation croisée de l'OVA257-264 par les DC Clec9a $^+$ et favorisent ainsi l'activation des lymphocytes T CD8 $^+$

spécifiques d'OVA. Dans un modèle de souris à métastases pulmonaires B16-OVA, les auteurs ont montré que le peptide de fusion WH-OVA257-264 peut améliorer l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et diminuer les loci des métastases pulmonaires (Yan et al., 2016).

Picco G et ses collègues ont montré en utilisant des épitopes HLA-A2 provenant de l'Ag associé à la tumeur, MUC1, couplés à l'Ab anti-Clec9a une efficacité dans la génération d'une réponse de cellules Th1 et l'inhibition de la croissance tumorale dans un modèle de souris transgénique exprimant MUC1 et A2K/b humains à la fois dans les paramètres prophylactiques et thérapeutiques. En outre, ils ont également montré, en utilisant des PBMC isolées à partir de sang des volontaires sains, que le ciblage de l'épitope HLA-A2 de l'Ag MUC1 au CLEC9A humaine *in vitro* peut induire une réponse de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de MUC1 (Picco et al., 2014). Ces travaux montrent que CLEC9A est une cible prometteuse pour augmenter l'efficacité des vaccins contre les maladies infectieuses ou malignes.

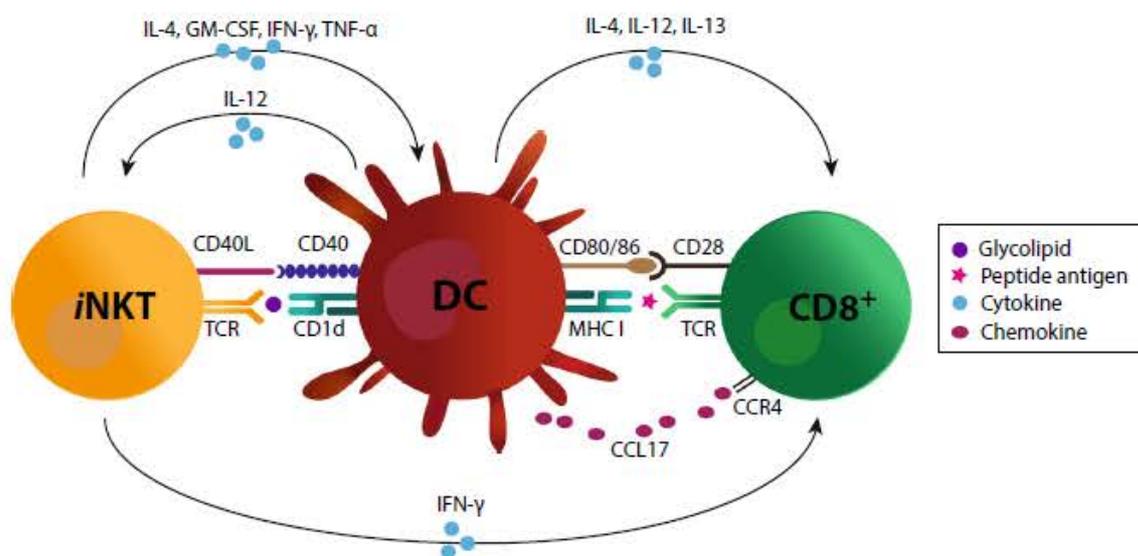
10. Le rôle adjuvant des cellules iNKT dans la régulation de la réponse immunitaire

La fonction régulatrice des cellules iNKT dans l'induction de l'immunité adaptative est surtout liée à la production de cytokines par ces dernières. L'administration d' α -GalCer entraîne l'activation des cellules iNKT, un événement qui est caractérisé par une production rapide et robuste d'une variété de cytokines et de chimiokines, y compris IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF α , TGF β , GM-CSF, RANTES, éotaxine, MIP-1 α et MIP-1 β (Matsuda et al., 2008; Monteiro and Graca, 2014). L'activation des cellules iNKT conduit à l'activation polyclonale des cellules T, B et NK et à la mobilisation des macrophages et des neutrophiles (Wu and Van Kaer, 2011). Cela suggère un rôle possible des cellules iNKT en tant que cellules auxiliaires immunologiques.

La présentation d' α -GalCer par le CD1d exprimé sur les DC conduit à une interaction réciproque entre les cellules iNKT et les DC. Les cellules iNKT régulent à la hausse l'expression de CD40L et libèrent des cytokines, y compris l'IFN- γ (Kitamura et al., 1999; Matsuda et al., 2000; Tomura et al., 1999). Ceci favorise la maturation des DC et l'expression des marqueurs de co-stimulation, tels que CD80 et CD86, CMH II et la production d'IL-12 (Brigl et al., 2003). Les DC matures produisent des chimiokines qui attirent d'autres cellules immunitaires et orchestrent la réponse immunitaire.

Eberl et ses collègues ont montré que les cellules iNKT activées par l' α -GalCer pouvaient induire une prolifération étendue de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires via des voies dépendantes de l'IFN- γ et de l'IL-12 (Eberl et al., 2000). Il a été rapporté que, lorsqu'il était utilisé comme adjuvant, l' α -GalCer pouvait induire une puissante réponse immunitaire antitumorale par les cellules T CD4⁺ de façon dépendante des cellules iNKT (Chung et al., 2007; Hong et al., 2006).

L'aide fournie par les cellules iNKT peut aussi améliorer les réponses des lymphocytes T CD8⁺ aux peptides co-injectés (Hermans et al., 2003; Fujii et al., 2003; Silk et al., 2004; Gottschalk et al., 2015). D'une manière similaire à l'aide des lymphocytes T CD4⁺ conventionnelles, l'aide apportée par les cellules iNKT dépend de façon critique de la présentation des peptides et des glycolipides par la même DC et de l'interaction CD40/CD40L (figure 11) (Ridge et al., 1998; Fujii et al., 2003; Hermans et al., 2003; Semmling et al., 2010).



« Tirée de (Speir M, Drugs 2017) »

Figure 11 : Le rôle « helper » des cellules iNKT. Tout comme pour les lymphocytes T CD4⁺, les cellules iNKT peuvent fournir une « aide » aux APC. La présentation de l' α -GalCer via la molécule CD1d par les DC conduit à une régulation positive de CD40L sur les cellules iNKT et à la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN- γ , qui favorisent la maturation des DC. La production d'IL-12 active davantage les cellules iNKT ainsi que les cellules T CD8⁺. L'aide fournie par les cellules iNKT peut améliorer les réponses des lymphocytes T CD8⁺ contre les peptides co-administrés.

La nature de l'aide fournie par les cellules iNKT diffère de l'aide fournie par les lymphocytes T CD4⁺. En effet, en présence de lymphocytes T CD4⁺, les DC vont recruter les LTCD8⁺ exprimant des ligands CCR5 (Castellino et al., 2006). Par contre, les DC activées après contact avec les cellules iNKT vont induire la production de la chimiokine CCL17 qui attire les lymphocytes T CD8⁺ natifs exprimant le récepteur de chimiokines CCR4 (figure 11) (Semmling et al., 2010). De plus, les cellules iNKT peuvent favoriser l'interaction entre les DC XCR1⁺ et les pDC, ce qui est important pour l'induction des lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Shimizu et al., 2013a). L'activité adjuvante des ligands de cellules iNKT peut être combinée avec d'autres adjuvants classiques qui activent les PRR. Il a été montré que l'ajout d'agonistes de TLR *in vitro* améliore fortement la production d'IFN- γ par les splénocytes de souris prétraitées avec l' α -GalCer (Ando et al., 2013). Chez la souris, la prolifération et la fonction effectrice des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène sont significativement améliorées par l'administration du ligand de TLR4 (MPL ou LPS) en combinaison avec l' α -GalCer (Hermans et al., 2007; Ando et al., 2015).

L' α -GalCer favorise également les réponses immunitaires humorales. En effet, en présence d' α -GalCer, des réponses anticorps robustes peuvent être obtenues même dans des animaux dépourvus de CMH II, qui n'ont aucun potentiel pour l'aide classique délivrée par les lymphocytes T CD4⁺ (Galli et al., 2003; Dellabona et al., 2014). Une interaction apparentée entre les cellules iNKT et CD1d sur les lymphocytes B peut favoriser la différenciation des cellules iNKT en cellules NKT (NKT_{FH}) CXCR5⁺ PD-1^{hi} (Chang et al., 2011a). La co-administration d' α -GalCer en conjonction avec une protéine donne lieu à la formation rapide de centre germinatif (GC) et à la production d'anticorps spécifiques de l'antigène administré (Barral et al., 2008; Leadbetter et al., 2008). Cette activation est dépendante des cellules NKT_{FH}, CD40L (Galli et al., 2007) et de l'expression de CD1d sur les cellules B (Lang et al., 2008). Les cellules iNKT peuvent également aider indirectement les cellules B en stimulant l'aide des lymphocytes T conventionnelles. Les DC activées par une interaction avec les cellules iNKT via CD1d ont une capacité accrue à induire des cellules T_{FH} classiques qui, à leur tour, interagissent avec les lymphocytes B (Tonti et al., 2009; Scanlon et al., 2011).

11. Fonctions biologiques des cellules iNKT dans certaines maladies

11.1 Les cellules iNKT dans les maladies infectieuses

Les cellules iNKT jouent un rôle important au cours des infections bactériennes, virales, fongiques et protozoaires (Bendelac et al., 2007). Ces cellules, via leur capacité à produire l'IFN- γ et l'IL-17A, sont importantes chez la souris pour lutter contre l'infection bactérienne par *Streptococcus pneumoniae* (le pneumocoque). Les souris $J\alpha 18^{-/-}$ (dépourvues en cellules iNKT) présentent des charges bactériennes plus élevées dans les poumons et un taux de survie plus faible par rapport aux souris sauvages (WT) (Kawakami et al., 2003; Barthelemy et al., 2017).

Chlamydia muridarum est le modèle murin pour l'infection de *Chlamydia trachomatis*, une infection sexuellement transmissible. Dans ce modèle, le rôle des cellules iNKT est contradictoire. Un rapport suggérant que les cellules iNKT augmentent la croissance de cet organisme en induisant un milieu cytokinique type Th2 (Joyee et al., 2007). D'autres études suggèrent que les cellules iNKT favorisent la clairance des bactéries, mais aussi la pathologie (Jiang et al., 2012).

Les cellules iNKT sont également importantes dans les infections par *Borrelia burgdorferi* (Olson et al., 2009; Lee et al., 2010), les infections fongiques par *Cryptococcus neoformans* (Kawakami et al., 2001; Cohen et al., 2011), les infections par les parasites protozoaires tels que *Leishmania major*, *L. donovani* et *Trypanosome cruzi* (Ishikawa et al., 2000; Amprey et al., 2004; Duthie et al., 2005). Les cellules NKT jouent également un rôle important dans la réponse immunitaire au cours d'une helminthiase : la schistosomiase. Les iNKT et vNKT ont des effets opposés, et peut-être complémentaires, sur la balance Th1/Th2 au cours de cette maladie parasitaire chronique (Mallevaey et al., 2007).

Il a été démontré que les cellules iNKT ont un rôle bénéfique contre les infections virales, en particulier les virus de la famille de l'herpès, tels que le cytomégalo virus murin (MCMV), le virus herpès simplex type 1 (HSV-1) et le virus de l'herpès génital (HSV-2) (Grubor-Bauk et al., 2003). Cependant les mécanismes conduisant à cet effet sont encore peu connus.

Les cellules iNKT pourraient jouer un rôle précoce et critique dans la pathogenèse de l'infection virale de la dengue chez l'homme (Matangkasombut et al., 2014; Kamaladasa et al., 2016).

Au cours de l'infection par le virus de la grippe A (IAV), Paget C *et al* ont montré que les cellules iNKT jouent un rôle positif dans le contrôle des dommages épithéliaux du poumon en sécrétant de l'IL-22 (Paget *et al.*, 2012). Le rôle potentiel de ces cellules dans la surinfection bactérienne post-grippale a aussi été étudié. Récemment, Barthelemy *et al* ont trouvé que la diminution de l'activation des cellules iNKT chez les animaux surinfectés était liée à une production massive IL-10, induite par l'IAV plutôt qu'à un défaut fonctionnel intrinsèque. L'IL-10 prévient l'activation des cellules iNKT en réponse aux pneumocoques en inhibant la production de l'IL-12 par les DC. La neutralisation de l'IL-10 restaure l'activation des cellules iNKT et augmente la résistance à l'infection bactérienne secondaire (Barthelemy *et al.*, 2017). Le traitement par l' α -GalCer au cours de la phase précoce (au jour 4) ou pendant la phase de résolution (jour 14) de la grippe est associé à une diminution de la croissance et de la dissémination du pneumocoque (Barthelemy *et al.*, 2016). L'exploitation de l'activité antibactérienne des cellules iNKT pourrait donc être exploitée dans le cas du pneumocoque (Ivanov *et al.*, 2014).

Chez l'homme, il semble que les cellules iNKT jouent aussi un rôle important dans les infections virales (Levy *et al.*, 2003; Banovic *et al.*, 2011). Les patients atteints du syndrome lymphoprolifératif X (XLP) ont une mutation SAP. Ces patients ne possèdent pas de cellules iNKT et meurent d'infection incontrôlée par le virus Epstein-Barr (EBV) (Nichols *et al.*, 2005; Pasquier *et al.*, 2005). De plus, le nombre de cellules iNKT est réduit et leurs fonctions altérées chez les patients présentant une infection active par *Mycobacterium tuberculosis* (Kee *et al.*, 2012).

11.2 Les cellules iNKT dans les maladies allergiques

L'asthme allergique est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes associée à une réponse Th2 prédominante. L'asthme est associé à une éosinophilie, à une augmentation de la production de mucus dans le poumon, une hyperréactivité des voies aériennes et une synthèse d'IgE spécifique (Wills-Karp, 1999; Umetsu *et al.*, 2002). La production de cytokines Th2, telles que l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-5, est importante dans le recrutement des éosinophiles dans les voies respiratoires et pour l'hyperréactivité des voies aériennes (AHR), qui sont caractéristiques de l'asthme.

Les souris déficientes en cellules iNKT (souris CD1d^{-/-} ou α 18^{-/-}), montrent une inflammation réduite des voies respiratoires dans un modèle d'asthme allergique chez la souris (Lisbonne *et al.*, 2003; Akbari *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2004). Sur la base d'expériences de transfert adoptif, il semble que la production d'IL-4 et d'IL-13

par les cellules iNKT soit essentielle dans la mise en place de la maladie (Akbari et al., 2003).

Il est intéressant de noter que les souris infectées par le virus de Sendai développent une maladie pulmonaire chronique et une hypersensibilité des voies aériennes similaire à l'asthme et à la maladie pulmonaire obstructive chronique (COPD) chez l'homme. Cette manifestation chronique dépend de l'IL-13 produite par les macrophages et les cellules iNKT. La déplétion des macrophages et des cellules iNKT réduit la pathologie. Ces données suggèrent que les cellules iNKT participent à la pathogenèse aux maladies pulmonaires inflammatoires chroniques (Kim, E.Y, Nat. Med. 2008).

11.3 Les cellules iNKT dans les maladies auto-immunes

Plusieurs maladies auto-immunes ont été associées à un faible taux de cellules iNKT telles que la sclérose en plaques (MS), le lupus érythémateux systémique (SLE), la polyarthrite rhumatoïde (RA), le diabète de type 1 (T1D), la maladie de Crohn (CD) « une maladie inflammatoire chronique intestinale » et d'autres maladies (van der Vliet et al., 2001; Novak and Lehen, 2011; Simoni et al., 2013). Le T1D est une maladie auto-immune chronique dans laquelle les cellules β pancréatiques sécrétrices d'insuline sont détruites sélectivement. C'est une maladie à médiation Th1 qui fait intervenir les cellules T CD8⁺ et les macrophages. Le nombre de cellules iNKT est réduit chez les souris jeunes diabétiques non obèses (NOD), et l'augmentation de leur nombre par transfert adoptif ou via l'introduction d'un transgène V α 14-J α 18 inhibe le développement du T1D (Lehuen et al., 1998; Hammond et al., 1998). En outre, la déficience en CD1d exacerbe le diabète chez les souris NOD (Shi et al., 2001). Des rapports suggèrent que la protection des cellules iNKT est associée à l'induction d'une réponse Th2 aux auto-antigènes des îlots (Laloux et al., 2001; Forestier et al., 2007; Hong et al., 2001). Une étude chez les patients diabétiques montre que les cellules iNKT des ganglions pancréatiques présentent une production défectueuse d'IL-4 (Kent et al., 2005).

Dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de la sclérose en plaques chez l'homme, les cellules iNKT infiltrent le système nerveux central (SNC). Il a été montré que les souris dépourvues de cellules iNKT développent une EAE plus sévère que les souris témoins (Oh and Chung, 2011). L'augmentation du nombre de cellules iNKT protège les souris contre l'EAE en inhibant les réponses Th1 et Th17 auto-immunes (Mars et al., 2002, 2008).

Récemment, un autre groupe a montré que les cellules iNKT, produisant l'IL-4 ou l'IL-10, inhibent les réponses Th1 et réduisent la sévérité de l'EAE (Oh and Chung, 2011). Dans le sang des patients atteints de la sclérose en plaques, la fréquence totale des cellules iNKT est diminuée (van der Vliet et al., 2001; Araki et al., 2003). En rémission, les cellules iNKT CD4⁺ sécrètent de grandes quantités d'IL-4 qui pourraient favoriser un biais Th2, suggérant un rôle bénéfique de cette sous-population (Araki et al., 2003).

11.4 Les cellules iNKT et l'immunité antitumorale :

L'importance des cellules iNKT dans la protection contre les tumeurs est soulignée par plusieurs constatations. Tout d'abord, un certain nombre d'études indépendantes ont montré une diminution du nombre de cellules iNKT dans le sang périphérique de patients atteints d'une variété de cancers (Tahir et al., 2001; Yoneda et al., 2005). De plus, les cellules iNKT qui persistent semblent avoir une activité proliférative et fonctionnelle amoindrie (Yanagisawa et al., 2002; Dhodapkar et al., 2003). D'une façon intéressante, une augmentation de la fréquence des cellules iNKT du sang périphérique chez les patients cancéreux suscite une réponse plus favorable à la radiothérapie (Schneiders et al., 2012).

Chez les souris qui sont sujettes au développement de tumeurs en raison de la perte du gène suppresseur de tumeur (p53^{-/-}), l'absence de cellules iNKT (souris p53^{-/-} Jα18^{-/-} ou p53^{-/-} CD1d^{-/-}) entraîne un développement plus précoce et plus fréquent des tumeurs et donc une survie plus courte comparativement aux souris p53^{-/-} (Swann et al., 2009). De même, le traitement des souris Cd1d^{-/-} et Jα18^{-/-} avec un cancérigène entraîne une augmentation de l'incidence et une apparition plus précoce des tumeurs par rapport aux souris sauvages traitées (Smyth et al., 2000). Inversement, l'administration d'α-GalCer aux souris contrôle la croissance et la métastase des tumeurs adoptivement transférées (Nakagawa et al., 1998a, 1998b) ou des tumeurs induites par des cancérigènes (Hayakawa et al., 2003; Crowe et al., 2002) ou des tumeurs spontanées (Bellone et al., 2010). De plus, le transfert adoptif de cellules iNKT dans des souris Jα18^{-/-} prévient la croissance de sarcomes sous-cutanés (Crowe et al., 2002). Le transfert adoptif de cellules iNKT purifiées dans des souris NOD-Scid-IL2rγ^{-/-} (NSG) déficientes en lymphocytes est suffisante pour protéger les souris contre une tumeur CD1d⁺ (Bassiri et al., 2014). Ces travaux montrent que les cellules iNKT jouent un rôle central et non redondant dans la réponse aux tumeurs.

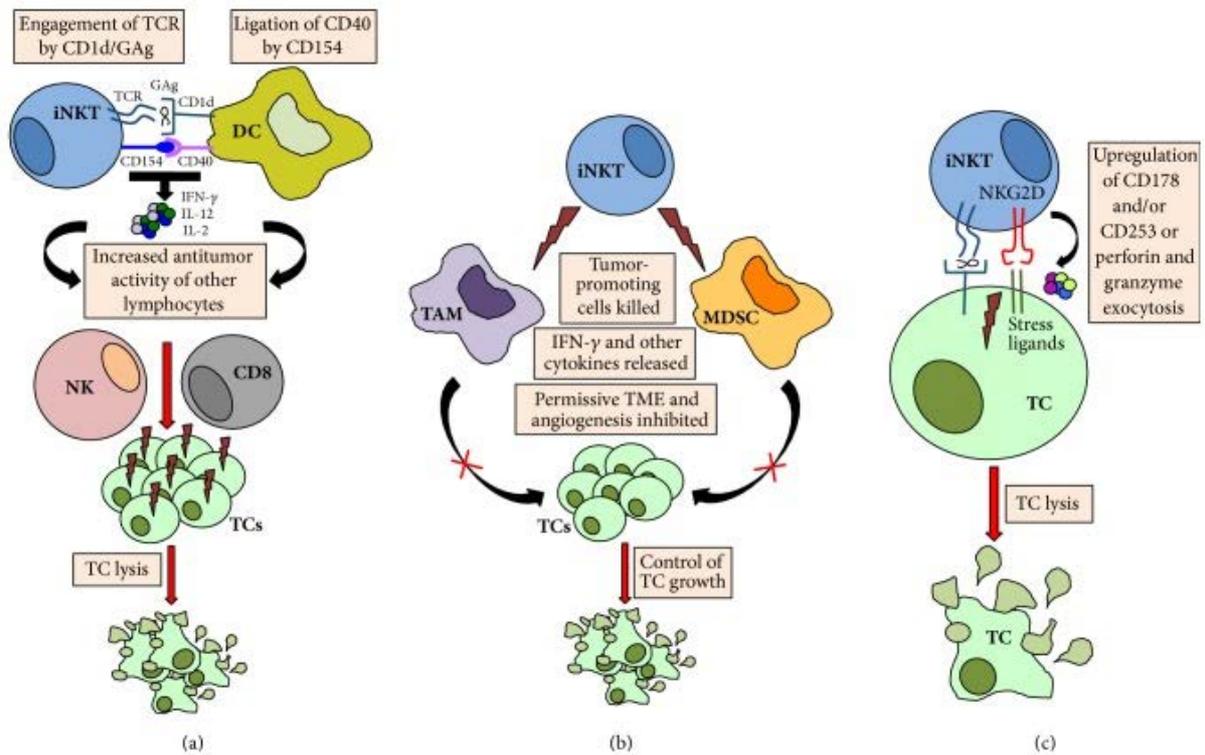
11.4.1 Les mécanismes par lesquels les cellules iNKT exercent ces effets antitumoraux.

A. Modulation indirecte des réponses antitumorales par les cytokines

Suite à l'administration de l' α -GalCer, les cellules iNKT s'activent rapidement et produisent de grandes quantités de cytokines immunomodulatrices telles que l'IFN- γ . Comme discuté avant, les cellules iNKT activées conduisent à la maturation des DC et à la transactivation de nombreuses cellules de système immunitaire qui ont une activité anti tumorale, notamment les NK et les lymphocytes T CD8⁺ (figure 12(a)).

Les DC matures sont de puissants producteurs d'IL-12, ce qui induit la production soutenue d'IFN- γ par les cellules iNKT et les cellules NK (Takeda et al., 1996; Hayakawa et al., 2001). L'importance des cellules iNKT dans le rejet de tumeurs médié par l'IL-12 a été montré grâce à l'utilisation de souris $J\alpha 18^{-/-}$ (Kawano et al., 1997). Les DC matures sont également importantes dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺, ce qui aboutit à la genèse de cellules effectrices et mémoires (Fujii et al., 2003; Stober et al., 2003).

La combinaison de cytokines (par exemple, IL-2, IL-12 et IFN- γ) résultant de l'activation des cellules iNKT conduit également à une régulation positive des ligands induisant la mort (par exemple CD178 ou CD253) sur les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ (Medvedev et al., 1997; Smyth et al., 2001).



« Tirée de (Altman JB *et al*, *J Immunol Res.* 2015) »

Figure 12: Mécanismes possibles de réponses antitumorales à médiation cellulaire par iNKT. (a) Cytotoxicité indirecte. Les cellules iNKT et les DC se co-activent réciproquement par les interactions TCR/CD1d/GAg et CD40/CD154, aboutissant à la libération de plusieurs cytokines qui activent et favorisent secondairement la cytotoxicité antitumorale d'autres lymphocytes effecteurs. (b) Modulation du TME. Les cellules iNKT tuent les TAM et les MDSC, et limitent également l'angiogenèse, pour contrôler indirectement la croissance tumorale. (c) cytotoxicité directe. Les cellules iNKT provoquent la lyse des cibles tumorales par l'engagement de TCR ou de NKG2D. DC: cellule dendritique; GAg: antigène glycolipidique; TC: cellule tumorale; TAM: macrophage associé à une tumeur; MDSC: cellule suppressive dérivée de myéloïde; TME: microenvironnement des tumeurs.

B. Contrôle indirect de la croissance tumorale via l'altération du microenvironnement tumoral (TME)

Il est important de noter que les cellules iNKT peuvent cibler les macrophages associés aux tumeurs (TAM), qui sont connus pour produire l'IL-6, une cytokine qui semble favoriser la prolifération de nombreuses tumeurs solides, y compris les

neuroblastomes et les carcinomes du sein et de la prostate (Song et al., 2009). Les TAMs présentent de manière croisée un ou plusieurs ligands CD1d endogènes (neuroblastomes). Suite à ce processus, les TAMs peuvent être spécifiquement reconnus et tués par les cellules iNKT (figure 12 (b)) (Song et al., 2009). D'autres cibles potentielles de cellules iNKT dans le TME comprennent des cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes (MDSCs). On a constaté que les MDSC s'accumulent dans le sang, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse ainsi que dans les sites tumoraux chez la plupart des patients et chez les animaux porteurs de tumeurs. Ces cellules inhibent à la fois l'immunité innée et adaptative (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009). Il a été rapporté que les cellules iNKT jouent un rôle clé pour « convertir » les MDSC en APC, ce qui permet l'activation des fonctions effectrices des lymphocytes T (Ko et al., 2009; Lee et al., 2012).

C. Cytotoxicité Antitumorale Directe

En plus de leur contrôle indirect sur la croissance tumorale, les cellules iNKT peuvent directement reconnaître et éliminer les cellules tumorales (Figure 12 (c)). Les cellules iNKT seules, ou en combinaison avec des cellules NK, peuvent tuer une variété de cibles tumorales *in vitro* (Kawano et al., 1997; Kawamura et al., 1998; Matsumoto et al., 2000). Bien que ce mécanisme de destruction semble dépendre de la présence de glycolipides stimulants et de la molécule CD1d (Metelitsa et al., 2003; Wingender et al., 2010), la cytotoxicité des cellules iNKT semble également être déclenchée par l'interaction de NKG2D avec des ligands de stress exprimés par la cible (Kuylenstierna et al., 2011).

Conformément à leur capacité cytotoxique directe, les cellules iNKT expriment la perforine et les granzymes, ainsi que le CD178 (FasL) (Wingender et al., 2010). Les cellules iNKT seules sont suffisantes pour contrôler la croissance d'un lymphome T *in vivo*, un phénomène qui dépend de la perforine et de la protéine adaptatrice SAP (Bassiri et al., 2014; Das et al., 2013).

11.4.2 Suppression de l'activation des cellules iNKT

Trois types cellulaires peuvent interférer avec l'activité anti-tumorale des cellules iNKT: les lymphocytes T régulateurs (Treg), les MDSC et les cellules vNKT.

Les lymphocytes T régulateurs peuvent supprimer l'effet anti-tumoral des cellules iNKT par un mécanisme dépendant du contact et de la production d'IL-10 (Venken et al., 2013). Ainsi, les cellules Treg suppriment l'effet protecteur du transfert adoptif de cellules iNKT dans des souris $J\alpha 18^{-/-}$ (Nishikawa et al., 2003). En accord avec ces résultats, l'appauvrissement des cellules Treg ou l'élimination à court terme de leur activité suppressive résulte en une augmentation des réponses antitumorales des cellules iNKT avec une augmentation de l'activation des lymphocytes T CD8 et NK et de la production de l'IFN- γ (Matarollo et al., 2013).

Yanagisawa *et al* ont découvert que les réponses antitumorales des cellules iNKT activées par l' α -GalCer sont supprimées par la production d'oxyde nitrique par les MDSCs. L'administration d'un acide rétinoïque aux souris porteuses de cancer réduit la population de cellules CD11b⁺ Gr-1⁺ et rétablit efficacement la protection induite par l' α -GalCer (Yanagisawa et al., 2006).

De plus, il a été démontré que les TAM producteurs de CCL20 peuvent agir comme un piège hypoxique pour les cellules iNKT infiltrant les tumeurs, ce qui entraîne un dysfonctionnement de ces dernières (Liu et al., 2012).

Les cellules NKT de type II peuvent être suppressives dans le contexte de l'immunité antitumorale. La suppression tumorale induite par les cellules vNKT peut être médiée par la sécrétion d'IL-13, ce qui entraîne l'activation de MDSC sécrétant le TGF- β qui inhibent les cellules T CD8⁺ spécifiques de tumeur ou les cellules NKT de type I (Ambrosino et al., 2008; Marrero et al., 2015; Terabe et al., 2005). Chez l'homme, Chang *et al*, ont également montré une augmentation des cellules NKT de type II sécrétant l'IL-13 chez des patients atteints de myélome multiple (Chang et al., 2008). Collectivement, ces études démontrent l'importance des Tregs, MDSC et des cellules NKT de type II présents dans l'environnement tumoral sur le contrôle de la fonction des cellules iNKT. La compréhension des processus impliqués dans ces phénomènes pourrait permettre de manipuler plus efficacement les cellules iNKT dans la cadre de stratégies immuno-thérapeutiques.

11.4.3 Immunothérapie basée sur les cellules iNKT

11.4.3.1- L'immunothérapie du cancer

L'immunothérapie anti-tumorale est définie comme une forme de thérapie biologique qui utilise des substances pour activer ou inhiber le système immunitaire et pour aider l'organisme à éradiquer les cellules tumorales. Il existe deux types d'immunothérapies: l'immunothérapie active et l'immunothérapie passive où les deux approches peuvent être non spécifiques ou spécifiques. L'immunothérapie non spécifique induit une réponse immunitaire générale tandis que l'immunothérapie spécifique induit une réponse immunitaire particulière à un antigène spécifique. L'immunothérapie active utilise des vaccins et la thérapie cellulaire. De plus, l'immunothérapie active possède une mémoire immunologique.

En revanche, l'immunothérapie passive n'a pas de mémoire immunologique. Il existe un effet anti-tumoral temporaire et le traitement chronique peut être nécessaire. Dans ce type de thérapie, la réponse immunitaire de l'hôte est initiée par l'administration d'anticorps ou d'autres composants immunitaires tels que des « checkpoint inhibitors » et des cytokines.

L'immunothérapie combinée (passive et active) a le potentiel d'activer plusieurs composants cellulaires du système immunitaire qui peuvent provoquer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

A- Immunostimulants

L'utilisation d'immunostimulants pour le traitement du cancer est l'une des premières approches en immunothérapie non spécifique. Les cytokines les plus importantes pour la thérapie contre le cancer, l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron alpha (IFN- α) ont démontré leurs propriétés anticancéreuses et ont été approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de divers types de cancers, y compris le mélanome métastatique et le carcinome des cellules rénales (Kirkwood et al., 2008) . Les inconvénients de cette immunothérapie sont son coût élevé et ses effets indésirables sévères mais réversibles.

B- Anticorps monoclonaux (mAb)

Les mécanismes d'actions des mAbs peuvent être multiples. Ceux-ci incluent une toxicité directe soit sous la forme d'une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) ou une cytotoxicité dépendante du complément (CDC) (Rituximab). Des mAbs peuvent être dirigés contre des cellules immunitaires

effectives et améliorer leur activité (Blinicyto et Ipilimumab), ou encore ralentir la croissance tumorale (trastuzumab et Ramucirumab) ou délivrer des isotopes radioactifs (Zevalin®), des toxines (Mylotarg® et Ontak®) ou des médicaments chimiothérapeutiques (Adcetris®) aux cellules tumorales (Bisht et al., 2010).

C- Immunomodulateurs

Ils sont également appelés «immune-checkpoints». Les tumeurs induisent une tolérance des cellules T spécifiques de la tumeur en induisant l'expression de ligands inhibiteurs qui bloquent les fonctions des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral (Drake et al., 2006; Mellman et al., 2011). L'Ipilimumab, un anticorps anti-CTLA-4, a été approuvé par la FDA en 2011 comme un traitement de première ligne pour les patients atteints de mélanome. Des essais de phase III ont montré une prolongation de la survie globale des patients (Hodi et al., 2010; Robert et al., 2011; Sharma and Allison, 2015). Les anticorps dirigés contre PD1 ou PD-L1 ont atteint les phases cliniques et incluent le pembrolizumab et le nivolumab (Chen and Mellman, 2013).

La combinaison des mAbs anti-CTLA-4 et anti-PD1 a démontré un effet synergique. Un essai clinique de phase I et II avec l'ipilimumab (anti-CTLA-4) combiné avec le nivolumab (anti-PD1) a rapporté une régression tumorale chez 50-61% des patients traités avec un mélanome avancé (Wolchok et al., 2013).

D- Thérapie à base de lymphocytes T transférés de manière adoptive (ACT)

L'ACT (Adoptive cell therapy) est une immunothérapie nouvelle et prometteuse particulièrement efficace contre le mélanome métastatique (Rosenberg and Dudley, 2009). Dans l'ACT, les lymphocytes T d'un patient qui ont une activité antitumorale, sont isolés et, après expansion *ex vivo*, sont ré-infusés chez le même patient. Avec cette technique, de grandes quantités de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) peuvent être manipulés afin d'augmenter l'efficacité des cellules transférées. La déplétion lymphatique a montré une amélioration de la fonctionnalité des TIL non seulement en éliminant les cellules immunosuppressives, comme le Treg et les MDSCs dans le microenvironnement de la tumeur, mais aussi en augmentant les taux de cytokines IL-7 et IL-15 (Gattinoni et al., 2005; Klebanoff et al., 2004). Dans le même but, des facteurs de croissance, tels que l'IL-2, peuvent également être infusés avec les cellules transférées (Rosenberg et al., 2011).

E- Vaccins du cancer

Les vaccins contre le cancer créent probablement l'une des classes les plus diverses dans les approches immunothérapeutiques et sont classés dans la catégorie «immunothérapie active» :

E-1-Vaccins à base de peptides ou de protéines

Ce type de vaccins utilise une protéine entière ou un peptide court dérivé(e) des cellules tumorales. Une étude récente, où Gp100 a été co-administré avec l'immunostimulant IL-2, a montré une réponse immunitaire anticancéreuse avec un taux de survie prolongé chez les patients atteints de mélanome avancé ([Schwartzentruber et al., 2011](#)). Étant donné que les TAA (tumor-associated antigen) sont de nature peu immunogène, un adjuvant immunostimulant est essentiel pour générer une réponse immunitaire efficace. La FDA a approuvé le vaccin Cervarix formulé avec du MPL (monophosphoryl lipide A) et du sel d'aluminium comme vaccin prophylactique contre le papillomavirus humain ([Schiffman and Wacholder, 2012](#)). En effet, plusieurs vaccins peptidiques/protéiques combinés avec des agonistes de TLR sont testés dans des essais cliniques; Il s'agit notamment de l'Ampligen ou de l'Histonol ciblant TLR3, MELITAC 12.1 ciblant TLR4 ou encore le Resiquimod ciblant TLR9 ([Guo et al., 2013](#)).

E-2-Vaccins à base des cellules tumorales entières autologues ou allogéniques

Ces vaccins sont préparés à partir de cellules tumorales autologues ou de lignées de cellules tumorales allogéniques. Même si l'utilisation de cellules tumorales autologues élimine le problème de sélection de l'antigène en offrant l'avantage de cibler les antigènes associés à la tumeur de l'individu, cette approche a été abandonnée en raison de la grande complexité de la préparation du vaccin pour chaque patient ([Mellman et al., 2011](#)). L'utilisation de cellules tumorales allogéniques a été favorisée en raison de sa capacité à introduire de multiples antigènes et donc à stimuler une meilleure réponse immunitaire. Un exemple de cette classe de vaccins contre le cancer s'appelle GVAX qui utilise des lignées cellulaires allogéniques du cancer de la prostate (VITAL-1 et VITAL-2) qui sont manipulées pour sécréter le GM-CSF ([Higano et al., 2008](#)). Malgré son succès dans les essais cliniques de phase I et II, l'application de GVAX a pris fin dans les essais cliniques de phase III contre le cancer de la prostate en raison du taux accru de décès ([Drake, 2009](#)).

E-3-Vaccins à base de cellules dendritiques

L'un des vaccins à base de DC s'appelle DCVAX-Prostate. Ce vaccin a été préparé en incubant des DC de patient avec un antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) avant d'être infusé chez le même patient. Les essais cliniques de phase I et II avec DCVAX-prostate, chez les patients atteints de cancer de la prostate se sont révélés efficaces et le vaccin a induit une réponse immunitaire anticancéreuse ([Fishman, 2009](#)).

Le Sipuleucel-T (Provenge TM) a été approuvé par la FDA en 2010 pour le traitement du cancer de la prostate (mCRPC) ([Longo, 2010](#)). Ce vaccin autologue a été fabriqué à partir d'APC provenant de PBMC de patient, incubés avec le PA2024 qui contient de la phosphatase acide prostatique (PAP, un antigène prostatique) fusionné au GM-CSF. Les études cliniques de phase III de Sipuleucel-T ont réussi à fournir une augmentation significative des taux de survie qui ont mené à l'approbation de la FDA ([Kantoff et al., 2010](#)).

E-4-Vaccin à base de nanoparticules

Les vaccins à base de nanoparticules (NPs) sont très prometteurs dans l'immunothérapie anticancéreuse. Ces nanosystèmes peuvent contenir l'antigène et l'adjuvant et aussi des ligands ou anticorps permettant un ciblage spécifique. L'antigène peut être une protéine, un peptide ou un morceau d'ADN codant pour l'antigène tumoral. Les ligands de ciblage, tels que les anticorps spécifiques de DC (anticorps anti-lectine DEC-205) ou des ligands de TLRs, peuvent être conjugués avec des NP. Cette approche a au moins deux avantages : le ciblage cellulaire et une entrée des NPs (et donc de l'antigène) dans la cellule via un processus d'endocytose, ce qui influence le « processing » de l'antigène ([Elamanchili et al., 2007](#); [Kwon et al., 2005](#)). Plusieurs types de matériaux tels que des émulsions multiples, des liposomes et des NP polymériques (telles les PLGA) sont actuellement étudiés. Pour les applications cliniques et biologiques, les NP sont particulièrement attrayantes en raison de leur faible toxicité, leur faible immunogénicité et leur biocompatibilité ([Park et al., 2013](#)). Par contre, afin d'augmenter leur efficacité dans le traitement des cancers notamment non-hépatiques, il est primordial d'utiliser des NP ayant un caractère furtif. En effet, il est important que les NP, après injection, ne soient pas directement prises en charge par les macrophages (notamment hépatiques) ; processus qui les empêcherait d'atteindre leur cible. Rendre une NP furtive est possible en pégylant les NP. Leur temps de résidence dans la circulation sanguine est ainsi largement

amélioré. Cette propriété permet aux NP de pouvoir plus facilement traverser d'autres types d'endothélium vasculaire comme ceux présents dans les tissus tumoraux. La structure particulière de l'endothélium vasculaire intratumoral permet une accumulation sélective (et passive) des NP dans les tumeurs (effet EPR, Enhanced permeability and retention) (Tran et al., 2015). Les NP de dernière génération permettent en plus de pouvoir cibler un type cellulaire en particulier. Le ciblage des DC, véritable sentinelle du système immunitaire, par les NP présente plusieurs avantages, notamment la capacité des NP à délivrer de grandes quantités d'antigènes associés aux tumeurs et à les délivrer de façon continue. Ceci permet une prise en charge soutenue de l'Ag par les DC et améliore la réponse immune. Les mêmes antigènes sous forme solubles seraient rapidement éliminés de la circulation. Les NP sont diverses et varient dans leur forme, leur taille, leur charge de surface, leur l'hydrophobie ou hydrophilie (Bachmann and Jennings, 2010). Un essai clinique de phase I, d'un vaccin à base de liposomes a été lancé dans le cadre du cancer du sein, des ovaires ou encore de la prostate. Il a été montré que ce vaccin, destiné à induire des réponses T fonctionnelles et efficaces, était sûr et immunogène (Berinstein et al., 2012). Les NP polymères sont également utilisés et généralement très stables. En fait, les PLGA sont utilisées depuis des décennies chez l'homme. C'est le polymère le plus étudié pour la formulation de vaccins et il a été démontré qu'il augmentait les réponses adaptatives spécifique de l'Ag (Chen et al., 2014; Johansen et al., 2000; Shen et al., 2006). D'autres types de NP ont été développées et s'avèrent également efficaces. C'est le cas par exemple de MelQbG10 qui est une NP de type viral chargée de (CpG-ODN) et couplée au peptide Melan-A/MART-1₁₆₋₃₅. Une étude de phase I/II chez les patients atteints de mélanome de stade II-IV a montré que le vaccin était bien toléré et que 14/22 patients ont généré des réponses des cellules T fonctionnelles capables de dégranuler et de produire l'IFN- γ , TNF- α et IL-2 (Speiser et al., 2010).

11.4.3.2- l'immunothérapie du cancer et les cellules iNKT

Les cellules iNKT ont fait l'objet d'une grande attention dans l'immunothérapie en raison de leur rôle de pont entre le système immunitaire inné et adaptatif. Après activation, les cellules iNKT produisent rapidement des cytokines et peuvent également servir de médiateur à la cytotoxicité directe. En raison de leurs puissantes fonctions effectrices, de nombreux travaux ont étudié la façon de moduler efficacement ces cellules dans le contexte du cancer, de l'infection et de la transplantation. Les agonistes (α -GalCer,...) des cellules iNKT ont été utilisés

comme adjuvants vaccinaux pour améliorer les réponses des lymphocytes T et B spécifiques de l'antigène.

A. Essais précliniques

Les études du rôle antitumoral de cellules iNKT chez la souris comprennent l'administration d' α -GalCer libre en présence (ou pas) d'Ag, de DC ou de cellules tumorales chargées avec de l' α -GalCer, ou encore des composants (microorganismes, particules ou vaccins conjugués) pour co-délivrer l' α -GalCer et l'Ag dans la même APC.

A.1 Co-administration d' α -GalCer avec un antigène

La co-administration d' α -GalCer avec des antigènes solubles (comme l'OVA) améliore significativement les réponses des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques de l'OVA chez la souris (Fujii et al., 2003; Hermans et al., 2003; Singh et al., 2014b). L'inconvénient de cette approche est que la co-administration n'assure pas nécessairement la prise en charge de l'antigène et de l'adjuvant par la même APC, en particulier si les différents composants du vaccin ont des pharmacocinétiques différentes.

La présentation d'une partie de l' α -GalCer par les APC non professionnelles peut limiter les réponses immunitaires et provoquer l'anergie des cellules iNKT. Pour exploiter pleinement l'aide des cellules iNKT et induire des T CD8⁺ robustes, il est essentiel que le ligand iNKT et le peptide antigénique soient ciblés sur la même APC professionnelle (Semmling et al., 2010).

A.2 DC chargées par l' α -GalCer

L'administration de DC chargées *ex vivo* avec l' α -GalCer favorise une production prolongée d'IFN- γ et empêche l'anergie des cellules iNKT, ce qui a pour résultat des effets anti-tumoraux plus puissants (une plus grande résistance aux métastases du mélanome B16 (Fujii et al., 2002; Toura et al., 1999) ou contre le cancer pancréatique murin (Nagaraj et al., 2006).

Une approche plus récente a consisté à générer des APC artificielles, telles que des cellules humaines de rein embryonnaires transfectées par CD1d, chargées par l' α -GalCer, et transfectées avec de l'ARN messager (ARNm) codant pour l'antigène cible (Mart-1) (Shimizu et al., 2013b). Lorsqu'elles sont administrées aux souris, ces cellules activent les cellules iNKT et activent les lymphocytes T spécifiques de l'antigène.

Il a été démontré que l'injection de DC dérivées de la moelle osseuse (BM-DCs) CD1d^{-/-} chargées d' α -GalCer entraîne une puissante activation des cellules iNKT. Ce résultat suggère que l' α -GalCer est transféré vers des DC CD1d⁺ résidentes (Petersen et al., 2011). En plus, la réponse de lymphocytes T CD8⁺ spécifique induite en réponse à l'administration intraveineuse de BM-DC chargées par un Ag, a été supprimée chez des souris déplétées sélectivement de DC CD8 α ⁺ langerine⁺ résidentes. Ce résultat suggère que l'antigène est transféré des cellules injectées vers des APC résidentes. Ces travaux indiquent que les vaccins basés sur l'administration de DCs peuvent fonctionner comme un véhicule et transférer leurs Ag et adjuvant aux APCs endogènes (Petersen et al., 2011).

A.3 Anticorps ciblant le complexe CD1d/ α -GalCer aux tumeurs

Une autre approche prometteuse a été développée en utilisant des anticorps spécifiques d'antigènes exprimés par les cellules cancéreuses, en association avec le complexe CD1d/ α -GalCer. Les études à ce jour ont utilisé les fragments variables d'anticorps reconnaissant les antigènes associés aux tumeurs (Tumor Associated Antigen, TAA) humaines, en particulier l'HER-2 et l'antigène carcino-embryonnaire, qui sont exprimés à la surface de plusieurs types de cancers, y compris certains cancers du sein, du poumon et du côlon. Des analyses *in vitro* ont montré que ces fragments variables d'anticorps spécifiques de tumeur, fusionnés avec CD1d peuvent cibler efficacement les cellules tumorales, permettant ainsi leur reconnaissance directe par les cellules iNKT. Ce processus conduit à la lyse des cellules tumorales. Des études *in vivo* chez des souris porteuses de tumeurs ont démontré que cette approche conduit à la mise en place de divers mécanismes immunitaires antitumoraux. Ceux-ci, orchestrés par la stimulation directe des cellules iNKT, comprennent l'activation des cellules NK, la libération de cytokines Th1 et l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques des antigènes tumoraux (Stirnemann et al., 2008; Corgnac et al., 2013, 2014).

A.4 Vaccins à base de cellules tumorales entières chargées avec de l' α -GalCer

Pour le traitement du cancer, les vaccins comprenant des cellules tumorales irradiées traitées avec de l' α -GalCer provoquent une immunité protectrice plus forte que les cellules tumorales non chargées. Dans ce modèle, les APC résidentes prennent en charge les cellules tumorales chargées en α -GalCer et présentent les TAA et l' α -GalCer. Ce processus se traduit par une immunité antitumorale dépendante des cellules iNKT (rôle adjuvant) et des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺

(Shimizu et al., 2007a). L'avantage de l'utilisation de vaccins tumoraux entiers autologues est qu'ils fournissent une large gamme de TAA. Chez la souris, les vaccins comprenant des cellules tumorales entières chargées avec l' α -GalCer ont conduit à une protection tumorale efficace y compris dans un modèle de myélome (Liu K, J Exp Med.2005), de mélanome (Shimizu et al., 2007a, 2007b), de lymphomes B (Chung et al., 2007; Mattarollo et al., 2012), de leucémies myéloïdes (Mattarollo et al., 2012; Gibbins et al., 2014), de cancer de l'ovaire (Choi et al., 2008) et de cancer du côlon (Dong et al., 2016). Toutes ces tumeurs n'expriment pas le CD1d ce qui souligne le rôle des APC résidentes dans ces réponses protectrices. Les réponses mémoires observées dans ces travaux ont été attribuées à la présentation croisée par les DC (Shimizu et al., 2007a; Chung et al., 2007). Dans un modèle de gliome intracrânien, l'impact thérapeutique de l'administration de cellules de gliome irradiées chargées avec l' α -GalCer est augmenté lorsque les cellules T régulatrices sont déplétées (Hunn et al., 2012).

L'utilisation de cellules tumorales chargées d' α -GalCer est plus compliquée à envisager chez l'homme. La nécessité de prélever des cellules tumorales pour la production de vaccins spécifiques ainsi que les précautions nécessaires pour minimiser le risque d'inoculation de cellules tumorales viables, et la nécessité de disposer d'installations conformes de type GMP (Good Manufacturing Practice) pour fabriquer ce type de vaccin personnalisé limite cette stratégie. De plus, le risque d'induire des réponses auto-immunes existent. Par conséquent, d'autres approches thérapeutiques doivent être mises en place.

A.5 Vaccins synthétiques conjugués activant les cellules iNKT

Étant donné la difficulté à fabriquer des vaccins cellulaires autologues chez l'homme (Hailemichael et al., 2013), d'autres types de stratégies doivent être envisagées. L'administration conjointe de glycolipides activant les cellules iNKT et d'antigènes tumoraux incorporés dans des « systèmes » capables de cibler la même APC est potentiellement intéressante.

Des études récentes ont démontré l'efficacité des vaccins "conjugués". Un antigène est conjugué, via un bras enzymatiquement clivable, à un agoniste glycolipidique de cellule iNKT, tel que l' α -GalCer. En utilisant un bras clivable par la cathepsine B, il été montré que cette construction favorise une réponse immunitaire puissante dépendante des lymphocytes T CD8⁺ et capable d'éradiquer la croissance tumorale chez la souris (mélanome B16 exprimant l'OVA) (Anderson et al., 2014). Il est important de noter que le vaccin conjugué a démontré une activité biologique

supérieure au mélange peptide/glycolipide non conjugué ce qui met en évidence l'importance de cibler l'antigène et le ligand des cellules iNKT au sein de la même APC (Anderson et al., 2014).

A.6 Microorganismes / Nanoparticules

Les systèmes de distribution de nanoparticules, tels que les lipo-particules ou les micro-organismes, offrent une alternative aux vaccins cellulaires. La co-administration d'un TAA (Trp2) avec l' α -GalCer dans les liposomes cationiques améliore la réponse T cytotoxique antitumorale *in vivo* chez la souris (Neumann et al., 2015). La vaccination par des VLP (Virus-like particles) liées à l' α -GalCer active efficacement les cellules iNKT spléniques, génère des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'Ag et favorise le rejet tumoral (McKee et al., 2012). Notre laboratoire a montré pour la première fois que la co-encapsulation de l' α -GalCer et de l'OVA dans des nanoparticules à base de poly (acide lactique-co-glycolique) acide (PLGA) génère de puissantes réponses T CD8⁺ spécifiques de l'antigène tumoral (Macho-Fernandez et al., 2014). Il semble en fait que ce type de construction soit plus puissant que les nanoparticules de PLGA ayant incorporé l'antigène et d'autres types d'adjuvants tels que le R848 et le poly I :C (Dölen et al., 2015). Ce dernier résultat suggère que l'effet adjuvant médié par les cellules iNKT est supérieur à l'effet adjuvant induit, de façon plus classique, par des agonistes TLR.

L'utilisation de micro-organismes en tant que véhicule de délivrance peut apporter un avantage supplémentaire à savoir la délivrance de signaux aux récepteurs de type TLR et de signaux médiés par les cellules iNKT. La vaccination thérapeutique avec un vaccin à base de *Listeria monocytogenes* exprimant un TAA (Mage-b, qui est abondamment exprimée par une variété de carcinomes humains) en association avec l' α -GalCer prévient les métastases hépatiques dans un modèle de cancer du sein métastatique (modèle de 4T1) (Singh et al., 2014a). Ce résultat est associé à une augmentation significative du pourcentage de cellules iNKT actives dans la rate ainsi qu'à une augmentation de la réponse médiée par les lymphocytes T CD8⁺.

Ainsi, des systèmes de délivrance de nanoparticules peuvent être utilisés avec succès pour co-délivrer des peptides antigéniques et des ligands de cellules iNKT aux APC. Les véhicules d'administration à base de micro-organismes peuvent avoir l'avantage supplémentaire d'activer des PRR dans les APC. Les inconvénients de cette dernière approche incluent la possibilité de former des réponses d'anticorps

neutralisants contre le microorganisme ou d'induire des réponses de cellules T CD8⁺ contre des peptides microbiens.

B. Essais cliniques

Trois stratégies différentes visant à exploiter le potentiel anti-tumoral des cellules iNKT ont été développées : l'administration de ligands activant les cellules iNKT (toutes les études humaines décrites jusqu'à présent ont utilisé l' α -GalCer), l'administration d'APC pulsées *in vitro* avec l' α -GalCer et le transfert de cellules iNKT après expansion *ex vivo* et/ou activées. Une combinaison de ces différentes méthodes a aussi été tentée.

B.1 Injection intraveineuse d' α -GalCer

La première étude clinique visant à étudier l'effet anti-tumoral de l' α -GalCer a consisté en l'injection intraveineuse répétée de l' α -GalCer à des doses variables chez des patients atteints de tumeurs solides (Giaccone et al., 2002). Aucune toxicité liée à la dose n'a été observée. Une augmentation du taux de cytokines sériques (TNF- α et GM-CSF) a été observée chez 5 des 24 patients 4-6 h après l'injection d' α -GalCer. Par contre, aucune réponse clinique n'a été observée chez ces patients (Giaccone et al., 2002).

B.2 Transfert adoptif des APC chargées avec l' α -GalCer

Le premier essai de phase I a utilisé l'administration intraveineuse de DC immatures dérivées de monocytes chargées avec l' α -GalCer et qui ont été administrées chez des patients atteints de tumeurs métastatiques (Nieda et al., 2004). Bien que l'activation des cellules iNKT ait augmenté les taux sériques de cytokines, y compris l'IFN- γ et l'IL-12 et la transactivation des cellules T et NK, seulement 2 des 12 patients ont montré une diminution des marqueurs tumoraux sériques, ce qui indique une efficacité minimale de ce traitement (Nieda et al., 2004).

Deux études ultérieures utilisant des DC dérivées de monocytes chargées avec l' α -GalCer ont été publiées. La première, en utilisant des injections hebdomadaires intraveineuses de DC cultivées en présence d'IL-2 chez les patients atteints de cancer du poumon, a démontré une expansion de la fréquence des cellules iNKT et des taux élevés d'IFN γ (Ishikawa et al., 2005). L'IFN- γ a cessé d'être détecté à partir de la deuxième injection. Ce phénomène est probablement lié à l'anergie des cellules iNKT (Ishikawa et al., 2005).

Chang et ses collègues ont rapporté que l'injection de DC matures dérivées de monocytes chargées avec l' α -GalCer induit une élévation de la fréquence des cellules iNKT supérieure à 100 fois, ainsi que des concentrations sériques plus élevées d'IFN- γ et d'IL-12 (Chang et al., 2005). L'activation des cellules iNKT a été observée jusqu'à 6 mois chez certains patients et corrélait avec une augmentation des taux d'IL12p40, d'IP-10 et de MIP-1 β ainsi qu'une augmentation des lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Chang et al., 2005).

Uchida et ses collègues ont modifié le protocole d'administration en injectant les APC de sang périphérique chargées avec l' α -GalCer directement dans la sous-muqueuse nasale de patients atteints de cancer de la tête et du cou (Uchida et al., 2008). Une élévation du nombre de cellules iNKT et l'activation de NK a été observée chez environ la moitié des patients, et une réduction ou une stabilisation de la croissance tumorale a été observée chez 6 des 9 patients (Uchida et al., 2008). Une étude de suivi a démontré que l'administration via la sous-muqueuse nasale était optimale par rapport à l'administration via la sous-muqueuse buccale (Kurosaki et al., 2011). Les auteurs ont également indiqué que l'administration orale induit l'expansion de lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (Kurosaki et al., 2011).

Plus récemment, quatre études supplémentaires ont été publiées dans lesquelles des patients atteints de cancer ont reçu une injection d'APC sensibilisées avec l' α -GalCer soit par voie intraveineuse soit par voie intradermique (Nicol et al., 2011; Nagato et al., 2012; Richter et al., 2013; Motohashi et al., 2009). L'injection intraveineuse d'APC générées en présence de GM-CSF et d'IL-2 et chargées avec l' α -GalCer chez des patients souffrant de cancer du poumon a montré une expansion des cellules iNKT. Le nombre accru de cellules productrices d'IFN- γ dans le sang périphérique est associé à un prolongement de la survie (Motohashi et al., 2009). Une augmentation de la production d'IFN- γ ainsi que l'expansion et l'infiltration de cellules iNKT ont également été observées après l'injection d'APCs pulsées à l' α -GalCer et activées par le cocktail GM-CSF/IL2 (Nagato et al., 2012). Pour les patients atteints de cancers d'origine différente et métastatique, Nicol et ses collègues ont rapporté que l'injection intraveineuse d'APC chargées stimule l'activité antitumorale tant au niveau du site tumoral principal que dans les sites de métastases (Nicol et al., 2011). Plus de la moitié des patients ont montré une stabilisation de la maladie ou une réduction de la masse tumorale (Nicol et al., 2011). Enfin, le traitement de patients atteints de myélome multiple avec des APCs chargées avec l' α -GalCer et le médicament immunomodulateur lénalidomide induit

des effets anti-tumoraux. Ces effets sont associés à une élévation de l'IL-2 dans le sérum et à une activation de lymphocytes innés (Richter et al., 2013; Chang et al., 2006).

B.3. Transfert adoptif de cellules iNKT activées ex vivo

Une stratégie alternative pour compenser la diminution de la fréquence des cellules iNKT observées chez les patients atteints de cancer consiste à expandre *in vitro* les cellules iNKT autologues et à les ré-injecter. Le transfert adoptif de cellules iNKT activées *in vitro* chez des patients atteints d'un cancer du poumon entraîne une expansion *in vivo* des cellules iNKT, une activation en aval des cellules NK et une libération d'IFN- γ (Motohashi et al., 2006). Il est intéressant de noter que le transfert combiné de cellules iNKT et de DC chargées avec l' α -GalCer a été rapporté comme induisant une immunité antitumorale importante chez les patients atteints de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Yamasaki et al., 2011; Kunii et al., 2009). Dans ces études, les patients ont montré une réponse partielle ou une stabilisation de la maladie, et dans certains cas, une régression tumorale (Yamasaki et al., 2011; Kunii et al., 2009). Bien que les réponses dans ces études soient modérées, il faut noter que ce type de stratégie thérapeutique a été réalisé sur des patients atteints de tumeurs malignes avancées et chez qui la chimiothérapie standard, l'irradiation et/ou les traitements chirurgicaux avaient échoué. De plus, la majorité de ces patients avaient des cancers CD1d négatif.

Des études futures sur l'immunothérapie à base de cellules iNKT peuvent tirer parti de deux technologies récentes. Comme mentionné précédemment, de nombreuses tumeurs malignes sont associées à une diminution du nombre et de la capacité proliférative des cellules iNKT du sang périphérique. Afin de contourner la difficulté d'expandre ces cellules rares et potentiellement défectueuses chez les patients, Watarai *et al* ont généré des cellules iPSC (Induced pluripotent stem cells) à partir de cellules iNKT matures chez la souris. Ces iPSC peuvent être différenciées en cellules iNKT *in vitro* en présence de Flt3l et d'IL-7 et sécréter de grandes quantités de cytokines Th1 (IFN- γ). Les cellules iPSC-NKT produites de cette manière induisent des réponses T CD8 spécifiques de l'antigène OVA ce qui limite la croissance des cellules tumorales EL-4 exprimant l'OVA (EG7) chez la souris (Watarai et al., 2010) sans induire la « maladie du greffon contre l'hôte » (GvHD) (Fujii et al., 2013).

Il est cependant peu clair si les iPSC humaines dérivées des cellules iNKT peuvent se différencier en cellules iNKT fonctionnelles *ex vivo*. Les auteurs ont généré des cellules iPSC à partir de cellules iNKT isolées de PBMCs de donneurs sains après expansion *in vitro*. Ces iPSC ont été ensuite différenciés *in vitro* en cellules iNKT par une combinaison de cytokines IL-7/IL-15. Les cellules iNKT obtenues présentent une prolifération et une production d'IFN- γ en réponse à l' α -GalCer. Les iNKT activées induisent la maturation des DC et activent les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK. Ces cellules ont présenté également une cytotoxicité de type NK médiée par NKG2D et DNAM-1(CD226) contre des lignées cellulaires cancéreuses (Kitayama et al., 2016). Les caractéristiques immunologiques uniques des cellules iNKT et leur disponibilité illimitée à partir de cellules souches pluripotentes offrent des perspectives très prometteuses dans le cadre de lutte contre le cancer.

La deuxième stratégie est basée sur l'utilisation des CAR (chimeric antigen receptors). Récemment, un rapport de Heczey *et al* a décrit l'expression par les cellules iNKT de CAR portant une spécificité pour GD2, un glycolipide hautement exprimé sur les cellules de neuroblastome. Dans cette étude, les auteurs montrent que les cellules iNKT dérivées de PBMC de donneurs sains et transduites (à l'aide de rétrovirus) avec des constructions CAR protègent les souris NSG humanisées contre le neuroblastome métastatique et cela sans induire de GvHD (Heczey et al., 2014). Il reste à voir si ces deux technologies peuvent être combinées pour générer des cellules iPSC-NKT fonctionnelles portant des CAR.

Objectifs

Objectifs

Les vaccins antitumoraux font partie de l'arsenal immunothérapeutique pour lutter contre les cancers. Cependant, bien que la combinaison avec d'autres types de traitement (par exemple les anti-check points) semble prometteuse, leur efficacité en clinique reste limitée.

La découverte des cellules iNKT et de l' α -GalCer a suscité un grand intérêt dans le domaine du cancer. Bien que les résultats pré-cliniques soient prometteurs, la translation chez l'homme reste assez décevante (Carreño et al., 2016). Ce résultat pourrait s'expliquer par la diminution du nombre et de la fonction des cellules iNKT chez les patients, un marqueur de mauvais pronostic clinique en général (Najera Chuc et al., 2012; Molling et al., 2007). Par conséquent, les stratégies d'intervention thérapeutique visant à restaurer le nombre et la fonction cellules iNKT seraient une bonne option.

Les stratégies traditionnelles de vaccination sont basées sur l'induction de réponses CTL efficaces pour éliminer les cellules tumorales. De nombreux facteurs influence la qualité de la réponse CTL, y compris la nature de la sous-population de DC, la durée de la présentation de l'antigène et les signaux de costimulation délivrés par les APC ou, de façon plus générale, par l'environnement. Les DC sont des régulateurs centraux de la réponse immunitaire adaptative et sont nécessaires pour l'induction des réponses immunes contre le cancer, notamment celles médiées par les lymphocytes T. En particulier, les réponses antitumorales dépendent d'une sous-population spécialisée de DC conventionnelles qui excelle dans la présentation croisée des antigènes, ce qui conduit à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques : les DC BDCA3⁺ (chez l'homme) et les DC CD8 α ⁺ (chez la souris).

La maturation des DC est nécessaire pour fournir des signaux costimulateurs aux cellules T. Dans le cas de la vaccination, c'est l'adjuvant qui remplit cette fonction. Le choix de l'adjuvant est critique pour promouvoir, de façon efficace et durable, une réponse immunitaire. Dans le cadre de l'immunothérapie dédiée au traitement du cancer, l'induction de réponses immunitaires médiées notamment (mais pas uniquement) par les lymphocytes T CD8 est recherchée (Kantoff et al., 2010; Jeanbart and Swartz, 2015).

Il a été montré que les cellules iNKT peuvent jouer un rôle de « helper » (même en absence de lymphocytes T CD4 helper) et ainsi déclencher des réponses immunitaires efficaces (Semmling et al., 2010). L'aide fournie par les cellules iNKT

dépend de la présentation des peptides et des glycolipides par la même APC afin d'améliorer les réponses des lymphocytes T CD8 contre les peptides co-présentés.

Le but de mon travail de thèse a visé à optimiser le rôle adjuvant des cellules iNKT dans l'immunothérapie du cancer. Pour cela, notre stratégie a été de co-encapsuler l' α -GalCer et des auto-antigènes tumoraux dans des nanoparticules de PLGA et de cibler de façon active les DCs CD8 α^+ murines ou les DC BDCA3 $^+$ humaines. Pour assurer ce ciblage, les nanoparticules ont été décorées à leur surface par des anticorps anti-Clec9a, dont l'expression est assez spécifique de ces cellules. Nos travaux montrent l'efficacité de cette stratégie et suggèrent que la rupture de la tolérance aux auto-Ag tumoraux peut être rompue en sollicitant l'aide des cellules iNKT.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Souris

Les souris mâles C57Bl/6 (8 semaines) ont été achetées chez Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Les souris transgéniques Rag2/OT-I (enrichies en cellules T CD8⁺ spécifiques du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄) proviennent du laboratoire Charles River (St. Germain sur l'Arbresle, France). Les souris *Cd1d*^{-/-}, *Jα18*^{-/-} (qui ne possèdent pas de cellules iNKT) et *Baft3*^{-/-} (qui ont une proportion fortement réduite de DC CD8α⁺) ont également été utilisées et ont été décrites dans (Mendiratta et al., 1997; Cui et Al., 1997; Hildner et al., 2008). La souris rapporteur IL-10-β-lactamase (souris ITIB) a été décrite dans (Bouabe et al., 2011). Tous les travaux réalisés sur les animaux sont conformes aux règlements de l'Institut Pasteur de Lille sur les directives des soins et l'utilisation des animaux et ont aussi été approuvés par le comité local sur l'expérimentation animale (CEAA75 et 00357.03).

Réactifs et peptides

L'alpha-GalCer a été synthétisé comme décrit précédemment (Macho-Fernandez et al., 2014). L'OVA a été achetée chez InvoGen (Toulouse, France). Le kit de traçage des cellules "vybrant CFDA-SE" provient de chez Invitrogen (Courtaboeuf Cedex, France) et le kit de "PKH26 Red Fluorescent Cell Linker" a été acheté chez Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Toutes les cytokines utilisées dans les tests *in vitro* d'expansion et de différenciation proviennent de chez Peprotech (Neuilly-Sur-Seine, France). Les peptides suivants ont été synthétisés et purifiés par chromatographie liquide haute performance pureté (>95-99%)(GL Biochem, Shanghai, Chine): SIINFEKL, peptide formé des acides aminés (AA) 257-264 de l'OVA; SVYDFVWL, peptide formé des AA 180-188 de l'antigène de mélanome Trp2 murin (tyrosinase related protein-2); KVPRNQDWL, peptide formé des AA 25-33 de la glycoprotéine humaine 100 (gp100) et HSYTTAEELAGIGILTV, peptide formé des AA 18-35 de Melan A humain.

Description des anticorps monoclonaux (mAbs), tétramères et dextramères

Les mAbs murins dirigés contre Siglec-H (conjugué à l'APC), CD11c, NK1.1, PD1, TCR_{Vα2} (conjugués au PE-Cy7), TCRβ, CD8α, CD172α (conjugués au FITC), CD24 (conjugué au PerCp-Cy5.5), IFN-γ et son contrôle isotypique (conjugués à l'Alexa Fluor 647), les molécules du MHC Classe II IA/IE (conjugué au Pacifique Blue),

CD8 α et Clec9a (également appelé DNCR-1) (conjugués au PE) ont tous été achetés chez BD Biosciences (Le Pont de Claix Cedex, France) ou encore Ozyme / Biolegend (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les anticorps utilisés pour analyser les cellules CD45⁺ infiltrant les tumeurs sont: CD3-APC-Cy7, CD8-Alexa Fluor (AF) 700, CD4-Pacific Blue, CD25-FITC, FoxP3-PECy7, perforin-APC et proviennent également de chez Ozyme/Biolegend ou eBiosciences. Les mAbs murins dirigés contre les molécules humaines HLA-DR (conjugué à l'APC-Cy7), CD11c (conjugué à l'AF700), le TCR des iNKT (conjugué au PercpCy5.5 (clone 6B11)) ainsi que le kit "FITC anti-Human Lineage Cocktail" proviennent de chez Ozyme/Biolegend. Les mAbs dirigés contre les molécules humaines CD8 (conjugué au V500), CD3 (conjugué à l'AF700, APC-H7 ou au FITC, V450), CCR7 (conjugué à l'AF647), CD14, CD19, CD20, CD56 (conjugués au V450), IFN- γ (conjugué au FITC), la molécule HLA-DR (conjugué au V421), CD45RA (conjugué au PE-Cy7) et CCR7 (conjugué au FITC) ont été achetés chez BD Biosciences. Les mAbs contre BDCA1 (conjugué à l'APC), CLEC9A (conjugué au PE), BDCA3 (conjugué au FITC ou à l'APC), le TCR des iNKT (conjugué au PE) (clone 6B11) proviennent de chez Miltenyi Biotec (Paris, France). Les dextramères de H-2K^b/Trp₂₁₈₀₋₁₈₈ et A2/Melan A₂₆₋₃₅ (conjugués au PE) ont été achetés chez Immudex (Copenhague, Danemark). Le tétramère de CD1d chargé d' α -GalCer (conjugué au PE) provient de l'Institut national des allergies et des maladies infectieuses (Tetramer Facility, USA). Les analyses en cytométrie de flux ont été effectuées sur un cytomètre de type LSR Fortessa (BD Biosciences) et les données acquises ont été traitées à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star Inc.). Les mAbs anti-Clec9a murin (clone 7H11) et anti-CLEC9A humain (clone 8F9), ainsi que les isotypes contrôles, rat IgG1 (clone HRPN) et souris IgG2a (clone C1.18.4), utilisés pour décorer les nanoparticules, proviennent de chez Miltenyi Biotec (Paris, France) et de chez BioXCell (West Lebanon, NH). L'anticorps neutralisant anti-CD8 β murin (YTS-156.7, IgG2b) a été décrit dans (Kyaw et al., 2013) et l'anticorps anti-CD4 murin (GK1.5, IgG2b) a été donné par le Dr L. Fend (Transgene, Strasbourg). Les contrôles isotypiques de ces 2 anticorps, proviennent de chez BioXCell (West Lebanon, NH).

Préparation et caractérisation des NP de PLGA

Les NP de Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), recouvertes de lipide-polyéthylène glycol et portant les mAbs, ont été générées en utilisant le copolymère de PLGA comme décrit précédemment (Macho-Fernandez et al., 2014; Cruz et al., 2010,

2011; Kitayama et al., 2016). En bref, la protéine OVA (5 mg, dépourvue d'endotoxine) ou les peptides tumoraux (20 mg) ainsi que l' α -GalCer (50 μ g) ont été co-encapsulés dans 100 mg de PLGA. Les anticorps anti-Clec9A/CLEC9A ou leurs contrôles isotypiques ont été attachés à la couche de lipide-polyéthylène glycol (Macho-Fernandez et al., 2014; Cruz et al., 2010, 2011). Les NP de PLGA ont été caractérisées par une diffusion dynamique de la lumière et un potentiel zêta (Macho-Fernandez et al., 2014; Cruz et al., 2010). L'incorporation de l'OVA ou des peptides dans les NP a été quantifiée par dosage de protéines au bleu de Coomassie (Thermo Fischer scientific, Waltham, MA) ou encore par chromatographie liquide haute performance à phase inverse (Tel et al., 2013). La présence des mAbs à la surface des NP a été quantifiée par un dosage de protéines au bleu de Coomassie.

Lignes cellulaires et hybridomes murins

Les cellules EG7 et B16F10 ont été achetées à l'ATCC (American Type Culture Collection, USA). Les cellules iNKT $V\alpha 14/V\beta 8.2^+$ et l'hybridome DN32.D3 ont été donnés par le Dr A. Bendelac (Chicago, États-Unis). L'hybridome T murin 58 α/β transfecté avec un TCR invariant humain $V\alpha 24/V\beta 11$ (qui reconnaît l' α -GalCer présenté par le CD1d humain) a été décrit par Thedrez et ses collègues (Thedrez et al., 2007).

Validation des NP in vitro

Dans une première approche, des cellules de rate de souris WT ou déficientes ($Cd1d^{-/-}$, $Ja18^{-/-}$, $Baft3^{-/-}$) ont été incubées pendant 48 heures avec différentes doses d' α -GalCer/OVA libres ou co-encapsulés dans nos NP. Dans une seconde approche, des DC générées de moelle osseuse (BM-DC) en présence de FLT3L ont été incubées pendant 2 heures avec différentes doses d' α -GalCer/OVA libres ou vectorisés (1×10^5 cellules/puit). Après lavage, l'hybridome iNKT (DN32.D3, 1×10^5 cellules / puits) a été ajouté aux BM-DC sensibilisées. Après 24h de co-culture, les cytokines murines ont été mesurées dans les surnageants de culture par ELISA.

Évaluation in vivo de l'activation primaire et secondaire des cellules iNKT

Les souris ont été administrées par voie intraveineuse (i.v.) avec différentes doses d' α -GalCer libre ou vectorisé. (1) Activation primaire: Trois heures plus tard, les sérums ont été recueillis et l'IFN- γ a été quantifié par ELISA. Chez ces mêmes souris, les cellules de rate ont été préparées et la production intracellulaire d'IFN- γ a

été quantifiée par cytométrie en flux. (2) Activation secondaire et anergie : Les souris ont reçu une deuxième dose d' α -GalCer libre 7 jours après la primo-injection. La production d'IFN- γ a ensuite été quantifiée comme décrit ci-dessus. Pour l'étude de la fréquence des cellules iNKT produisant de l'IL-10, les souris ITIB (IL-10-reporter) ont reçu en i.v. l' α -GalCer libre ou vectorisé. Un mois plus tard, l'expression de la β -lactamase (reflétant la présence d'IL-10) par les cellules iNKT a été évaluée par cytométrie en flux (Bouabe et al., 2011). En bref, les splénocytes ont été repris dans du PBS contenant le substrat CCF4-AM (1 μ M) et le probénécide (2,5 mM) et incubés dans l'obscurité pendant 45 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées, marquées avec les mAbs appropriés, y compris le tétramère CD1d/ α -GalCer, et l'iodure de propidium puis analysées par cytométrie en flux.

Analyse de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ et des réponses antitumorales spécifique de l'OVA

Pour évaluer la réponse des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'OVA *in vivo*, des splénocytes de souris Rag2/OT-I (2×10^7 cellules) marqués au CFSE, ont été transférés par voie i.v. à des souris C57BL/6 naïves au jour 0. Un jour plus tard, ces souris ont été immunisées par injection dans les coussinets plantaires, avec l'OVA/ α -GalCer libres ou vectorisés (200 ng d'OVA et 5ng α -GalCer/souris). (1) À jour 4, la fréquence des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'OVA et marqués au CFSE a été quantifiée dans les ganglions lymphatiques poplités et dans la rate par cytométrie en flux. Pour ce faire, les cellules ont été marquées avec les mAbs anti-CD8-PE et anti-TCRV α 2-PECy7. (2) Pour l'analyse de l'activité CTL *in vivo*, 6 jours après l'immunisation avec les NP (ou forme libre), les souris ont été injectées à la fois avec des splénocytes chargés avec SIINFEKL et marqués au CFSE et des splénocytes contrôles marqués au PKH-26 (2×10^7 cellules/souris). Deux jours plus tard, les cellules de la rate ont été préparées et le nombre de cellules marquées au CFSE ou au PKH-26 a été déterminé par cytométrie en flux. Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé comme suit: $(1 - \{\text{ratio non pulsé} / \text{ratio pulsé}\}) \times 100$, où le ratio est égal au nombre de cellules marquées au PKH-26/cellules marquées au CFSE.

Pour l'analyse de la réponse anti-tumorale (contexte prophylactique), des souris ont été injectées par voie sous cutanée (s.c.) avec l'OVA/ α -GalCer libres ou vectorisés. Sept jours plus tard, ces souris ont reçu par voie s.c, des cellules de lymphome EL-4 exprimant l'OVA (cellules EG7, 2×10^5 cellules/souris). Dans un contexte thérapeutique, les souris ont d'abord reçu par voie i.v., des splénocytes de souris

Rag2/OT-I (5×10^6 cellules/souris) puis ont été injectées avec des cellules EG7. L'immunisation des souris avec l'OVA/ α -GalCer libres ou vectorisés s'est faite 1 et 5 jours après l'injection des cellules EG7. Dans les 2 protocoles, la taille des tumeurs a ensuite été mesurée en fonction du temps et le volume tumoral (mm^3) a été calculé selon la formule: longueur (mm) X (largeur² (mm^2) X 3,14/6. Pour des raisons éthiques, les souris ont été sacrifiées avant que la taille de la tumeur atteigne 1500 mm^3 .

Analyse des lymphocytes T CD8⁺ et des réponses anti-tumorales (auto-antigènes tumoraux)

Pour analyser la réponse immunitaire aux auto-antigènes tumoraux, les formulations de NP contenant les auto-antigènes et α -GalCer ont été injectées par voie s.c. (dos de la souris) 2 fois avec un intervalle de 7 jours entre les 2 injections. Sept jours après la dernière injection, la production de cytokines par des cellules issues des ganglions drainants la peau et/ou des splénocytes, a été quantifiée après une restimulation *ex vivo* avec des peptides libre Trp2 et gp100 (10 $\mu\text{g/ml}$). Pour étudier l'effet de nos constructions sur la réponse anti-tumorale (protocole prophylactique), des souris ont été immunisées deux fois (jour 0 et jour 7) et ont ensuite été inoculées avec les cellules tumorales B16F10 (5×10^5) à jour 14. Pour le protocole thérapeutique, des souris ont été injectées avec 5×10^5 cellules B16F10 (jour 0) avant les deux vaccinations (jour 5 et jour 12). La taille des tumeurs a ensuite été mesurée tous les 2 jours. Le phénotype des lymphocytes T infiltrants les tumeurs a été analysé à jour 14 (protocole thérapeutique). En résumé, des suspensions cellulaires ont été préparées à partir des tumeurs et ont été enrichies en cellules CD45⁺ en utilisant le système de séparation magnétique multiMACS (Miltenyi Biotec, Allemagne). Pour identifier les lymphocytes T CD8⁺, les cellules ont ensuite été marquées avec le dextramère H-2K^b/Trp₂₁₈₀₋₁₈₈ conjugué au PE (30min, T° ambiante), puis les mAbs anti-CD3 et anti-CD8. Pour l'étude des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs, les cellules enrichies ont été marquées avec les mAbs spécifiques des molécules CD3, CD4 et CD25 puis fixées, perméabilisées et marquées avec le mAb anti-Foxp3. Les cellules ont ensuite été acquises sur le cytomètre de type LSR Fortessa et analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

Génération des DC humaines comprenant les $BDCA3^+$ $CLEC9A^+$ et les cellules $iNKT$ humaines

Les cellules $CD34^+$ sont issues de sang de cordon qui provient de chez ABCell-Bio (Paris, France) ou encore de l'EFS Grenoble. Pour l'étape d'amplification, les cellules $CD34^+$ ont été cultivées dans le milieu StemSpan en présence de Flt3L (100 ng/ml), de SCF (100 ng/ml), d'IL-3 (20 ng/ml) et de thrombopoïétine (TPO) (50 ng/ml) pendant une semaine. Ensuite, pour induire leur différenciation en DC, ces cellules ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 complet (plaque de 96 puits à fond rond, $1-2 \times 10^4$ cellules/puit) contenant du SCF (20 ng/ml), du GM-CSF (20 ng/ml), de l'IL-4 (20 ng/ml) et du Flt3L (100 ng/ml). Pour optimiser l'étape de différenciation et augmenter le rendement en DC, 1mM de stemregenin-1 (SR-1) a été rajouté (Calbiochem, Fontenay-sous-Bois France) (Balan et al., 2014). Le milieu en présence des facteurs de différenciation est renouvelé au bout de 5 jours. Les DC ont été récoltées entre le jour 10 et le jour 14. Le phénotype des DC humaines ainsi obtenues et notamment le pourcentage de DC $BDCA3^+/CLEC9A^+$ a été vérifié par cytométrie en flux, en utilisant les anticorps appropriés. Pour induire l'expansion des cellules $iNKT$, les PBMC humaines ont été cultivées en présence d' α -GalCer libre ou vectorisé (10 ng/ml). L'IL-2 (50 ng/ml) a été rajouté 24h après le début de la culture. À jour 7, le pourcentage de cellules $iNKT$ (cellules $CD3^+ 6B11^+$) a été déterminé par cytométrie en flux. Pour enrichir la préparation cellulaire en cellules $iNKT$, les cellules $6B11^+$ ont été sélectionnées positivement avec des billes immunomagnétiques selon les instructions du fabricant (séparateur MACS, Miltenyi Biotec).

Ciblage de DC $BDCA3^+$ $CLEC9A^+$ et co-culture avec les cellules $iNKT$

Pour étudier la spécificité de ciblage, les DC humaines totales générées *in vitro* (1×10^5 cellules/puits) ont été incubées avec les NP couplés à l'Alexa Fluor 647. Après 15 minutes, la fréquence des différentes sous-populations de DC positives pour l'Alexa Fluor 647 a été analysée par cytométrie de flux. Pour l'étude de l'activation des cellules $iNKT$, les DC totales ont été chargées avec l' α -GalCer libre ou vectorisé et co-cultivées pendant 24 ou 48 heures avec l'hybridome $iNKT$ 58 α/β ou avec des cellules $iNKT$ primaires après expansion (pureté > 95%) (Rapport 1: 5).

L'expansion des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques au Melan A_{26-35}

Pour induire l'expansion des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques au Melan A_{26-35} , les PBMC (2×10^6 cellules/puits) d'individus HLA-A2 $^+$ ont été cultivés avec le peptide

Melan A₁₈₋₃₅ libre ou vectorisé (0,9 µg/ml) plus α-GalCer (10 ng/ml) en présence d'IL-2 (50 ng/ml) pendant 14 jours. La fréquence des cellules positives pour le dextramère A2/Melan A₂₆₋₃₅ a été analysée par cytométrie en flux. Pour l'analyse de l'expression d'IFN-γ et de CD107, les cellules ont été marquées dans un premier temps avec le dextramère A2/Melan A₂₆₋₃₅ conjugué au PE puis lavées et restimulées avec des cellules T2 déficientes en TAP et chargées avec le peptide Melan A (rapport 10: 1) pendant 5 heures. Les cellules ont ensuite été marquées avec les mAbs anti-CD3 et anti-CD8 puis fixées et perméabilisées pour quantifier la présence d'IFN-γ. Pour l'étude de l'expression de CD107, les mAbs anti-CD107a+b ont été ajoutés dans le milieu de culture au début de la restimulation, en présence de Golgi-STOP pendant 4 heures. Les cellules ont ensuite été marquées avec les mAbs anti-CD3 et anti-CD8.

Origine des PBMC

Des échantillons de sang provenant de donneurs sains et de patients atteints de mélanome (stade I à IV) ont été obtenus à l'EFS Grenoble. L'approbation de l'étude a été donnée par le comité local d'éthique de l'hôpital universitaire de Grenoble. La Déclaration des principes d'Helsinki a été suivie et tous les participants ont donné leur consentement écrit. Les échantillons de PBMC ont été obtenus via des protocoles standards.

Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Un test U de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer deux groupes, sauf indication contraire. Un test de Kruskal-Wallis (non paramétrique), suivi du post-test de Dunn (logiciel PRISM v6, Graphpad) a été utilisé dans les expériences incluant un nombre de groupes supérieur à 2. Pour l'analyse statistique de la taille des tumeurs, les moyennes de "l'aire sous la courbe" de chaque individu ont été comparées en utilisant un test U de Mann-Whitney, sauf indication contraire. Une valeur de P <0,05 a été considérée comme significative.

Résultats

Résultats

La stimulation *in vitro* des cellules iNKT est améliorée lorsque l' α -GalCer est délivré par les NP/Clec9a

Nous avons tout d'abord testé la capacité des NP de PLGA contenant l' α -GalCer et l'OVA et décorées avec l'anticorps anti-Clec9a (comparativement aux NP/IgG) à activer les cellules iNKT *in vitro*. Nos résultats montrent que les NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a induisent une plus grande production d'IFN- γ (une cytokine anti-tumorale très importante) par les splénocytes de souris WT comparativement aux NP/ α -GalCer/OVA/IgG ou encore à l' α -GalCer libre (**figure 1A**). Cette production d'IFN- γ est dépendante de la présence des cellules iNKT puisqu'elle est abolie chez des souris CD1d^{-/-} ou encore Ja18^{-/-} (**figure 1B**). De plus, cette production d'IFN- γ en réponse aux NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a implique également les DC CD8 α^+ . En effet, les splénocytes de souris *Baft3*^{-/-} ne produisent plus d'IFN- γ en réponse à l' α -GalCer/OVA vectorisés dans les NP/Clec9A (**figure 1C**).

Nous avons ensuite généré *in vitro* des BM-DC en présence de Flt3L (phénotype, **figure 1D**, panel de gauche). Lorsque ces BM-DC sont pulsées *in vitro* avec l' α -GalCer encapsulé dans les NP/Clec9a, elles induisent une production d'IL-2 par l'hybridome iNKT DN32.D3 plus élevée comparativement à l' α -GalCer encapsulé dans les NP/IgG ou encore l' α -GalCer libre (**figure 1D**, panel de droite). En conclusion, la distribution ciblée de l' α -GalCer par les NP/Clec9a activent efficacement (comparativement aux groupes contrôles) les cellules iNKT *in vitro*.

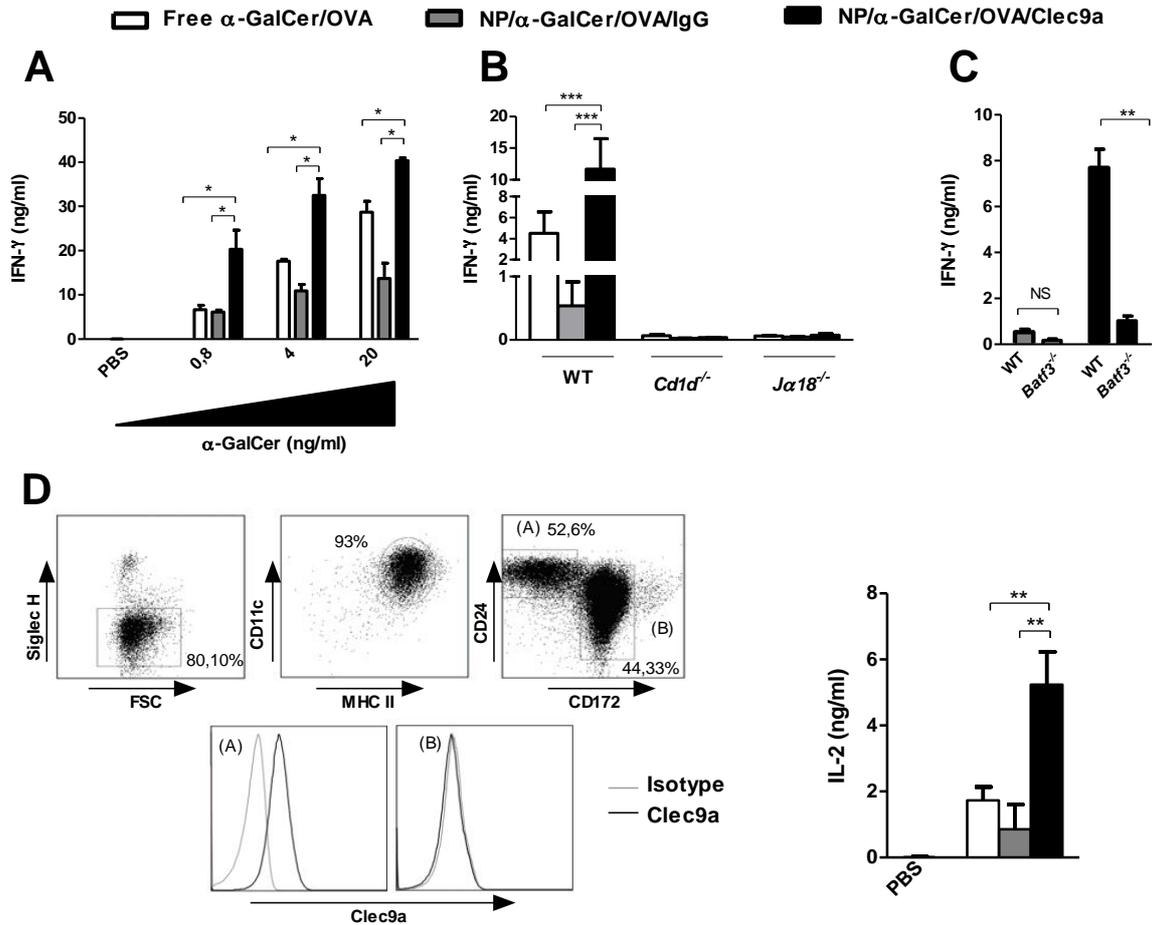


Figure 1 : La stimulation *in vitro* des cellules iNKT est améliorée lorsque l'α-GalCer est délivré par les NP/Clec9a. A, Les cellules spléniques de souris WT ont été stimulées avec des doses croissantes d'α-GalCer/OVA libres ou encapsulés dans des NP/Clec9A (NP/α-GalCer/OVA/Clec9a) ou des NP/IgG (NP/α-GalCer/OVA/IgG). **B**, Les cellules spléniques de souris WT, *Cd1d*^{-/-} ou *Ja18*^{-/-} ont été incubées avec de l'α-GalCer/OVA libres ou encapsulés. **C**, Les splénocytes de souris WT ou *Baft3*^{-/-} ont été incubés avec l'α-GalCer/OVA encapsulés dans les NP/Clec9a ou NP /IgG. Il est à noter que la déficience en *Baft3* n'a pas réduit le nombre de cellules iNKT spléniques (non représenté). **A-C**, La production d'IFNγ dans les surnageants de culture a été quantifiée par ELISA. **D**, (Panel de gauche), Stratégie de gating pour la détection des BM-DC. La population Siglec H⁻ CD11c⁺ MHC classe II⁺ a été sélectionnée et représentent les DC totales. Parmi ces cellules, les sous-populations CD172^{low}CD24⁺ (CD8α⁺) et CD24^{low}CD172⁺ (CD11b⁺) ont été identifiées. L'expression de Clec9a par les DC CD24⁺ et CD172⁺ est représentée. (Panel de droite), les BM-DC totales ont été pulsées pendant 2 heures avec l'α-GalCer libre ou encapsulé et, après lavage, les BM-DC ont été cultivées avec l'hybridome DN32.D3. La production d'IL-2 a été quantifiée dans les surnageants. **D**, Les résultats

représentent un pool de trois expériences indépendantes (**A, C**) ou montrent les résultats d'une expérience représentative de deux ou trois (**B** et **D** panel de droite). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (test de Kruskal-Wallis (**A, B** et **D**) ou Mann-Whitney U test (**C**)).

La stimulation primaire et secondaire *in vivo* des cellules iNKT est améliorée lorsque l' α -GalCer est délivré par les NP/Clec9a

Nous avons ensuite évalué la capacité de l' α -GalCer vectorisée dans les NP/Clec9A, à activer les cellules iNKT *in vivo*. Quelle que soit la dose injectée, les NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a induisent une fréquence plus élevée de cellules iNKT produisant l'IFN- γ comparativement aux NP/ α -GalCer/OVA/IgG ou α -GalCer/OVA libre (**figure 2A**, panel de gauche). Il est à noter que l'inoculation de 5 ng d' α -GalCer incorporé dans les NP/Clec9a activent aussi efficacement la production d'IFN- γ par les iNKT que 100 ng d' α -GalCer libre, ce qui montre l'efficacité de la vectorisation de l' α -GalCer dans les NP/Clec9A à activer les iNKT. De plus, dans ces deux groupes d'animaux, la concentration sérique d'IFN- γ est identique ainsi que la transactivation des cellules NK (**figure 2A**, panel de droite et résultats non montrés).

L'injection répétée d' α -GalCer libre conduit à un état de non réponse des cellules iNKT appelé anergie, en raison de l'activation non contrôlée de ces cellules (Parekh et al., 2009). Ce phénomène peut avoir un impact profond sur le développement des thérapies vaccinales basées sur les cellules iNKT dans le cancer, en limitant l'effet prime-boost. Nous avons donc regardé si notre système de délivrance de l' α -GalCer pouvait contrer cet effet négatif. Pour cela, nous avons injecté aux souris 100 ng d' α -GalCer libre ou 5 ng d' α -GalCer incorporé dans les NP/Clec9a (ou NP/IgG), ces 2 doses ayant été utilisées car elles sont à l'origine d'une primo-activation des iNKT (**figure 2A**). Comme attendu, la seconde administration d' α -GalCer libre conduit à une fréquence beaucoup plus faible de cellules iNKT produisant l'IFN- γ comparativement aux souris ayant reçu une seule injection d' α -GalCer (**figure 2B**, panel de gauche). De façon intéressante, l'activation primaire des cellules iNKT par les NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a conduit à une activation secondaire des iNKT plus forte que celle observée avec l' α -GalCer libre (lors de la primo-activation), même si celle-ci reste significativement inférieure à une primo-activation des iNKT. Cet effet des NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a est associé à une plus faible expression de surface de la molécule PD-1 sur les cellules iNKT (Parekh et al., 2009) (**figure 2B**, panel de

droite). Par conséquent, l'activation primaire des cellules iNKT par les NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a améliore la fonctionnalité (mesurée par la production d'IFN- γ) des cellules iNKT lors d'une stimulation secondaire. En parallèle de cet état d'anergie décrit pour les cellules iNKT, il a été démontré que l'inoculation d' α -GalCer libre induit l'expansion de cellules iNKT immunosuppressives, produisant de l'IL-10 (cellules NKT10) (Sag et al., 2014), ce qui peut également constituer un problème pour la mise en place d'une thérapie anti-cancéreuse. Nos résultats confirment que l'administration d' α -GalCer libre chez les souris ITIB (IL-10 reporter) conduit à l'expansion des cellules NKT10 (**figure 2C**). De façon remarquable, l'activation primaire des cellules iNKT par les NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a réduit la fréquence de cellules NKT10. Pris dans leur ensemble, les résultats montrent que les stimulations primaire et secondaire *in vivo* des cellules iNKT sont très nettement améliorées en délivrant l' α -GalCer via les NP/Clec9a.

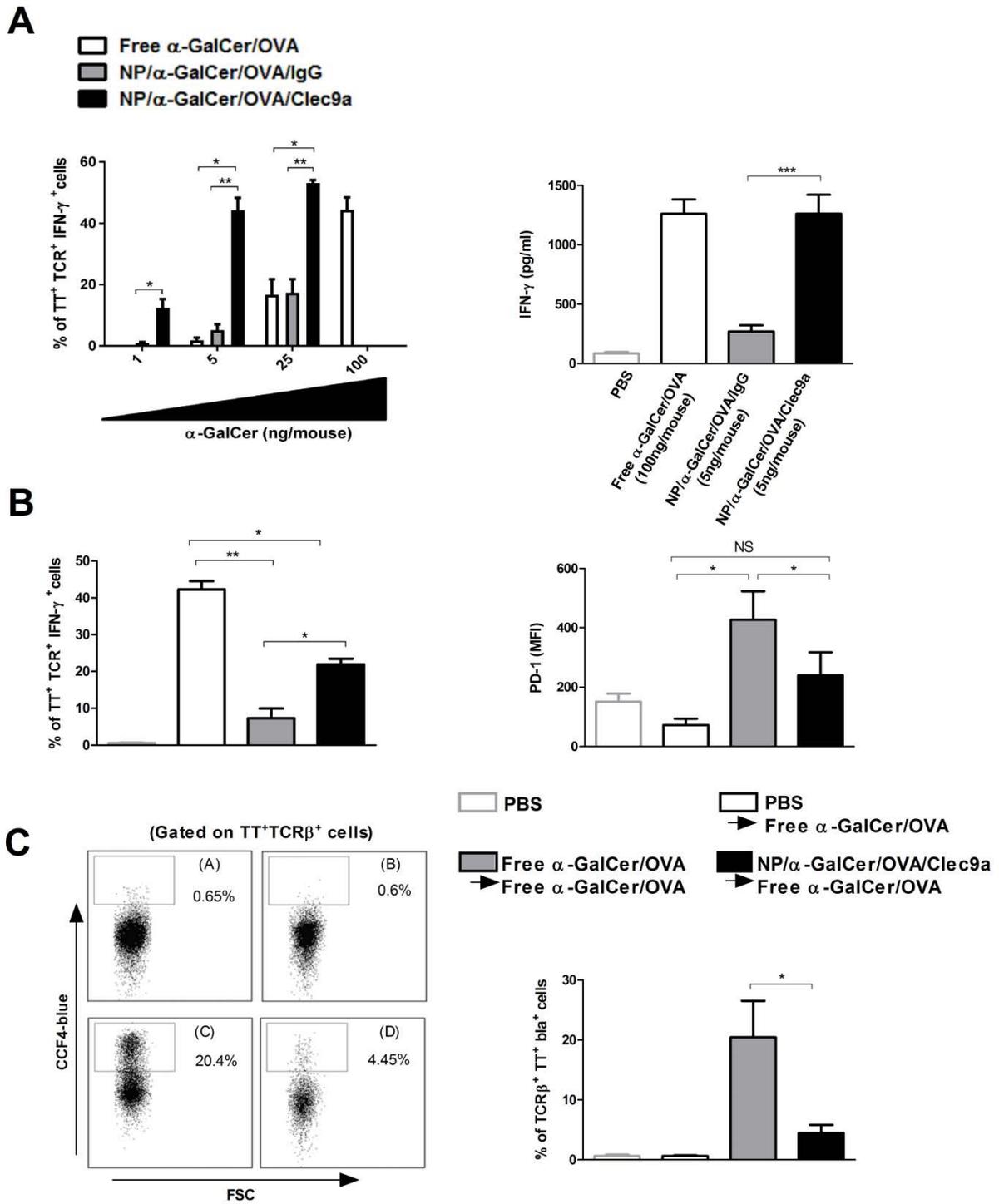


Figure 2 : La stimulation primaire et secondaire *in vivo* des cellules iNKT est améliorée lorsque l' α -GalCer est délivrée par les NP/Clec9a. A panel de gauche, Des souris WT ont été injectées en i.v. avec du PBS ou des doses croissantes d' α -GalCer libre ou encapsulé dans les NP/Clec9a ou NP/IgG. Après 3 heures, les cellules iNKT spléniques ont été préparées pour quantifier par cytométrie de flux, la production intracellulaire d'IFN- γ par les cellules iNKT. Les résultats représentent la moyenne \pm sem des cellules iNKT positives pour l'IFN- γ . A Panel de droite, la figure

représente la concentration sérique d'IFN- γ (100 ng d' α -GalCer libre/souris versus 5 ng d' α -GalCer encapsulé/souris). **B**, Les souris ont été injectées en i.v. avec l' α -GalCer libre (100 ng/souris) ou avec l' α -GalCer encapsulé dans NP/clec9a (5 ng/souris). Sept jours plus tard, les souris ont reçu une deuxième injection d' α -GalCer libre (100 ng/souris). Les cellules iNKT de rate ont été préparées 3 heures plus tard, pour quantifier la production intracellulaire d'IFN- γ (panel de gauche) ou l'expression de PD1 (panel de droite). **C**, Panel de gauche, Afin de quantifier les NKT10, les souris ITIB ont été utilisées. Dot plots représentatifs des cellules iNKT (Tétramère CD1d⁺TCRb⁺) exprimant la fluorescence CCF4-bleu (correspondant aux cellules IL-10- β -lactamase⁺). Panel de droite, Le pourcentage de cellules iNKT IL-10- β -lactamase⁺ parmi les cellules iNKT totales est représenté (n = 5). **A-C**, Une expérience représentative d'au moins deux expériences est montrée (n = 5).*** P <0,001 ** P <0,01, * P <0,05 (test de Kruskal-Wallis).

La co-administration de l'OVA (antigène contrôle) et de l' α -GalCer encapsulés dans les NP/Clec9a induit des réponses T CD8⁺ et anti-tumorales puissantes.

Nous avons ensuite testé l'efficacité de notre système de distribution sur l'expansion *in vivo* des lymphocytes T CD8⁺. À cette fin, des souris préalablement injectées avec des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (issus de rate de souris Rag/OT-I) et marqués au CFSE, ont été inoculées (en s.c.) avec l' α -GalCer et l'OVA encapsulés dans des NP/Clec9a ou des NP/IgG ou bien sous forme libre. Nos résultats montrent une forte expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du peptide l'OVA₂₅₇₋₂₆₄, présents dans la rate et les ganglions drainants, après injection des NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a, comparativement aux deux groupes contrôles (**figure 3A**). Cette expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du peptide l'OVA₂₅₇₋₂₆₄ présent dans la rate et les ganglions drainants, nécessite la présence des lymphocytes iNKT puisque l'injection de NP chez les souris *CD1d*^{-/-} montre un niveau de prolifération de ces lymphocytes diminué par rapport aux souris WT (**figure 3B**). L'aide des cellules iNKT est donc critique pour la présentation croisée du peptide de l'OVA dans notre modèle. Parallèlement à la prolifération des lymphocytes T CD8⁺, nous avons également évalué l'effet *in vivo* de nos constructions sur la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ (**figure 3C**). L'inoculation des NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a induit une réponse CTL plus élevée par rapport aux souris témoins. Il est quand même à noter que l'injection de NP/ α -GalCer/OVA/IgG induit

une réponse cytotoxique significativement supérieure à celle de l' α -GalCer/OVA libre. Finalement, nous avons étudié l'efficacité de nos constructions sur les réponses anti-tumorales. Pour étudier les effets de la co-délivrance de l'OVA et de l' α -GalCer sur le contrôle du développement tumoral, des souris ont été immunisées avec les NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a (ou les formulations contrôles), 7 jours avant la greffe de cellules de lymphome EL4 exprimant l'OVA (EG7)(protocole prophylactique). Comme le montre la **figure 3D**, l'inoculation de NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a retarde la croissance des cellules de lymphome EG7, par rapport aux NP/ α -GalCer/OVA/IgG ou encore à l'OVA et l' α -GalCer libres. De la même façon, l'injection de NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a à des souris portant des tumeurs EG7 préétablies, entraîne également un retard dans la croissance tumorale, comparativement aux groupes contrôles (**figure 3E**). Ainsi, nos résultats montrent que l'OVA et l' α -GalCer encapsulés dans les NP/Clec9a ont des effets protecteurs, à la fois en contexte prophylactique et thérapeutique, sur le développement de tumeurs solides.

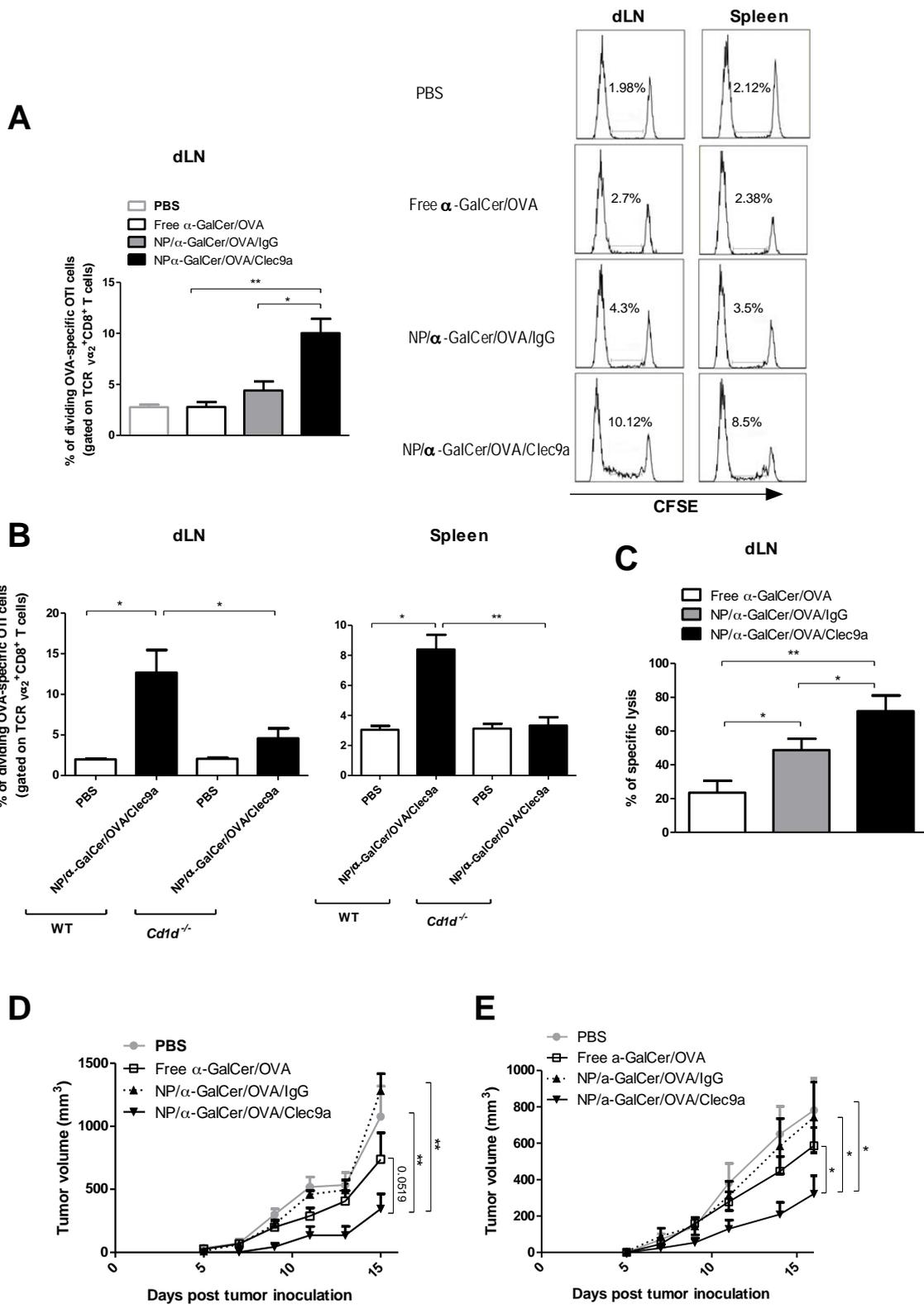


Figure 3 : La co-administration de l'OVA (antigène contrôle) et de l' α -GalCer encapsulés dans les NP/Clec9a induit des réponses T CD8⁺ et anti-tumorales puissantes. A-B, Des souris WT, préalablement injectées avec des cellules Rag2/OT-I marquées au CFSE, ont été inoculées dans les coussinets plantaires avec l'OVA (210 ng/souris) et l' α -GalCer (5 ng/souris) libres ou co-encapsulés dans

les NP/gG ou NP/Clec9a. Trois jours plus tard, la prolifération des cellules $V\alpha_2TCR^+CD8\alpha^+$ issues des ganglions drainants ou de la rate a été analysée par cytométrie de flux (n = 5-7). **A**, Panel de gauche, Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules $V\alpha_2TCR^+CD8\alpha^+$ en prolifération, issues des ganglions drainants (poplités). **A**, panel de droite, Des dot plots représentatifs de la prolifération (CFSE⁺) de ces cellules en réponse à l' α -GalCer/OVA libres ou vectorisés chez la souris WT sont montrés. **B**, Les histogrammes représentent la prolifération des cellules $V\alpha_2TCR^+CD8\alpha^+$ issues des ganglions drainants et de la rate de souris WT et CD1d^{-/-}, en réponse à l' α -GalCer/OVA vectorisés dans les NP/Clec9A. **C**, Pour l'étude de la réponse CTL, 6 jours après l'immunisation avec nos constructions, les souris ont été transférées avec un mélange de splénocytes WT chargés avec le peptide SIINFEKL et marqués au CFSE (cellules cibles syngéniques) et de splénocytes WT non chargés et marqués au PKH-26 (cellules syngéniques contrôles). Les données représentent le pourcentage de lyse spécifique (n = 5). **D**, Des souris WT ont été injectées par voie s.c. avec de l'OVA (1,26 μ g/souris) et de l' α -GalCer (30 ng/souris) libres ou vectorisés. Sept jours plus tard, les souris ont été inoculées en s.c. avec des cellules EG7 exprimant l'OVA (2×10^5 cellules/souris). **E**, Des souris préalablement injectées avec des cellules Rag2/OT-I (5×10^6 splénocytes/souris) ont été inoculées avec des cellules EG7 exprimant l'OVA. Un et cinq jours plus tard, ces souris ont été injectées avec l'OVA (210 ng/souris) et l' α -GalCer (5 ng/souris) libres ou vectorisés. **D** et **E**, La taille des tumeurs a ensuite été mesurée tous les deux jours (n = 8). **A-E**, Une expérience représentative d'au moins deux expériences est affichée. ** P <0,01, * P <0,05 (test de Kruskal-Wallis) (**A**, **B** et **C**) et test U de Mann-Whitney (aire sous la courbe) (**D-E**).

Les NP/Clec9a chargées avec l' α -GalCer et les auto-antigènes tumoraux retardent le développement des tumeurs

Nous avons ensuite examiné si notre système de ciblage pouvait abroger la tolérance vis-à-vis des auto-antigènes tumoraux et ainsi permettre le développement d'une réponse anti-tumorale efficace. À cette fin, deux peptides tumoraux, Trp2 et gp100 (épitopes T CD8⁺ dominants exprimés par les mélanomes B16 hautement malins), ont été incorporés dans les NP/ α -GalCer/Clec9a. Dans un premier temps, nous avons testé si notre construction était capable d'induire une réponse spécifique

dirigée contre des 2 antigènes tumoraux. L'immunisation s.c. de souris avec les NP/ α -GalCer/peptides tumoraux/Clec9a conduit à une forte production d'IFN- γ par les cellules des ganglions lymphatiques drainants après restimulation *ex vivo* avec les peptides libres (**figure 4A**). Suite à ces résultats, nous avons testé l'efficacité de notre construction dans la réponse anti-tumorale. Dans un protocole prophylactique, nos résultats montrent que la croissance des cellules B16F10 est considérablement retardée chez les souris ayant été injectées avec des NP/ α -GalCer/peptides tumoraux/Clec9a, comparativement aux groupes contrôles (**figure 4B**). De la même façon, dans un contexte thérapeutique, l'inoculation de NP/ α -GalCer/peptides tumoraux/Clec9a chez des souris portant des tumeurs, retarde la progression tumorale, comparativement aux groupes témoins (**figure 4C**). Nous avons ensuite utilisé les souris *J α 18^{-/-}* afin d'évaluer le rôle des iNKT dans l'effet protecteur observé avec les NP/clec9a. Nos résultats confirment que le retard dans la croissance tumorale observée après injection d' α -GalCer/peptides tumoraux encapsulés dans les NP/Clec9a, nécessite la présence de cellules iNKT (**figure 4D**, panel de gauche). En revanche, la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ n'a aucun effet sur l'efficacité du vaccin (**figure 4D**, panel de droite). Il est à noter que le mAb anti-CD4 a également déplété les cellules iNKT CD4⁺ (résultat non montré) suggérant que dans notre contexte, l'aide des cellules NKT CD4⁻ dans la croissance tumorale est suffisante. Finalement, afin d'étudier le rôle des lymphocytes T CD8⁺ dans notre modèle, nous les avons déplétés chez les souris, en utilisant un anticorps neutralisant anti-CD8 β . La déplétion en lymphocytes T CD8⁺ abroge l'effet anti-tumoral du vaccin (**figure 4E**). Ainsi, l'effet thérapeutique observé avec le vaccin dépend des cellules iNKT, des lymphocytes T CD8⁺ mais n'implique pas les lymphocytes T helper.

Nous avons par la suite analysé la nature des lymphocytes T infiltrants les tumeurs. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène tumoral et aux lymphocytes T CD4⁺ régulateurs. L'analyse du rapport de ces 2 populations est souvent utilisé comme indice étroitement corrélé à la régression/progression tumorale (Preston et al., 2013). Nos résultats montrent que le rapport lymphocytes T CD8⁺ Trp2-spécifiques/lymphocytes T régulateurs (CD25⁺ CD4⁺Foxp3) est plus élevé dans les tumeurs de souris injectées avec le vaccin (NP/ α -GalCer/Trp2/gp100/Clec9a) comparativement aux groupes témoins (**figure 4F**, panel de gauche). De la même façon, le rapport lymphocytes T CD8⁺ perforine⁺/lymphocytes T régulateurs est également plus élevé dans les tumeurs de souris vaccinées avec les NP/ α -GalCer/Trp2/gp100/Clec9a (**figure 4F**, panel de

droit). En conclusion, nos résultats montrent que l'incorporation d'auto-antigènes tumoraux et de l' α -GalCer dans les NP/Clec9a induit une réponse spécifique aux auto-antigènes de mélanome et conduit à un retard de la croissance tumorale, dans un contexte prophylactique et thérapeutique.

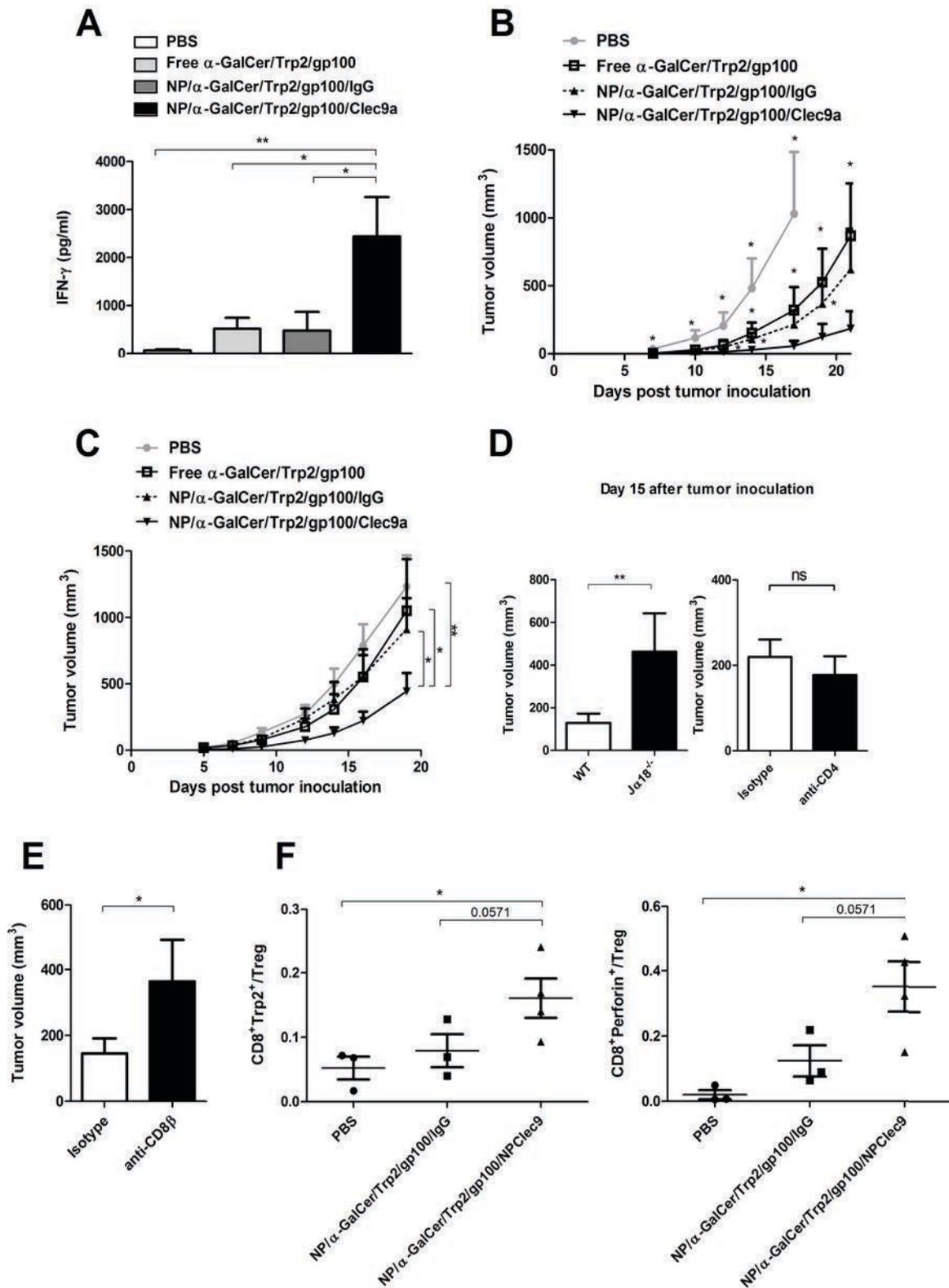


Figure 4 : Les NP/Clec9a chargées avec l' α -GalCer et les auto-antigènes tumoraux retardent le développement des tumeurs. A, Des souris WT ont été injectées par voie s.c. à jour 0, 7 et 14 avec les peptides Trp2 et gp100 (~ 2,4. μ g

chacun/souris) et l' α -GalCer (30 ng/ souris) libres ou co-encapsulés dans les NP/IgG ou NP/Clec9a. Trois jours plus tard, les cellules de ganglions lymphatiques drainants ont été restimulées *ex vivo* avec un cocktail de Trp2 et gp100 libres (10 μ g/ml chacun). L'IFN- γ a été mesuré 48 heures plus tard dans le surnageant. Une expérience représentative de deux est montrée (n = 5). **B**, Des souris ont été injectées aux jours 0 et 7 avec les 2 peptides (~ 2,4 μ g chacun/souris) et l' α -GalCer (30 ng/souris) libres ou co-encapsulés en NP/IgG ou NP/Clec9a. Sept jours après la 2^{ème} injection, les souris ont été inoculées avec les cellules de mélanome B16F10 (5x10⁵ cellules/souris). **C**, Des souris ont été inoculées en s.c. avec les cellules de mélanome B16F10. Cinq et 12 jours plus tard (volume tumoral à jour 5: 25-50 mm³), les souris ont été injectées en s.c. avec les peptides (~ 2,4. μ g chacun/souris) et d' α -GalCer (30 ng/souris) libres ou vectorisés. **B** et **C**, La taille des tumeurs a été mesurée tous les deux jours et le volume tumoral calculé (n = 16, deux expériences groupées). **D**, Le même protocole thérapeutique (comme celui décrit dans le panel **C**) a été effectué. Panel de gauche, Des souris WT et *Ja18^{-/-}* ont été utilisées et vaccinées avec des NP/ α -GalCer/peptides tumoraux/Clec9a. Panel de droite, Des souris WT ont été traitées avec un mAb anti-CD4 ou un isotype contrôle (à jour 3 et 10). **E**, Des souris WT vaccinées avec les NP/ α -GalCer/peptides tumoraux/Clec9a ont été traitées avec un mAb anti-CD8 β ou un isotype contrôle (jours 7, 10, 13 et 16). **D** et **E**, Les résultats représentent les volumes tumoraux 15 jours après l'implantation des cellules de mélanome B16F10 (n = 8). **F**, Deux semaines après l'injection s.c. de cellules de mélanome B16F10, les tumeurs de chaque souris ont été excisées et les pourcentages de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de Trp2 ou produisant la perforine ainsi que le nombre de lymphocytes T CD25⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ régulateurs ont été déterminés par cytométrie de flux. Pour chacune des populations, le nombre de cellules a ensuite été calculé et les rapports effectués. Les résultats affichés représentent chaque souris individuellement. ** P <0,01, * P <0,05 (test de Kruskal-Wallis pour **(A et F)** et test U de Mann-Whitney pour **(B-E)** (aire sous la courbe pour le panel **C**).

Le NP/ α -GalCer/CLEC9A cible les DC BDCA3⁺ et optimise l'activation des cellules iNKT humaines

Nous nous sommes ensuite intéressés à la capacité des NP/CLEC9A à cibler efficacement les DC BDCA3⁺ (CD141⁺) humaines. En effet, cette sous-population de DC a été identifiée comme étant l'équivalent humain des DC CD8 α ⁺ murines et par conséquent, constitue une cible très intéressante pour l'immunothérapie contre le cancer (Crozat et al., 2010; Poulin et al., 2010; Jongboled et al., 2010; Bachem et al., 2010). À cette fin, des DC humaines ont été différenciées *in vitro* à partir de progéniteurs hématopoïétiques (CD34⁺) de sang de cordon. Plusieurs sous-populations de DC ont été obtenues à la fin de la procédure de différenciation : les DC CD11c^{low} BDCA3⁺ représentant environ 35% des DC totales, les DC CD11c^{med} BDCA3⁻ et les DC CD11c^{hi} BDCA3⁻ (**figure 5A**). L'analyse en cytométrie de flux montre une expression de CLEC9A exclusivement par les DC CD11c^{low} BDCA3⁺ (**figure 5B**). Afin d'étudier le ciblage des DC BDCA3⁺ par les NP/CLEC9A, des DC totales générées *in vitro* ont été incubées avec des NP/CLEC9A (ou NP/IgG) couplées à l'AF647. Comme le montre la **figure 5C**, l'incubation des DC totales humaines avec 2 doses de NP/CLEC9A conduit à un ciblage spécifique des DC BDCA3⁺, comparativement aux 2 autres sous populations de DC ou encore par rapport aux NP/IgG. Il est quand même à noter que les DC BDCA3⁺ ont fixé/incorporé de faibles niveaux de NP/IgG. Suite à ces résultats, l' α -GalCer a été introduit dans les NP/Clec9A ou NP/IgG et des expériences de co-culture avec des iNKT humaines ont été réalisées. Des DC totales générées *in vitro* et incubées avec des doses croissantes d' α -GalCer vectorisé dans les NP/CLEC9A conduit à une production de cytokines par les cellules iNKT plus forte que l' α -GalCer libre ou vectorisé dans les NP/IgG. En effet, la co-culture de DC totales avec l'hybridome iNKT de souris 55 $\alpha\beta$ qui exprime un TCR V α 24/V β 11 invariant humain (reconnaissant donc le CD1d humain), conduit à une production plus importante d'IL-2 (**Figure 5D**). De même, les cellules iNKT humaines primaires sécrètent de plus grandes quantités d'IFN- γ lorsqu'elles sont incubées avec des DC chargées de NP/ α -GalCer/CLEC9A (**Figure 5E**). En revanche, dans ces conditions, les cellules iNKT humaines primaires produisent très peu d'IL-4 et pas d'IL-17A (résultats non présentés). En résumé, nos résultats montrent que les NP/CLEC9A ciblent les DC BDCA3⁺ CLEC9A⁺ humaines et conduit à une forte réponse des cellules iNKT humaines, lorsque l' α -GalCer est incorporé dans ces NP.

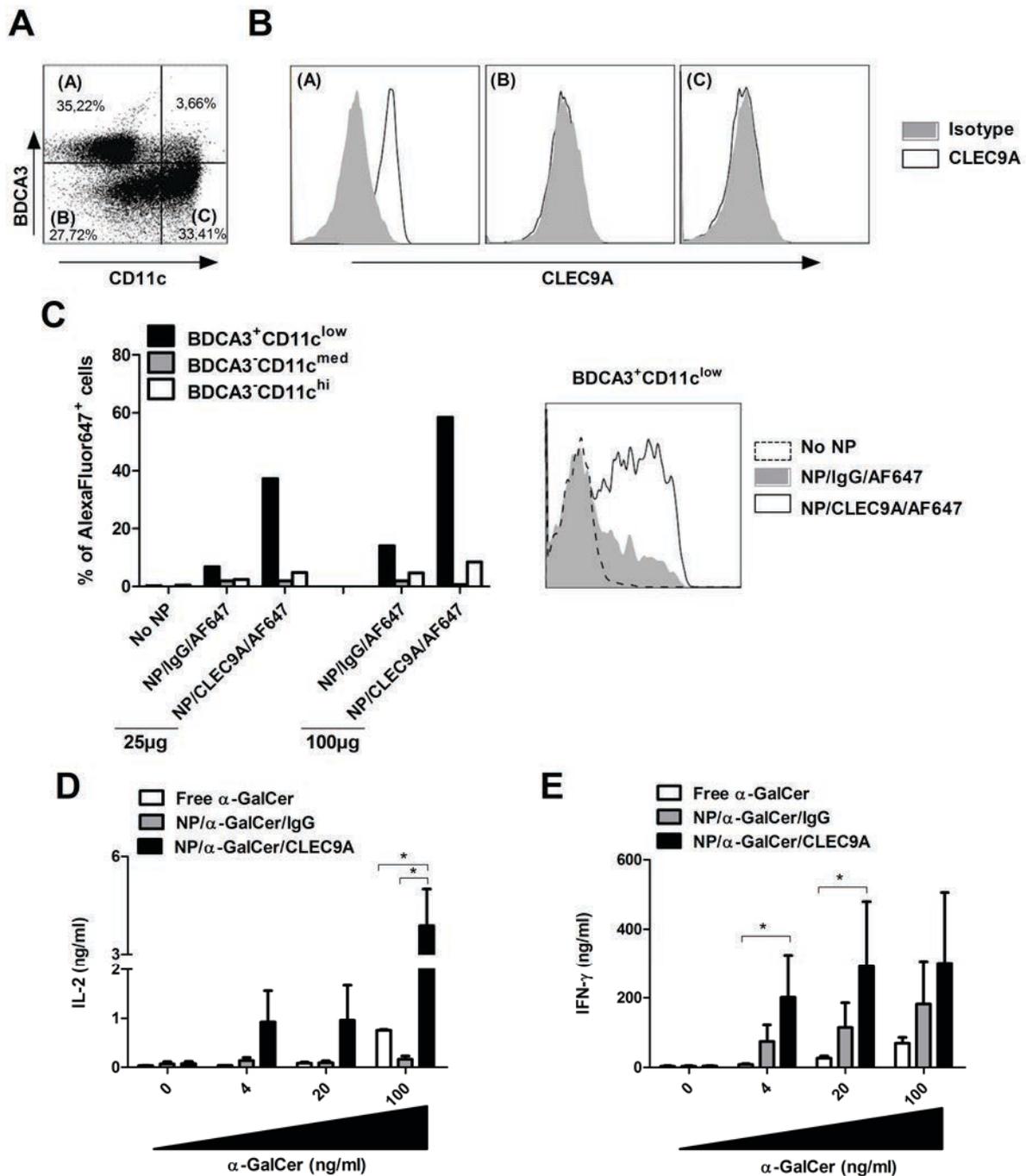


Figure 5 : les NP/CLEC9A ciblent les DC BDCA3⁺ et les NP/α-GalCer/CLEC9A optimisent l'activation des cellules iNKT humaines. **A**, Un profil de cytométrie en flux des DC humaines différenciées *in vitro* est montré. Les DC HLA-DR⁺ ont été analysées pour l'expression de CD11c et BDCA3: trois sous-populations de DC, notées A, B et C ont été identifiées. **B**, Les DC BDCA3⁺ CD11c^{low} (population A) BDCA3⁻CD11c^{med} (population B) et BDCA3⁻CD11c^{hi} (population C) ont été analysées pour l'expression de CLEC9A. **C**, Panel de gauche, Des DC totales (1x10⁵) ont été incubées avec 25µg ou 100µg de NP/IgG/AF647 ou NP/CLEC9A/AF647 pendant 15

minutes. Après lavage, le pourcentage des différentes sous-populations de DC positives en AF647 a été déterminé par cytométrie de flux. Panel de droite, Un histogramme représentant la spécificité de ciblage des DC BDCA3⁺ CD11c^{low} par les NP/CLEC9A (par rapport aux NP/IgG) est affiché. **D** et **E**, Des DC humaines (1x10⁴) ont été chargées avec des doses croissantes d'α-GalCer libre ou vectorisé et ont ensuite été co-cultivées avec l'hybridome iNKT 55αβ murin (5X10⁴)(**D**) ou avec des cellules iNKT humaines primaires (**E**). L'IL-2 murine et l'IFN-γ humaine ont été mesurés dans les surnageants (ELISA) après, respectivement, 24h et 48h de culture (pool de 3 donneurs). * P <0,05 (test de Kruskal-Wallis ANOVA).

Les NP/α-GalCer/CLEC9A contenant l'antigène tumoral "Melan A" favorise l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de Melan-A

L'expansion *ex vivo* ou *in vivo* de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'un antigène tumoral est un objectif important dans l'immunothérapie contre le cancer. Afin d'analyser l'impact potentiel du ciblage des DC DDCA3⁺ par les NP/CLEC9A sur l'activation *in vitro* de lymphocytes T CD8⁺, des PBMC provenant de donneurs HLA-A2⁺ sains ont été cultivés *in vitro* en présence d'α-GalCer et du peptide antigénique Melan A₁₈₋₃₅ (cible majeure pour les thérapies anti-mélanome) libres ou vectorisés. Pour certains donneurs, l'α-GalCer et le Melan A₁₈₋₃₅ encapsulés dans les NP/CLEC9A favorisent fortement l'expansion des cellules T CD8⁺ spécifiques de Melan A, comparativement aux groupes contrôles (**figure 6A**). Bien que le niveau de réponse varie d'un donneur à l'autre, l'augmentation globale du pourcentage et du nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de Melan A dans le groupe NP/α-GalCer/Melan A/CLEC9A, est statistiquement significative par rapport au milieu (panel de gauche, %) ou au NP/IgG (panel de droite, nombre) (**figure 6B**). Après 2 semaines d'activation, la majorité des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de Melan-A ont un phénotype de cellule mémoire effectrice (CD45RA⁻CCR7⁻) (non montré). L'effet des NP armés avec l'anticorps anti-CLEC9A sur l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de Melan A a ensuite été testé sur des PBMC de patients atteints de mélanome. Cependant, il nous semblait avant tout important de vérifier l'effet de notre formulation sur l'expansion des cellules iNKT chez ces patients cancéreux. En effet, étant donné la faible fréquence de cellules iNKT dans le sang de ces patients cancéreux, ceci constitue un obstacle majeur au traitement antitumoral basé sur l'utilisation des cellules iNKT (Tahir et al., 2001; Molling et al., 2005). En accord avec

les données de la littérature, nous confirmons que les patients atteints de mélanome ont un nombre de cellules iNKT plus faible que les donneurs sains à jour 0 (**figure 6C**). Après 14 jours de culture, une expansion des cellules iNKT de patients sains ou atteints de mélanome est observée en réponse aux NP/ α -GalCer/Melan A/CLEC9A. Il est à noter que l'expansion des cellules iNKT entre le jour 0 et le jour 14 semble être légèrement plus importante chez les patients atteints de mélanome par rapport aux donneurs sains (panel de droite, "Fold expansion"), bien que cette différence ne soit pas significative. Ayant établi que notre formulation conduisait à une expansion des cellules iNKT chez les patients atteints de mélanome, nous avons ensuite étudié la capacité des NP/ α -GalCer/Melan A/CLEC9A à induire l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de Melan A chez ces patients. Après 2 semaines de culture, nous observons une forte expansion de cellules T CD8⁺ spécifiques de Melan A chez ces patients, en réponse aux NP/ α -GalCer/Melan A/CLEC9A (**figure 6D**). Il est à noter que la fréquence des cellules T CD8⁺ spécifiques de Melan A à jour 14 est plus élevée chez les patients atteints de mélanome que chez les donneurs sains (~ 19,5% et ~ 6,3%, respectivement) (comparaison avec la **figure 6B**). De plus, ces cellules T CD8⁺ spécifiques de Melan A, après 2 semaines d'expansion, produisent de l'IFN- γ et expriment la molécule CD107 après restimulation *in vitro* avec le peptide Melan A, comparativement au peptide contrôle (**figure 6E**). En résumé, les NP décorés avec un anticorps anti-CLEC9A et chargées en α -GalCer et Melan A conduisent à une forte expansion des cellules iNKT et des cellules T CD8⁺ spécifiques de l'antigène tumoral chez les donneurs sains et chez les patients atteints de mélanome. Ces résultats sont très encourageants et prometteurs dans la mise en place d'une thérapie anti-cancéreuse.

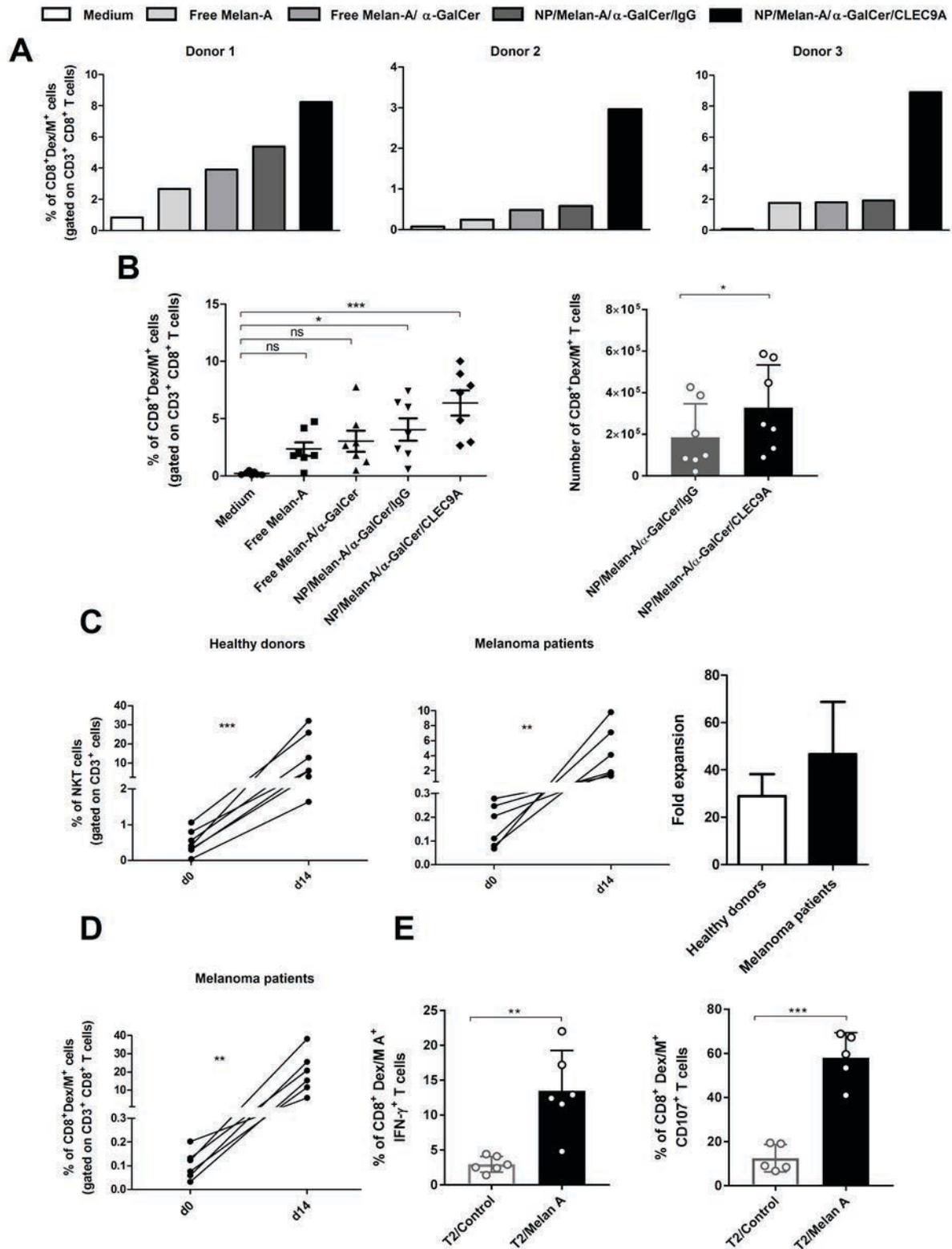


Figure 6 : La co-encapsulation d' α -GalCer et de Melan A dans NP/CLEC9A conduit à une expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à Melan A *in vitro*. **A**, Des PBMC de donneurs sains HLA-A2⁺ ont été cultivés soit avec un peptide de Melan A seul (0,9 μ g/ml) ou en présence de Melan A et d' α -GalCer (10 ng/ml) libres ou encapsulés dans les NP/CLEC9A ou NP/IgG. Deux semaines plus tard, la proportion de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de Melan A (Dextramer A2/Melan A₂₆-

³⁵, Dex/M⁺) a été déterminée par cytométrie de flux. Les résultats de trois donneurs sont présentés. **B**, La fréquence (panel de gauche) et le nombre total (panel de droite) de cellules T CD8⁺ spécifiques de Melan A à jour 14 provenant d'un groupe de sept donneurs sains sont présentés. Les barres représentent les valeurs moyennes. **C**, Deux semaines après culture des PBMC (donneurs sains et patients atteints de mélanome) en présence de NP/α-GalCer/Melan A/CLEC9A, les cellules CD3⁺ ont été analysées pour l'expression du TCR des iNKT (6B11). La fréquence des cellules iNKT (CD3⁺ 6B11⁺) est présentée à jour 0 et à jour 14. Le taux d'expansion des cellules iNKT entre le jour 0 et 14, est représenté dans le panel de droite. **D** et **E**, Des PBMC de patients atteints de mélanome ont été cultivés pendant 14 jours avec les NP/α-GalCer/Melan A/Clec9a. **D**, Les pourcentages de cellules T CD8⁺ spécifiques de Melan A sont représentés à jour 0 et à jour 14. **E**, Après 14 jours de culture, les PBMC de patients atteints de mélanome ont été restimulés avec des cellules T2 chargées avec le peptide Melan A ou avec un peptide contrôle. Les pourcentages de cellules T CD8⁺ spécifiques de Melan A produisant l'IFN-γ (panel de gauche) ou exprimant le CD107 (panel de droite) sont représentés. *** P <0,001, ** P <0,01, * P <0,05 (test de Wilcoxon (**B**, panel de droite), Mann-Whitney U test (**C**, **D** et **E**) ou test de Kruskal-Wallis ANOVA (**B**, panel de gauche)).

Discussion/Perspectives

Discussion/Perspectives

Parmi les stratégies thérapeutiques dirigées contre le cancer, l'immunothérapie prend de plus en plus d'importance. Parmi les différentes possibilités offertes aux cliniciens pour exploiter le système immunitaire et induire une réponse protectrice capable d'éliminer les cellules malignes, la vaccination offre des perspectives très prometteuses. C'est dans ce cadre que s'est inscrit l'objectif principal de ma thèse.

Les stratégies de vaccination se concentrent essentiellement sur l'induction de la réponse T CD8⁺ cytotoxique (CTL). Cette stratégie se heurte à deux problèmes majeurs : (1) trouver des antigènes tumoraux spécifiques de la tumeur et générer une réponse efficace contre ces antigènes afin de détruire la tumeur et (2) contourner les mécanismes d'échappement et d'immuno-suppression mis en place par la tumeur. Afin de générer une réponse T CD8⁺ efficace vis-à-vis des (néo)antigènes tumoraux, il semble critique de solliciter certaines populations d'APC, notamment les DC CD8α⁺. En effet ces cellules sont spécialisées dans la présentation croisée des Ag extracellulaires et dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Ce processus est important pour l'immunité contre les tumeurs, les virus et les bactéries intracellulaires (Kurts et al., 2010). La présentation croisée (ou « cross-priming ») requiert la présence de molécules dérivées d'agents pathogènes (PAMP), qui permettent notamment l'activation des DC, et/ou de cellules Th spécifiques de l'Ag. L'aide apportée par ces dernières est médiée, en grande partie, par le ligand CD40 exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Th).

Bien que le rôle des lymphocytes T CD4⁺ (Th) dans l'induction de la réponse CTL mémoire soit bien décrit, la réponse CTL peut aussi se développer d'une manière indépendante des cellules Th. De façon très intéressante, il a été démontré que les cellules iNKT peuvent remplacer les cellules Th et fournir l'aide nécessaire aux DC pour activer les lymphocytes T CD8⁺ naifs. L'administration de l'α-GalCer augmente l'expression de CD40L sur les cellules iNKT ce qui entraîne la maturation des DC et la production d'IL-12 (Kitamura et al., 1999; Tomura et al., 1999). L'IL-12 produite par les DC active les cellules iNKT qui secrètent à leur tour l'IFN-γ. Cette cytokine peut stimuler les cellules NK et la cytotoxicité médiée par les CTL (Hayakawa et al., 2001; Smyth et al., 2002). De par cette propriété unique, les cellules iNKT relient les réponses immunitaires innées et adaptatives et jouent un rôle clé dans l'induction de la réponse CTL. Les cellules iNKT sont devenues des cibles prometteuses pour le

développement d'adjuvants vaccinaux et d'immunothérapies, principalement dans le domaine du cancer.

Récemment, Semmling et ses collègues ont montré que l'interaction directe entre les DC, les cellules iNKT et les lymphocytes T CD8⁺ naïfs était essentiel (ménage à trois) (Semmling et al., 2010).

L'objectif de ma thèse a été d'exploiter la capacité des cellules iNKT à activer, via les DC, la réponse T CD8⁺. Pour cela, vu l'importance des DC CD8α⁺ dans le phénomène de présentation croisée, notre stratégie a été de cibler ces cellules afin de délivrer l'adjuvant (le ligand des cellules iNKT) et l'antigène au sein des DC et de favoriser le ménage à trois. Étant donné que la sous-population DC BDCA3⁺ chez l'homme a été identifiée comme l'équivalent fonctionnel des DC CD8α⁺ murines, (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010; Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010) cette stratégie, si elle est efficace, pourrait aussi s'appliquer chez l'homme. Le récepteur d'endocytose Clec9a est hautement exprimé par les DC CD8α⁺ murines et les DC BDCA3⁺ humaines et joue un rôle essentiel dans la reconnaissance et la présentation croisée des Ag (Zelenay et al., 2012). Le ciblage de Clec9a s'est avéré très prometteur chez la souris et le primate dans l'induction des réponses immunitaires adaptatives et humorales efficaces (Lahoud et al., 2011; Li et al., 2015; Sancho et al., 2008).

Nous avons utilisé dans cette étude des nanoparticules de PLGA décorées avec des anticorps anti-Clec9a. La partie vectorologie a été assurée par un spécialiste en Hollande (Dr Luis Ricardo Cruz) et la partie immunologie a été réalisée au laboratoire.

1. Les nanoparticules (NP)

Les nanoparticules présentent un intérêt considérable dans les domaines pharmaceutique et biomédical en raison de leur potentiel élevé de délivrance intracellulaire de biomolécules et de médicaments (Danhier et al., 2012; Irvine et al., 2015; Shao et al., 2014; Vasir and Labhassetwar, 2007). Dans le domaine de la vaccination, il a été montré que les antigènes formulés dans des nanoparticules peuvent favoriser les réponses immunitaires et cela pour différentes raisons:

1- Les nanoparticules peuvent protéger l'antigène encapsulé contre la dégradation chimique et enzymatique. Ils en évitent l'élimination rapide par les reins, ce qui augmente le temps de séjour de l'antigène dans l'organisme (Leleux and Roy, 2013).

2- L'un des avantages des nanoparticules est qu'ils peuvent imiter la taille et la forme d'un pathogène, notamment d'un virus, ce qui facilite la capture par les DC (Demento et al., 2011; Elamanchili et al., 2007).

3- Les nanoparticules favorisent la libération prolongée de l'antigène, l'augmentation de l'exposition de l'antigène aux DC et donc la présentation prolongée de l'antigène (Demento et al., 2012). Il a été rapporté que la libération prolongée d'antigène pouvait améliorer non seulement le niveau, mais aussi la qualité des réponses immunitaires (Oyewumi et al., 2010).

4- Les nanoparticules peuvent faciliter l'échappement endosomal, qui est un mécanisme connu pour conduire à la présentation croisée des antigènes par les DC et l'induction d'une réponse CTL (Shen et al., 2006).

5- Les nanoparticules peuvent incorporer divers types de molécules, telles que des antigènes (multiples) et/ou des molécules immunostimulatrices (adjuvants) et/ou des ligands de ciblage, mimant les agents pathogènes et facilitant la capture par les APC (Demento et al., 2012; Elamanchili et al., 2007).

Les nanoparticules peuvent également servir pour diminuer la dose d'antigène nécessaire pour déclencher une réponse immunitaire (Demento et al., 2011).

Un grand nombre de systèmes nanoparticulaires ont été décrits, tels que des particules polymères, des liposomes, des particules de type virus, des virosomes, des complexes immunostimulants (ISCOM), des émulsions et des nanobilles inorganiques. Parmi ceux-ci, les systèmes d'administration à base de poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) ont été particulièrement bien étudiés et sont des candidats prometteurs pour la délivrance d'antigène (Mundargi et al., 2008). Ce type de nanoparticules est déjà utilisé chez l'homme et a prouvé l'absence de toxicité.

1.1 – les nanoparticules de PLGA

Les nanoparticules de PLGA sont des polyesters aliphatiques qui sont disponibles dans différents rapports d'acide lactique et d'acide glycolique, différents poids moléculaires, et différents types de groupes terminaux. Ils ont été formulés de diverses manières, ce qui a pour résultat divers taille, charge, stabilité de l'antigène, capacité de chargement et profil de libération.

Les polymères PLGA ont été largement étudiés au cours des dernières décennies pour plusieurs applications biomédicales en raison de leurs excellents «records» de sécurité. Ils ont depuis longtemps été approuvés par la FDA pour l'utilisation par voie

parentérale chez l'homme (Ignjatovic et al., 2010; Jain, 2000; Shive and Anderson, 1997).

Après leur administration, les particules de PLGA subissent une dégradation, pendant laquelle l'eau se diffuse dans la matrice polymère, hydrolysant les liaisons ester dans tout le polymère et réduisant son poids moléculaire jusqu'à formation de produits de dégradation qui peuvent être dissous. Ce procédé augmente la porosité de la matrice, permettant la libération prolongée de la matière piégée.

Le PLGA est hydrolysé sous forme de monomères d'origine, l'acide lactique et l'acide glycolique, qui sont des sous-produits de diverses voies métaboliques et ne sont pas associés à une toxicité significative (Astete and Sabliov, 2006). La prise en charge de particules à base de PLGA par des APC peut accélérer encore la dégradation du PLGA car l'environnement acide du compartiment endosomal (pH ~ 4,5 - 6,5) accélère la dégradation par rapport au pH physiologique (pH 7,4) (Sorkin and Von Zastrow, 2002). En effet, un faible pH catalyse la rupture de la liaison ester du squelette du polymère (Yoo et al., 2005; Zolnik and Burgess, 2007).

Les formulations PLGA offrent de nombreux avantages pour la délivrance d'antigènes car ils sont biocompatibles et biodégradables, peuvent protéger les antigènes contre la dégradation et la clairance et permettent la co-encapsulation d'antigènes et de modulateurs immunitaires. Ce type de particule peut être ciblé sur des APC car leur nature particulaire peut accroître l'absorption et la présentation croisée en mimant la taille et la forme d'un pathogène envahissant.

1.2 – Taille de particules PLGA :

Les particules de PLGA peuvent être synthétisées avec des diamètres allant d'environ 80 nm à 250 µm (Black et al., 2010). On sait que la taille des particules influence la capacité de chargement et la cinétique de libération (Johansen et al., 2008; Joshi et al., 2013; Oyewumi et al., 2010). Les particules plus petites sont généralement considérées comme plus efficaces, car leur taille permettrait un déplacement plus facile à travers les épithéliums et d'autres barrières biologiques et permettrait aux particules d'atteindre plus efficacement les tissus cibles (Link et al., 2012; Manolova et al., 2008; Simon and Sabliov, 2014). L'impact de la taille des nanoparticules sur la réponse immunitaire résultante dépend également de la voie d'administration utilisée (Leleux and Roy, 2013; Manolova et al., 2008).

Une forte corrélation entre la taille des nanoparticules et le mécanisme d'adsorption, de dégradation et de présentation de l'antigène par les APC a été rapportée dans

différentes études (Joshi et al., 2013; Oyewumi et al., 2010; Tran and Shen, 2009). On sait que les APC adsorbent et (dégradent) des particules de dimensions comparables aux virus et aux bactéries (Xiang et al., 2006). Des particules de l'ordre de 20 à 200 nm sont efficacement capturées par les DC par endocytose ou pinocytose et facilitent l'induction de réponses immunitaires cellulaires, alors que des microparticules (MP) de 0,5 à 5 µm sont absorbées par phagocytose ou macropinocytose, générant principalement des réponses humorales (Joshi et al., 2013; Oyewumi et al., 2010; Sharp et al., 2009). Les particules de plus de 10 µm sont peu capturées par les APC, conduisant à une activation immunitaire défectueuse (Joshi et al., 2013; Katare et al., 2005; Silva et al., 2015).

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser des nanoparticules de PLGA (100-200nm). Joshi *et al* ont comparé des particules de PLGA de différentes tailles co-encapsulant de l'ovalbumine (OVA) et du CpG-ODN. Ces auteurs ont montré une libération totale de l'OVA et du CpG-ODN allant de 100% pour les NPs à environ 10% pour les MPs après 48h. Ils ont observé que l'efficacité d'adsorption des particules et la régulation positive de l'expression du CMH de classe I et de CD86 sur les BM-DC corrélait avec une taille de particules plus faible (Joshi et al., 2013).

Ces résultats concordent avec les observations de Silva AL *et al*, en comparant des PLGA NP et MP co-encapsulant OVA et poly (I: C) (Silva et al., 2015). Contrairement aux MP, les NP sont efficacement internalisées par les DC *in vitro*. La vaccination sous-cutanée de souris C57BL/6 avec des NP a entraîné une réponse significativement meilleure des cellules T CD8⁺ spécifiques d'Ag par rapport aux MP. Les NP ont également induit une réponse d'anticorps de type TH1/TH2 équilibrée, tandis que les MP n'augmentent pas les titres d'anticorps (Silva et al., 2015).

Ces études suggèrent que les vaccins nanoparticulaires sont plus adaptés et optimisent l'adsorption et la présentation croisée de l'Ag par le CMH de classe I.

2 – NP/α-GalCer/OVA/Clec9a et la réponse des cellules iNKT

Nos travaux montrent que les NP décorées avec Clec-9A activent mieux les cellules iNKT *in vivo* et favorise la trans-activation des cellules NK comparativement à la forme libre ou aux NP décorées avec l'isotype contrôle (NP/α-GalCer/OVA/IgG). L'activation supérieure des cellules NK pourrait jouer un rôle supplémentaire dans les effets anti-tumoraux rapportés dans notre étude. Il a été montré dans plusieurs études que l'IFN-γ produit par les cellules iNKT activées par l'α-GalCer augmente la

cytotoxicité anti-tumorale médiée par les cellules NK (Hayakawa et al., 2001; Nakagawa et al., 2001; Smyth et al., 2002).

L'avantage de notre système de ciblage est d'induire une forte réponse innée avec une dose faible d' α -GalCer. Cela pourrait présenter un avantage en clinique pour réduire les effets secondaires liés à l'administration de fortes doses d' α -GalCer. Cette optimisation de la réponse iNKT pourrait s'expliquer par le fait que l'internalisation de l' α -GalCer par la molécule Clec-9A conduirait à un plus grand nombre de molécules de CD1d chargées avec α -GalCer, dans les compartiments endosomaux. Ce n'est pas le cas des particules NP/IgG qui ne semblent pas être prises en charge correctement par les APC et conduisent à une faible activation des iNKT. L'activation des iNKT par les NP/IgG commence à s'observer dès lors que la dose d' α -GalCer augmente.

Une question importante était de savoir si la réponse obtenue était le résultat de la prise en charge des NP/ α -GalCer/OVA/Clec-9A par les DC CD8 α^+ . Il existe des approches pour dépléter la totalité des DC telle les souris CD11c-DTR (Jung et al., 2002) ou des souris KO pour des facteurs de transcription importants pour les DC (Zenke and Hieronymus, 2006). Cependant, ces modèles ne sont pas spécifiques.

Pour étudier la spécificité de ciblage des DC CD8 α^+ , nous avons utilisé les souris Batf3^{-/-}. Batf3 est un facteur de transcription qui contrôle le développement des DC CD8 α^+ . Ces souris montrent une perte sélective de DC CD8 α^+ , sans anomalie d'autres types de cellules hématopoïétiques. Les souris Batf3^{-/-} présente une altération de la présentation croisée des antigènes et aussi des réponses CTL diminuées dans un modèle d'infection virale. Les réponses anti-tumorales sont également altérées chez ces souris (Hildner et al., 2008). Dans notre modèle, nous avons montré que la production d'IFN- γ en réponse aux NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a dépendait des DC CD8 α^+ . En effet, en présence de ces NP, les cellules spléniques des souris Batf3^{-/-}, comparativement aux souris WT produisent moins d'IFN- γ , *in vitro*. Cependant, il est clair que cette approche n'est pas une preuve directe d'un ciblage des DC CD8 α^+ .

Une façon élégante de montrer le ciblage des DC CD8 α^+ *in vivo* serait d'injecter des NP fluorescents comme cela a été fait par Cruz LJ et al. Les souris ont été injectées en s.c. (dans le flanc droit) par des NP PLGA couvert avec les mAbs (anti-DEC205, anti-CD11c ou anti-CD40) et contenant l'OVA-AF647. L'intensité de fluorescence due à l'OVA-AF647 dans les DC F4/80⁻ CD11b⁺ CD11c⁺ a été analysée 48h après l'injection dans les ganglions lymphatiques inguinaux et les rates par cytométrie en

flux (Cruz et al., 2014). Nous avons essayé de suivre *in vivo* nos NP en utilisant des NP-AF647 mais les résultats se sont avérés décevants. Quelques mises au point sont nécessaires (cinétique). L'injection en i.v. de nos formulations aux souris Batf3^{-/-} ou aux souris Clec9a^{-/-} et l'analyse de la fréquence des cellules iNKT produisant l'IFN-γ 3h après injection pourraient également nous aider à étudier la spécificité du ciblage, bien qu'il s'agisse encore d'une analyse indirecte.

Dans le but d'optimiser les réponses immunitaires (en particulier dans le contexte du cancer), la vaccination implique habituellement plusieurs injections de vaccin (système prime-boost). Cependant, il a été montré que l'activation des cellules iNKT avec plusieurs doses d'α-GalCer *in vivo* conduisait à un état de non réponse appelé « anergie ». Ce phénomène a été plus récemment controversé par Sag *et al* où les auteurs ont montré que la forte activation médiée par l'α-GalCer libre ne conduisait pas à une anergie des cellules iNKT (Sag et al., 2014). Les cellules iNKT pré-traitées par l'α-GalCer voient leur prolifération et leur production de cytokines proinflammatoires diminuées lors d'une seconde stimulation par l'α-GalCer (Parekh et al., 2005; Fujii et al., 2002; Uldrich et al., 2005), ce qui a été interprété comme une perte générale de fonctions effectrices des iNKT. Cependant, Sag *et al* ont démontré, que les cellules iNKT pré-traitées par l'α-GalCer présentaient une prolifération accrue chez les souris pré-traitées par l'α-GalCer un mois plus tôt (analyse de l'expression de Ki67 dans les cellules iNKT, l'incorporation de BrdU et l'expression génomique) (Sag et al., 2014).

Les auteurs rapportent également une activité cytotoxique intacte des iNKT. Néanmoins, les cellules iNKT pré-traitées par l'α-GalCer produisent des quantités très réduites d'IL-4 et d'IFN-γ suite à une stimulation secondaire avec l'α-GalCer (Sag et al., 2014) (état d'anergie) (Parekh et al., 2005; Fujii et al., 2002). L'activité anti-tumorale est également altérée. De façon intéressante, Sag *et al* montrent que cette perte d'activité est due à la production d'IL-10, puissante cytokine immunosuppressive, par les iNKT. La stimulation répétée par l'α-GalCer conduit au développement de iNKT présentant un phénotype de cellules régulatrices. L'abrogation de la production d'IL-10 par les iNKT restaure l'activité anti-tumorale des iNKT. La caractérisation phénotypique/fonctionnelle des cellules NKT10 suppressives paraît très importante pour optimiser la réponse des cellules iNKT à des fins thérapeutiques. De façon remarquable, notre stratégie de ciblage a montré une efficacité en réduisant l'expansion des iNKT10 en réponse à une seconde

stimulation par l' α -GalCer libre. Ce résultat est important vu l'activité immunosuppressive de ces cellules.

L'induction d'une réponse immunitaire efficace contre les antigènes cancéreux nécessite des immunisations répétées. La capacité de notre formulation à promouvoir des réponses innées fortes (amélioration de la réponse primaire et secondaire des cellules iNKT) pourrait être la base pour générer des réponses CTL anti-tumorales efficaces.

3 – NP/ α -GalCer/peptides/Clec9a et la réponse anti-tumorale

Dans un modèle tumoral, la co-administration active de l'OVA et de l' α -GalCer (sous forme vectorisée dans les NP/Clec9a) augmente la réponse des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'OVA et réduit le développement des tumeurs EL-4 exprimant l'OVA (EG.7) dans des contextes prophylactiques et thérapeutiques. Ces données étendent nos résultats antérieurs dans des expériences menées à l'aide de NP/DEC205 (un marqueur qui n'est pas exclusivement exprimé par les DC) et l'OVA utilisé comme antigène de référence ([Macho-Fernandez et al., 2014](#)). Une étude récente a étudié l'effet anti-tumoral de la co-délivrance non ciblée de l' α -GalCer et de l'OVA peptide. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé une formulation liposomale et montré que son effet sur la réponse anti-tumorale est observé uniquement après injection par voie intra veineuse et non par voie sous cutanée ([Neumann et al., 2015](#)). Les APC étant différentes dans ces deux tissus, il est possible que la prise en charge des liposomes par les APC de la rate (non spécifique) soit plus efficace et conduisent à une meilleure activation des iNKT. Dans notre étude, les NPs sont injectées par voie sc, ce qui conduit à une protection contre le développement tumoral. Ces résultats suggèrent fortement que le site d'injection et le type de vaccin (liposome, non ciblé et NP/Clec-9A, ciblage actif) sont importants.

L'induction d'une immunité adaptative durable est essentielle pour l'efficacité des vaccins. Sans addition d'adjuvants, les vaccins sont moins susceptibles de déclencher des signaux immunitaires innés conduisant à des réponses adaptatives de moindre qualité. Par conséquent, le choix de l'adjuvant est une étape fondamentale dans le «design» de vaccin. Dölen Y *et al* ont montré que des NP PLGA (OVA+ α -GalCer) induisent une réponse CTL spécifique du peptide SIINFEKL supérieure à la réponse induite par les NP PLGA (OVA + TLR ligands par exemple :

R848 et poly I : C) avec une réponse anti-tumorale plus efficace dans le modèle de mélanome murin B16.OVA (Dölen et al., 2015). Ceci confirme l'intérêt du choix de l' α -GalCer comme adjuvant. Plusieurs études indiquent néanmoins que l' α -GalCer et les agonistes des TLR peuvent coopérer pour favoriser la maturation des DC et l'activation des cellules T (Coelho-Dos-Reis et al., 2016; Corgnac et al., 2014; Dong et al., 2016; Hermans et al., 2007). A l'avenir, nous pourrions envisager de co-encapsuler dans les NP/Clec9a de l' α -GalCer et un agoniste TLR pour obtenir un effet additif ou synergique et renforcer la réponse immunitaire anti-tumorale. Le choix du TLR reste à faire et nous pourrions opter pour un TLR exprimé par les DC CD8 α^+ .

Après avoir validé notre formulation dans un modèle tumoral avec un antigène contrôle, nous avons par la suite étudié le rôle « helper » des cellules iNKT dans la rupture de la tolérance contre les auto-antigènes tumoraux. Pour ce faire, deux peptides tumoraux (correspondant aux épitopes de lymphocytes T CD8 $^+$ provenant des antigènes de mélanome B16, Trp2 et gp100) ont été incorporés dans les NP/ α -GalCer/Clec9a. Nos résultats montrent une protection contre la croissance tumorale générée chez les souris immunisées par voie sous cutanée avec le NP/ α -GalCer/peptides/Clec9a comparativement aux groupes contrôles.

Nous pensons qu'il serait intéressant de tester nos NP dans des protocoles thérapeutiques plus sévères. Pour cela, nous comptons injecter les formulations à J12 et J19 (à la place de J5 et J12). Il nous semble important d'étudier la capacité de nos NP à retarder le développement de tumeurs plus avancées. Ces résultats pourraient être plus pertinents chez l'homme sachant que les traitements sont souvent faits à des stades avancés du cancer.

D'un point de vue mécanistique, en utilisant des souris déficientes en iNKT (*J α 18 $^{-/-}$*), nous avons montré que le retard dans la croissance tumorale dépendait de la présence des cellules iNKT. De façon intéressante, nous montrons que la déplétion en lymphocytes T CD4 $^+$ n'a pas d'effet sur l'efficacité du vaccin. En effet, le traitement avec l'anticorps anti-CD4 (qui déplete les Th mais aussi les cellules iNKT CD4 $^+$) n'a aucun effet sur le développement tumoral. Nos résultats suggèrent fortement que, dans notre modèle, l'aide des cellules iNKT CD4 $^-$ est suffisante pour retarder la croissance tumorale chez la souris. Une étude faite chez l'homme a montré plutôt un rôle néfaste des iNKT CD4 $^+$ dans le cadre du cancer. En effet, les cellules iNKT CD4 $^+$ ont été décrites chez des patients atteints de cancer primitif hépatocellulaire ou métastatique. Chez ces patients, ces cellules produisent des

niveaux élevés de cytokines de type Th2 et ont une faible activité cytolytique. Elles sont enrichies dans la tumeur et semblent inhiber l'expansion des cellules T CD8⁺ spécifiques de l'antigène, suggérant que ces cellules peuvent activement participer au microenvironnement immunosuppresseur de la tumeur (Bricard et al., 2009).

Afin d'étudier le rôle des CTL dans les effets anti-tumoraux générés par les NP/Clec9a, les lymphocytes T CD8⁺ ont été déplétés à l'aide d'un anticorps anti CD8 β . Nous avons volontairement choisi cet anticorps, et non un anti CD8 α , afin de ne pas dépléter les DC CD8 α ⁺. La déplétion des lymphocytes T CD8⁺ par traitement avec cet anticorps abroge l'effet anti-tumoral du vaccin. L'analyse du recrutement cellulaire au sein des tumeurs des souris vaccinées a révélé des résultats intéressants. En effet, l'effet anti-tumoral est corrélé à un rapport lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du Trp2/cellules T CD25⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ infiltrant les tumeurs supérieur chez les animaux protégés et vaccinés avec NP/Trp2/gp100/ α -GalCer/Clec9a, comparativement aux groupes témoins. Il a été montré qu'un faible rapport T CD8⁺/Treg infiltrant les tumeurs, dans le cancer du col de l'utérus, était un facteur de pronostic défavorable important (Jordanova et al., 2008). A l'inverse, un rapport élevé de T CD8⁺/Treg est associé à un pronostic favorable chez les patients atteints d'un cancer de l'ovaire épithélial (Knutson et al., 2015; Sato et al., 2005). Il sera intéressant à l'avenir d'analyser d'autres populations cellulaires au sein des tumeurs comme les DC et les populations cellulaires à potentiel immunosuppresseur comme les macrophages de type M2, les MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) et les cellules productrices d'IL-10.

L'immunothérapie combinée a montré une efficacité accrue dans le traitement du cancer. Les inhibiteurs du point de contrôle immunitaire (appelé «check-point»), y compris les anticorps anti-CTLA4 et anti-PD-1/PD-L1, se sont révélés efficaces dans certains cancers, notamment le mélanome (Sharma and Allison, 2015). Cet effet est corrélé à un recrutement accru des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des antigènes tumoraux au sein des tumeurs et, à l'inverse, à une diminution des cellules T CD25⁺ CD4⁺ Foxp3⁺. L'immunothérapie combinée pourrait donc optimiser l'efficacité de notre formulation vaccinale. En effet, nos travaux préliminaires suggèrent une meilleure efficacité d'une combinaison vaccin et anticorps anti-PD1 par rapport au vaccin seul. Il sera intéressant de confirmer ce résultat et d'analyser l'infiltrat cellulaire au sein des tumeurs.

En outre, une étude récente a montré que la présence des cDC1 est essentielle pour l'effet thérapeutique des mAbs immunorégulants. Les auteurs ont indiqué que l'efficacité antitumorale des mAbs anti-CD137 et anti-PD-1, utilisés seuls ou en combinaison, a été supprimée chez les souris *Batf3*^{-/-} par rapport aux WT ([Sánchez-Paulete et al., 2016](#)). Les DC dépendantes de *Batf3* ont été identifiées dans l'environnement de la tumeur, où elles sont fonctionnelles et ont même une signification pronostique positive ([Broz et al., 2014](#)). Ces DC capturent des débris de cellules tumorales pour une présentation croisée en CMH de classe I et induisent une réponse CTL. Ces CTL augmentent l'expression de surface de CD137 et PD-1, ce qui en fait des cibles appropriées pour les mAb immunorégulants. Le ciblage des DC intratumorales par notre formulation, en injectant les NP dans les tumeurs, combinée avec les mAb immunorégulants pourrait favoriser la réponse anti-tumorale des CTL.

Bien que les DC CD8 α ⁺ soient spécialisées dans la présentation croisée d'antigène et la réponse à médiation cellulaire, il serait intéressant d'étudier les conséquences du ciblage de l' α -GalCer via les NP/Clec9A sur la réponse humorale. L'activation des iNKT conduit également à la transactivation des lymphocytes B et pourrait dans notre modèle impacter aussi la production d'anticorps par ces cellules.

Étant donné que la sous-population DC CD141⁺ a été identifiée comme l'équivalent fonctionnel des DC CD8⁺ murines, notre stratégie de ciblage peut être applicable chez l'homme.

4 - L'effet de cibler l'adjuvant et l'Ag dans les BDCA3 humaines :

Les DC humaine dérivées *in vitro* de monocytes ou de progéniteurs CD34⁺ ont été largement utilisées pour étudier la biologie de DC. Les cultures de progéniteurs CD34⁺ avec le ligand FLT3 (FLT3-L) ou la thrombopoïétine (TPO) ont été rapportées pour produire les pDC, les DC CD141⁺ CLEC9A⁺ ou encore les CD1c⁺ DC ([Chen et al., 2004](#); [Poulin et al., 2010](#); [Proietto et al., 2012](#)). Les DC générées dans ces cultures ont un phénotype comparable aux DC présentes dans le sang humain.

Dans un premier temps, nous avons donc généré des DC BDCA3⁺ *in vitro* à partir de cellules de progéniteurs hématopoïétiques du sang de cordon ombilical. Leur génération s'effectue en deux étapes: dans la première étape, les HSC/HPC (Hematopoietic stem/progenitor cells) ont été amplifiés en présence de SCF, Flt3L, IL-3 et TPO. Les cellules obtenues sont ensuite été différenciées pour générer des

DC BDCA3⁺. Pour cela, le Flt3L a été inclus dans le «cocktail» de différenciation car les DC BDCA3⁺ se développent chez l'homme, en présence de Flt3L (Galibert et al., 2005). Nous avons aussi utilisé le GM-CSF et IL-4, car ces cytokines ont été utilisées pour générer des DC chez la souris et l'homme. Le SCF a été ajouté pour maintenir la viabilité des HSC/HPC. De façon importante, le SR1 (StemRegenin 1, inhibiteur du récepteur d'hydrocarbure aryl (AhR)) a été utilisé pour augmenter le rendement de DC BDCA3⁺ (Thordardottir et al., 2014). Plusieurs sous-populations de DC (y compris CD11c^{low} BDCA3⁺, représentant environ 35% des DC totales, CD11c^{med} BDCA3⁺ et CD11c^{hi} BDCA3⁺) ont été obtenues à la fin de la procédure de différenciation. L'analyse en cytométrie de flux a montré que la sous-population de DC CD11c^{low} BDCA3⁺ était la seule à exprimer CLEC9A. De façon intéressante, nous avons montré *in vitro*, en utilisant des NP/CLEC9A fluorescentes, un ciblage des DC BDCA3⁺, bien que celles-ci incorporent également faiblement les NP/IgG. Une étude du ciblage *in vivo* des DC BDCA3 par les NP/Clec9A serait également très intéressante à réaliser. Nous pourrions envisager d'utiliser un modèle de souris humanisée (huNSG-A2) reconstituée avec des cellules sanguines de cordon CD34⁺ pour permettre le développement des DC, des monocytes et les cellules du système immunitaire adaptatif (Ding et al., 2014). Cette expérience sera prochainement réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Tsujii à New York.

Le ciblage de la molécule CLEC9A, une cible prometteuse pour l'immunothérapie du cancer, a plusieurs avantages. L'un de ces avantages est que l'interaction de CLEC9A avec des anticorps anti-CLEC9A n'induit pas une maturation phénotypique ou une production de cytokines par les DC BDCA3⁺. Il a été démontré que le ciblage de CLEC9A en présence aux ligands de TLR3 et TLR7/8 n'affecte pas l'expression induite des marqueurs de maturation ou la sécrétion de cytokines et de chimiokines (Schreibelt et al., 2012). Plusieurs autres CLR (C-type lectin receptors), comme BDCA2, DCIR et DEC205, influencent l'état de maturation des DC en modulant l'expression génique induite par un TLR (Dzionek et al., 2001; Geijtenbeek and Gringhuis, 2009; Meyer-Wentrup et al., 2008, 2009; Tel et al., 2011). Ainsi, la spécificité élevée des anticorps anti-CLEC9A pour les DC BDCA3⁺ et la faible fréquence de ces cellules pourraient également conduire à une présentation prolongée de l'antigène chez l'homme.

Le ciblage de l' α -GalCer aux DC BDCA3⁺ CLEC9A⁺ humaines entraîne une forte réponse des cellules iNKT *in vitro*. L'induction de l'activation des cellules iNKT productrices d'IFN- γ favorise les réponses des lymphocytes T cytotoxiques

spécifiques de l'antigène MART-1₂₆₋₃₅, *ex vivo*, chez les patients atteints de mélanome (Moreno et al., 2008). L'expansion *ex vivo* ou *in vivo* de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène tumoral est un objectif important dans l'immunothérapie contre le cancer. Afin de détecter l'impact potentiel du ciblage de DC BDCA3⁺ sur l'activation *in vitro* des lymphocytes T CD8⁺, les PBMC provenant de donneurs HLA-A2⁺ sains ont été cultivés avec l' α -GalCer et un peptide antigénique de Melan A₁₈₋₃₅. Bien que le niveau de réponse varie d'un donneur à l'autre, pour certains donneurs, l' α -GalCer et Melan A₁₈₋₃₅ encapsulés dans les NP/CLEC9A ont fortement favorisé l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'Ag par rapport à d'autres groupes. A 14 jours de culture, la plupart des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de Melan-A présentaient un phénotype de mémoire effectrice (CD45RA⁻CCR7⁻). Nos résultats sont compatibles avec l'étude menée par Speiser DE *et al* en analysant les réponses des cellules T CD8⁺ humaines suite à la vaccination avec un peptide (Melan A₂₆₋₃₅) et CpG 7909. Ils ont démontré qu'après 4 vaccinations *in vivo* chez les patients atteints de mélanomes, la plupart des lymphocytes T spécifiques de Melan-A exprime un phénotype de cellule mémoire effecteur (CD45RA⁻CCR7⁻; représentaient 82% \pm 13% des cellules T Mélan-A⁺ multimer⁺ et expriment les ARNm du granzyme B et de la perforine). Les cellules T naïves mémoires centrales et effecteurs s'expandant faiblement dans ce système (Speiser et al., 2005).

La stimulation des DC BDCA3⁺ avec le poly I:C conduit également à la présentation croisée des antigènes (Jongbloed et al., 2010). Tout comme nous l'avons discuté chez la souris, afin d'obtenir une réponse CTL efficace, la co-administration de l' α -GalCer avec le poly I:C dans notre modèle de vectorisation pourrait renforcer la réponse des lymphocytes T CD8⁺ spécifique de l'Ag co-délivré.

La faible fréquence des cellules iNKT dans le sang des patients atteints de cancer est un obstacle majeur dans la thérapie anti-tumorale à base de cellules iNKT (Molling et al., 2005; Tahir et al., 2001). Cependant différents moyens pour contourner ce problème sont en cours de développement. Le transfert de cellules iNKT autologues, après expansion *ex vivo*, semble être une stratégie fiable pour améliorer les réponses anticancéreuses basées sur des cellules iNKT (Yamasaki et al., 2011). Cependant, cette approche reste coûteuse et laborieuse. Notre formulation est capable d'expandre *in vitro* les iNKT en parallèle des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du Melan A. Cela est en faveur de l'utilisation de notre vaccin chez l'homme afin d'accroître l'efficacité de la réponse immunitaire innée et adaptative contre les maladies malignes.

L'expansion réduite des cellules iNKT10 observée chez les souris vaccinées avec les NP/Clec9a pourrait contribuer aux effets antitumoraux observés chez la souris. Aucune étude n'a rapporté l'existence de iNKT10 chez l'homme, suite à l'injection répétée d' α -GalCer. Compte tenu de cette observation, nous pensons qu'il sera important d'étudier les iNKT10 chez l'homme et d'analyser l'effet de nos NPs sur l'expansion de NKT10 humaines.

Une validation de nos NPs *in vivo* chez les souris humanisées serait un plus. Une étude de l'expansion et du phénotype des cellules iNKT et des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au Melan A, deux semaines après l'injection de nos NPs (chez des souris reconstituées), pourrait être envisagée. L'étude de la réponse anti-tumorale contre des xénogreffes dérivées de tumeurs de patients implantées chez ces souris pourrait également être réalisée. Cependant, le développement d'un modèle de souris humanisée demande du temps et surtout nécessite d'être optimisé pour être sûre que toutes les populations cellulaires se développent correctement, notamment les iNKT, les sous populations de DC et les lymphocytes T. Comme mentionné plus haut, une étude pourrait être menée (souris humanisée) en collaboration avec le Dr Tsujii afin de valider la preuve du concept de l'utilisation future de notre formulation vaccinale chez l'homme. De la même manière, nos résultats prometteurs pourraient être étendus à d'autres types de cancer, notamment le cancer du poumon et du pancréas qui sont difficilement curables à l'heure actuelle. Cette étude pourrait être réalisée dans le cadre de collaboration à la fois chez l'homme (à partir de PBMCs de patients) et dans des modèles expérimentaux adaptés.

Conclusion générale

Les cellules iNKT ont été décrites par de nombreux chercheurs comme une cible immuno-thérapeutique critique avec un fort potentiel anti-tumoral.

Pendant notre thèse, nous avons choisi de développer une stratégie expérimentale pour optimiser la réponse CTL, en exploitant le potentiel adjuvant (helper) des cellules iNKT. Pour ce faire, nous avons choisi l'immuno-thérapie ciblée en utilisant des NP armées avec l'anti-Clec9a pour cibler la sous-population de DC CD8 α ⁺ connues pour activer les cellules iNKT et induire de fortes réponses CTL. Nos résultats montrent l'efficacité de la formulation à abroger la tolérance contre les auto-antigènes tumoraux et à amplifier la réponse CTL chez la souris et chez l'homme. Nos études pré-cliniques chez la souris nous ont également apportés des résultats

très prometteurs. Nos données mettent en évidence les avantages potentiels de la délivrance d'antigènes tumoraux et de l' α -GalCer dans les DC spécialisées dans la présentation croisée. Une des perspectives importantes de notre travail serait de poursuivre notre étude chez l'homme afin de pouvoir envisager, à plus long terme, d'utiliser ce type d'immunothérapie ciblée dans le cadre du cancer.

Bibliographie

Bibliographie

- Akbari, Omid, Philippe Stock, Everett Meyer, Mitchell Kronenberg, Stephane Sidobre, Toshinori Nakayama, Masaru Taniguchi, Michael J. Grusby, Rosemarie H. DeKruyff, et Dale T. Umetsu. « Essential Role of NKT Cells Producing IL-4 and IL-13 in the Development of Allergen-Induced Airway Hyperreactivity ». *Nature Medicine* 9, n° 5 (mai 2003): 582-88. doi:10.1038/nm851.
- Albacker, Lee A., Vinod Chaudhary, Ya-Jen Chang, Hye Young Kim, Ya-Ting Chuang, Muriel Pichavant, Rosemarie H. DeKruyff, Paul B. Savage, et Dale T. Umetsu. « Invariant Natural Killer T Cells Recognize a Fungal Glycosphingolipid That Can Induce Airway Hyperreactivity ». *Nature Medicine* 19, n° 10 (octobre 2013): 1297-1304. doi:10.1038/nm.3321.
- Ambrosino, Elena, Jay A. Berzofsky, et Masaki Terabe. « Regulation of Tumor Immunity: The Role of NKT Cells ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 8, n° 6 (juin 2008): 725-34. doi:10.1517/14712598.8.6.725.
- Ambrosino, Elena, Masaki Terabe, Ramesh C. Halder, Judy Peng, Shun Takaku, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura, Vipin Kumar, et Jay A. Berzofsky. « Cross-Regulation between Type I and Type II NKT Cells in Regulating Tumor Immunity: A New Immunoregulatory Axis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179, n° 8 (15 octobre 2007): 5126-36.
- Amprey, Joseph L., Gerald F. Späth, et Steven A. Porcelli. « Inhibition of CD1 Expression in Human Dendritic Cells during Intracellular Infection with *Leishmania Donovanii* ». *Infection and Immunity* 72, n° 1 (janvier 2004): 589-92.
- Anderson, Regan J., Ching-wen Tang, Naomi J. Daniels, Benjamin J. Compton, Colin M. Hayman, Karen A. Johnston, Deborah A. Knight, et al. « A Self-Adjuvanting Vaccine Induces Cytotoxic T Lymphocytes That Suppress Allergy ». *Nature Chemical Biology* 10, n° 11 (novembre 2014): 943-49. doi:10.1038/nchembio.1640.
- Ando, Tatsuya, Hiroyasu Ito, Hirofumi Ohtaki, et Mitsuru Seishima. « Toll-like Receptor Agonists and Alpha-Galactosylceramide Synergistically Enhance the Production of Interferon-Gamma in Murine Splenocytes ». *Scientific Reports* 3 (2013): 2559. doi:10.1038/srep02559.
- Ando, Tatsuya, Hiroyasu Ito, Yuko Arioka, Hideyuki Ogiso, et Mitsuru Seishima. « Combination Therapy with α -Galactosylceramide and a Toll-like Receptor Agonist Exerts an Augmented Suppressive Effect on Lung Tumor Metastasis in a Mouse Model ». *Oncology Reports* 33, n° 2 (février 2015): 826-32. doi:10.3892/or.2014.3634.
- Araki, Manabu, Takayuki Kondo, Jenny E. Gumperz, Michael B. Brenner, Sachiko Miyake, et Takashi Yamamura. « Th2 Bias of CD4+ NKT Cells Derived from Multiple Sclerosis in Remission ». *International Immunology* 15, n° 2 (février 2003): 279-88.
- Arase, H., S. Ono, N. Arase, S. Y. Park, K. Wakizaka, H. Watanabe, H. Ohno, et T. Saito. « Developmental Arrest of NK1.1+ T Cell Antigen Receptor (TCR)-Alpha/Beta+ T Cells and Expansion of NK1.1+ TCR-Gamma/Delta+ T Cell Development in CD3 Zeta-Deficient Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 182, n° 3 (1 septembre 1995): 891-95.
- Araujo, Luiza M., Jean Lefort, Marie-Anne Nahori, Séverine Diem, Ren Zhu, Michel Dy, Maria C. Leite-de-Moraes, J. F. Bach, B. Boris Vargaftig, et André Herbelin. « Exacerbated Th2-Mediated Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in Autoimmune Diabetes-Prone NOD Mice: A Critical Role for CD1d-Dependent NKT Cells ». *European Journal of Immunology* 34, n° 2 (février 2004): 327-35. doi:10.1002/eji.200324151.
- Arora, Pooja, Andres Baena, Karl O. A. Yu, Neeraj K. Saini, Shalu S. Kharkwal, Michael F. Goldberg, Shajo Kunnath-Velayudhan, et al. « A Single Subset of Dendritic Cells

- Controls the Cytokine Bias of Natural Killer T Cell Responses to Diverse Glycolipid Antigens ». *Immunity* 40, n° 1 (16 janvier 2014): 105-16. doi:10.1016/j.immuni.2013.12.004.
- Arora, Pooja, Manjunatha M. Venkataswamy, Andres Baena, Gabriel Bricard, Qian Li, Natacha Veerapen, Rachel Ndonye, et al. « A Rapid Fluorescence-Based Assay for Classification of iNKT Cell Activating Glycolipids ». *Journal of the American Chemical Society* 133, n° 14 (13 avril 2011): 5198-5201. doi:10.1021/ja200070u.
- Arrenberg, Philomena, Igor Maricic, et Vipin Kumar. « Sulfatide-Mediated Activation of Type II Natural Killer T Cells Prevents Hepatic Ischemic Reperfusion Injury in Mice ». *Gastroenterology* 140, n° 2 (février 2011): 646-55. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.003.
- Arrenberg, Philomena, Ramesh Halder, Yang Dai, Igor Maricic, et Vipin Kumar. « Oligoclonality and Innate-like Features in the TCR Repertoire of Type II NKT Cells Reactive to a Beta-Linked Self-Glycolipid ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, n° 24 (15 juin 2010): 10984-89. doi:10.1073/pnas.1000576107.
- Astete, Carlos E., et Cristina M. Sabliov. « Synthesis and Characterization of PLGA Nanoparticles ». *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* 17, n° 3 (2006): 247-89.
- Bachem, Annabell, Steffen Güttler, Evelyn Hartung, Frédéric Ebstein, Michael Schaefer, Astrid Tannert, Abdulgabar Salama, et al. « Superior Antigen Cross-Presentation and XCR1 Expression Define Human CD11c+CD141+ Cells as Homologues of Mouse CD8+ Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 207, n° 6 (7 juin 2010): 1273-81. doi:10.1084/jem.20100348.
- Bachmann, Martin F., and Gary T. Jennings. "Vaccine Delivery: A Matter of Size, Geometry, Kinetics and Molecular Patterns." *Nature Reviews. Immunology* 10, no. 11 (November 2010): 787–96. doi:10.1038/nri2868.
- Baev, Denis V., Xiao-Hui Peng, Liping Song, Jerry R. Barnhart, Gay M. Crooks, Kenneth I. Weinberg, et Leonid S. Metelitsa. « Distinct Homeostatic Requirements of CD4+ and CD4- Subsets of Valpha24-Invariant Natural Killer T Cells in Humans ». *Blood* 104, n° 13 (15 décembre 2004): 4150-56. doi:10.1182/blood-2004-04-1629.
- Banchereau, J., et R. M. Steinman. « Dendritic Cells and the Control of Immunity ». *Nature* 392, n° 6673 (19 mars 1998): 245-52. doi:10.1038/32588.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, et K. Palucka. « Immunobiology of Dendritic Cells ». *Annual Review of Immunology* 18 (2000): 767-811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
- Banovic, Tatjana, Mayonelo Yanilla, Russell Simmons, Ian Robertson, Wayne A. Schroder, Neil C. Raffelt, Yana A. Wilson, Geoffrey R. Hill, Patrick Hogan, et Clare B. Nourse. « Disseminated Varicella Infection Caused by Varicella Vaccine Strain in a Child with Low Invariant Natural Killer T Cells and Diminished CD1d Expression ». *The Journal of Infectious Diseases* 204, n° 12 (15 décembre 2011): 1893-1901. doi:10.1093/infdis/jir660.
- Barral, Patricia, Julia Eckl-Dorna, Naomi E. Harwood, Carmela De Santo, Mariolina Salio, Petr Illarionov, Gurdyal S. Besra, Vincenzo Cerundolo, et Facundo D. Batista. « B Cell Receptor-Mediated Uptake of CD1d-Restricted Antigen Augments Antibody Responses by Recruiting Invariant NKT Cell Help in Vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n° 24 (17 juin 2008): 8345-50. doi:10.1073/pnas.0802968105.
- Barthelemy, A., S. Ivanov, J. Fontaine, D. Soulard, H. Bouabe, C. Paget, C. Faveeuw, et F. Trottein. « Influenza A Virus-Induced Release of Interleukin-10 Inhibits the Anti-Microbial Activities of Invariant Natural Killer T Cells during Invasive Pneumococcal Superinfection ». *Mucosal Immunology* 10, n° 2 (mars 2017): 460-69. doi:10.1038/mi.2016.49.

- Barthelemy, Adeline, Stoyan Ivanov, Maya Hassane, Josette Fontaine, Béatrice Heurtault, Benoit Frisch, Christelle Faveeuw, Christophe Paget, et François Trottein. « Exogenous Activation of Invariant Natural Killer T Cells by α -Galactosylceramide Reduces Pneumococcal Outgrowth and Dissemination Postinfluenza ». *mBio* 7, n° 6 (1 novembre 2016). doi:10.1128/mBio.01440-16.
- Bassiri, Hamid, Rupali Das, Peng Guan, David M. Barrett, Patrick J. Brennan, Pinaki P. Banerjee, Susan J. Wiener, et al. « iNKT Cell Cytotoxic Responses Control T-Lymphoma Growth in Vitro and in Vivo ». *Cancer Immunology Research* 2, n° 1 (janvier 2014): 59-69. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0104.
- Bellone, Matteo, Monica Ceccon, Matteo Grioni, Elena Jachetti, Arianna Calcinotto, Anna Napolitano, Massimo Freschi, Giulia Casorati, et Paolo Dellabona. « iNKT Cells Control Mouse Spontaneous Carcinoma Independently of Tumor-Specific Cytotoxic T Cells ». *PloS One* 5, n° 1 (13 janvier 2010): e8646. doi:10.1371/journal.pone.0008646.
- Ben-Menachem, Gil, Joanna Kubler-Kielb, Bruce Coxon, Alfred Yergey, et Rachel Schneerson. « A Newly Discovered Cholesteryl Galactoside from *Borrelia burgdorferi* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, n° 13 (24 juin 2003): 7913-18. doi:10.1073/pnas.1232451100.
- Bendelac, A. « Positive Selection of Mouse NK1+ T Cells by CD1-Expressing Cortical Thymocytes ». *The Journal of Experimental Medicine* 182, n° 6 (1 décembre 1995): 2091-96.
- Bendelac, Albert, Paul B. Savage, et Luc Teyton. « The Biology of NKT Cells ». *Annual Review of Immunology* 25 (2007): 297-336. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.
- Benlagha, K., A. Weiss, A. Beavis, L. Teyton, et A. Bendelac. « In Vivo Identification of Glycolipid Antigen-Specific T Cells Using Fluorescent CD1d Tetramers ». *The Journal of Experimental Medicine* 191, n° 11 (5 juin 2000): 1895-1903.
- Benlagha, Kamel, Tim Kyin, Andrew Beavis, Luc Teyton, et Albert Bendelac. « A Thymic Precursor to the NK T Cell Lineage ». *Science (New York, N.Y.)* 296, n° 5567 (19 avril 2002): 553-55.
- Berinstein, Neil L., Mohan Karkada, Michael A. Morse, John J. Nemunaitis, Gurkamal Chatta, Howard Kaufman, Kunle Odunsi, et al. "First-in-Man Application of a Novel Therapeutic Cancer Vaccine Formulation with the Capacity to Induce Multi-Functional T Cell Responses in Ovarian, Breast and Prostate Cancer Patients." *Journal of Translational Medicine* 10 (August 3, 2012): 156. doi:10.1186/1479-5876-10-156.
- Bertholet, Sylvie, Romina Goldszmid, Alexandre Morrot, Alain Debrabant, Farhat Afrin, Carmen Collazo-Custodio, Mathieu Houde, Michel Desjardins, Alan Sher, et David Sacks. « Leishmania Antigens Are Presented to CD8+ T Cells by a Transporter Associated with Antigen Processing-Independent Pathway in Vitro and in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177, n° 6 (15 septembre 2006): 3525-33.
- Berzins, Stuart P., Andrew D. Cochrane, Daniel G. Pellicci, Mark J. Smyth, et Dale I. Godfrey. « Limited Correlation between Human Thymus and Blood NKT Cell Content Revealed by an Ontogeny Study of Paired Tissue Samples ». *European Journal of Immunology* 35, n° 5 (mai 2005): 1399-1407. doi:10.1002/eji.200425958.
- Berzins, Stuart P., Finlay W. McNab, Claerwen M. Jones, Mark J. Smyth, et Dale I. Godfrey. « Long-Term Retention of Mature NK1.1+ NKT Cells in the Thymus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176, n° 7 (1 avril 2006): 4059-65.
- Berzins, Stuart P., Mark J. Smyth, et Alan G. Baxter. « Presumed Guilty: Natural Killer T Cell Defects and Human Disease ». *Nature Reviews. Immunology* 11, n° 2 (février 2011): 131-42. doi:10.1038/nri2904.

- Bezbradica, Jelena S., Aleksandar K. Stanic, Naoto Matsuki, Helene Bour-Jordan, Jeffrey A. Bluestone, James W. Thomas, Derya Unutmaz, Luc Van Kaer, et Sebastian Joyce. « Distinct Roles of Dendritic Cells and B Cells in Va14Ja18 Natural T Cell Activation in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174, n° 8 (15 avril 2005): 4696-4705.
- Bezbradica, Jelena S., Timothy Hill, Aleksandar K. Stanic, Luc Van Kaer, et Sebastian Joyce. « Commitment toward the Natural T (iNKT) Cell Lineage Occurs at the CD4+8+ Stage of Thymic Ontogeny ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n° 14 (5 avril 2005): 5114-19. doi:10.1073/pnas.0408449102.
- Bialecki, Emilie, Christophe Paget, Josette Fontaine, Monique Capron, François Trottein, et Christelle Faveeuw. « Role of Marginal Zone B Lymphocytes in Invariant NKT Cell Activation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 10 (15 mai 2009): 6105-13. doi:10.4049/jimmunol.0802273.
- Birkholz, Alysia M., Enrico Girardi, Gerhard Wingender, Archana Khurana, Jing Wang, Meng Zhao, Sonja Zahner, et al. « A Novel Glycolipid Antigen for NKT Cells That Preferentially Induces IFN- γ Production ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195, n° 3 (1 août 2015): 924-33. doi:10.4049/jimmunol.1500070.
- Bisht, M., S. S. Bist, and D. C. Dhasmana. "Biological Response Modifiers: Current Use and Future Prospects in Cancer Therapy." *Indian Journal of Cancer* 47, no. 4 (December 2010): 443–51. doi:10.4103/0019-509X.73559.
- Black, Matthew, Amanda Trent, Matthew Tirrell, et Colleen Olive. « Advances in the Design and Delivery of Peptide Subunit Vaccines with a Focus on Toll-like Receptor Agonists ». *Expert Review of Vaccines* 9, n° 2 (février 2010): 157-73. doi:10.1586/erv.09.160.
- Blasius, Amanda L., et Bruce Beutler. « Intracellular Toll-like Receptors ». *Immunity* 32, n° 3 (26 mars 2010): 305-15. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.012.
- Bontkes, Hetty J., María Moreno, Basav Hangalapura, Jelle J. Lindenberg, Jan de Groot, Sinéad Loughheed, Hans J. J. van der Vliet, et al. « Attenuation of Invariant Natural Killer T-Cell Anergy Induction through Intradermal Delivery of Alpha-Galactosylceramide ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 136, n° 3 (septembre 2010): 364-74. doi:10.1016/j.clim.2010.04.019.
- Boorn, Jasper G. van den, et Gunther Hartmann. « Turning Tumors into Vaccines: Co-Opting the Innate Immune System ». *Immunity* 39, n° 1 (25 juillet 2013): 27-37. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.011.
- Bosma, Anneleen, Azza Abdel-Gadir, David A. Isenberg, Elizabeth C. Jury, et Claudia Mauri. « Lipid-Antigen Presentation by CD1d(+) B Cells Is Essential for the Maintenance of Invariant Natural Killer T Cells ». *Immunity* 36, n° 3 (23 mars 2012): 477-90. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.008.
- Bourgeois, Elvire, Linh Pham Van, Michel Samson, Séverine Diem, Anne Barra, Stéphane Roga, Jean-Marc Gombert, et al. « The pro-Th2 Cytokine IL-33 Directly Interacts with Invariant NKT and NK Cells to Induce IFN-Gamma Production ». *European Journal of Immunology* 39, n° 4 (avril 2009): 1046-55. doi:10.1002/eji.200838575.
- Brennan, Patrick J., Raju V. V. Tatituri, Christian Heiss, Gerald F. M. Watts, Fong-Fu Hsu, Natacha Veerapen, Liam R. Cox, Parastoo Azadi, Gurdyal S. Besra, et Michael B. Brenner. « Activation of iNKT Cells by a Distinct Constituent of the Endogenous Glucosylceramide Fraction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, n° 37 (16 septembre 2014): 13433-38. doi:10.1073/pnas.1415357111.
- Brennan, Patrick J., Raju V. V. Tatituri, Manfred Brigl, Edy Y. Kim, Amit Tuli, Joseph P. Sanderson, Stephan D. Gadola, Fong-Fu Hsu, Gurdyal S. Besra, et Michael B. Brenner. « Invariant Natural Killer T Cells Recognize Lipid Self Antigen Induced by

- Microbial Danger Signals ». *Nature Immunology* 12, n° 12 (30 octobre 2011): 1202-11. doi:10.1038/ni.2143.
- Bricard, Gabriel, Valerie Cesson, Estelle Devedre, Hanifa Bouzourene, Catherine Barbey, Nathalie Rufer, Jin S. Im, et al. « Enrichment of Human CD4+ V(alpha)24/Vbeta11 Invariant NKT Cells in Intrahepatic Malignant Tumors ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 8 (15 avril 2009): 5140-51. doi:10.4049/jimmunol.0711086.
- Brigl, Manfred, Lynn Bry, Sally C. Kent, Jenny E. Gumperz, et Michael B. Brenner. « Mechanism of CD1d-Restricted Natural Killer T Cell Activation during Microbial Infection ». *Nature Immunology* 4, n° 12 (décembre 2003): 1230-37. doi:10.1038/ni1002.
- Brigl, Manfred, Raju V. V. Tatituri, Gerald F. M. Watts, Veemal Bhowruth, Elizabeth A. Leadbetter, Nathaniel Barton, Nadia R. Cohen, Fong-Fu Hsu, Gurdyal S. Besra, et Michael B. Brenner. « Innate and Cytokine-Driven Signals, rather than Microbial Antigens, Dominate in Natural Killer T Cell Activation during Microbial Infection ». *The Journal of Experimental Medicine* 208, n° 6 (6 juin 2011): 1163-77. doi:10.1084/jem.20102555.
- Brossay, L., D. Jullien, S. Cardell, B. C. Sydora, N. Burdin, R. L. Modlin, et M. Kronenberg. « Mouse CD1 Is Mainly Expressed on Hemopoietic-Derived Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159, n° 3 (1 août 1997): 1216-24.
- Broz, Miranda L., Mikhail Binnewies, Bijan Boldajipour, Amanda E. Nelson, Joshua L. Pollack, David J. Erle, Andrea Barczak, et al. « Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity ». *Cancer Cell* 26, n° 5 (10 novembre 2014): 638-52. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.007.
- Brutkiewicz, Randy R. « CD1d Ligands: The Good, the Bad, and the Ugly ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177, n° 2 (15 juillet 2006): 769-75.
- Burgdorf, Sven, Christian Schölz, Andreas Kautz, Robert Tampé, et Christian Kurts. « Spatial and Mechanistic Separation of Cross-Presentation and Endogenous Antigen Presentation ». *Nature Immunology* 9, n° 5 (mai 2008): 558-66. doi:10.1038/ni.1601.
- Caminschi, Irina, Anna I. Proietto, Fatma Ahmet, Susie Kitsoulis, Joo Shin Teh, Jennifer C. Y. Lo, Alexandra Rizzitelli, et al. « The Dendritic Cell Subtype-Restricted C-Type Lectin Clec9A Is a Target for Vaccine Enhancement ». *Blood* 112, n° 8 (15 octobre 2008): 3264-73. doi:10.1182/blood-2008-05-155176.
- Carreño, Leandro J., Noemí A. Saavedra-Ávila, et Steven A. Porcelli. « Synthetic Glycolipid Activators of Natural Killer T Cells as Immunotherapeutic Agents ». *Clinical & Translational Immunology* 5, n° 4 (avril 2016): e69. doi:10.1038/cti.2016.14.
- Castellino, Flora, Alex Y. Huang, Grégoire Altan-Bonnet, Sabine Stoll, Clemens Scheinecker, et Ronald N. Germain. « Chemokines Enhance Immunity by Guiding Naive CD8+ T Cells to Sites of CD4+ T Cell-Dendritic Cell Interaction ». *Nature* 440, n° 7086 (13 avril 2006): 890-95. doi:10.1038/nature04651.
- Cervantes-Barragan, Luisa, Kanako L. Lewis, Sonja Firner, Volker Thiel, Stephanie Hugues, Walter Reith, Burkhard Ludewig, et Boris Reizis. « Plasmacytoid Dendritic Cells Control T-Cell Response to Chronic Viral Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, n° 8 (21 février 2012): 3012-17. doi:10.1073/pnas.1117359109.
- Chan, A. C., L. Serwecinska, A. Cochrane, L. C. Harrison, D. I. Godfrey, et S. P. Berzins. « Immune Characterization of an Individual with an Exceptionally High Natural Killer T Cell Frequency and Her Immediate Family ». *Clinical and Experimental Immunology* 156, n° 2 (mai 2009): 238-45. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03888.x.
- Chan, A. C., P. Neeson, E. Leeansyah, K. Tainton, H. Quach, H. M. Prince, D. I. Godfrey, D. Ritchie, et S. P. Berzins. « Testing the NKT Cell Hypothesis in Lenalidomide-

- Treated Myelodysplastic Syndrome Patients ». *Leukemia* 24, n° 3 (mars 2010): 592-600. doi:10.1038/leu.2009.279.
- Chan, G., T. Hanke, et K. D. Fischer. « Vav-1 Regulates NK T Cell Development and NK Cell Cytotoxicity ». *European Journal of Immunology* 31, n° 8 (août 2001): 2403-10. doi:10.1002/1521-4141(200108)31:8<2403::AID-IMMU2403>3.0.CO;2-O.
- Chang, David H., Haiteng Deng, Phillip Matthews, Joseph Krasovsky, Govind Ragupathi, Radek Spisek, Amitabha Mazumder, David H. Vesole, Sundar Jagannath, et Madhav V. Dhodapkar. « Inflammation-Associated Lysophospholipids as Ligands for CD1d-Restricted T Cells in Human Cancer ». *Blood* 112, n° 4 (15 août 2008): 1308-16. doi:10.1182/blood-2008-04-149831.
- Chang, David H., Keren Osman, John Connolly, Anjli Kukreja, Joseph Krasovsky, Maggi Pack, Aisha Hutchinson, et al. « Sustained Expansion of NKT Cells and Antigen-Specific T Cells after Injection of Alpha-Galactosyl-Ceramide Loaded Mature Dendritic Cells in Cancer Patients ». *The Journal of Experimental Medicine* 201, n° 9 (2 mai 2005): 1503-17. doi:10.1084/jem.20042592.
- Chang, David H., Nancy Liu, Virginia Klimek, Hani Hassoun, Amitabha Mazumder, Stephen D. Nimer, Sundar Jagannath, et Madhav V. Dhodapkar. « Enhancement of Ligand-Dependent Activation of Human Natural Killer T Cells by Lenalidomide: Therapeutic Implications ». *Blood* 108, n° 2 (15 juillet 2006): 618-21. doi:10.1182/blood-2005-10-4184.
- Chang, Pheh-Ping, Patricia Barral, Jessica Fitch, Alvin Pratama, Cindy S. Ma, Axel Kallies, Jennifer J. Hogan, et al. « Identification of Bcl-6-Dependent Follicular Helper NKT Cells That Provide Cognate Help for B Cell Responses ». *Nature Immunology* 13, n° 1 (27 novembre 2011): 35-43. doi:10.1038/ni.2166.
- Chang, Ya-Jen, Hye Young Kim, Lee A. Albacker, Hyun Hee Lee, Nicole Baumgarth, Shizuo Akira, Paul B. Savage, et al. « Influenza Infection in Suckling Mice Expands an NKT Cell Subset That Protects against Airway Hyperreactivity ». *The Journal of Clinical Investigation* 121, n° 1 (janvier 2011): 57-69. doi:10.1172/JCI44845.
- Chen, Daniel S., and Ira Mellman. "Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle." *Immunity* 39, no. 1 (July 25, 2013): 1–10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- Chen, Mingshui, Haichao Ouyang, Shangyong Zhou, Jieyu Li, and Yunbin Ye. "PLGA-Nanoparticle Mediated Delivery of Anti-OX40 Monoclonal Antibody Enhances Anti-Tumor Cytotoxic T Cell Responses." *Cellular Immunology* 287, no. 2 (February 2014): 91–99. doi:10.1016/j.cellimm.2014.01.003.
- Chen, Wei, Svetlana Antonenko, Joel M. Sederstrom, Xueqing Liang, Anissa S. H. Chan, Holger Kanzler, Bianca Blom, Bruce R. Blazar, et Yong-Jun Liu. « Thrombopoietin Cooperates with FLT3-Ligand in the Generation of Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors from Human Hematopoietic Progenitors ». *Blood* 103, n° 7 (1 avril 2004): 2547-53. doi:10.1182/blood-2003-09-3058.
- Chiba, Asako, Christopher C. Dascher, Gurdal S. Besra, et Michael B. Brenner. « Rapid NKT Cell Responses Are Self-Terminating during the Course of Microbial Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181, n° 4 (15 août 2008): 2292-2302.
- Choi, Youn Seok, Talia Hoory, Archana Monie, Annie Wu, Denise Connolly, et Chien-Fu Hung. « Alpha-Galactosylceramide Enhances the Protective and Therapeutic Effects of Tumor Cell Based Vaccines for Ovarian Tumors ». *Vaccine* 26, n° 46 (29 octobre 2008): 5855-63. doi:10.1016/j.vaccine.2008.08.027.
- Christiansen, Dale, Julie Milland, Effie Mouhtouris, Hilary Vaughan, Daniel G. Pellicci, Malcolm J. McConville, Dale I. Godfrey, et Mauro S. Sandrin. « Humans Lack iGb3 due to the Absence of Functional iGb3-Synthase: Implications for NKT Cell Development and Transplantation ». *PLoS Biology* 6, n° 7 (15 juillet 2008): e172. doi:10.1371/journal.pbio.0060172.
- Chun, Taehoon, Michael J. Page, Laurent Gapin, Jennifer L. Matsuda, Honglin Xu, Hanh Nguyen, Hyung-Sik Kang, et al. « CD1d-Expressing Dendritic Cells but Not Thymic

- Epithelial Cells Can Mediate Negative Selection of NKT Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 197, n° 7 (7 avril 2003): 907-18. doi:10.1084/jem.20021366.
- Chung, Yeonseok, Hong Qin, Chang-Yuil Kang, Sanghee Kim, Larry W. Kwak, et Chen Dong. « An NKT-Mediated Autologous Vaccine Generates CD4 T-Cell Dependent Potent Antilymphoma Immunity ». *Blood* 110, n° 6 (15 septembre 2007): 2013-19. doi:10.1182/blood-2006-12-061309.
- Cisse, Babacar, Michele L. Caton, Manfred Lehner, Takahiro Maeda, Stefanie Scheu, Richard Locksley, Dan Holmberg, et al. « Transcription Factor E2-2 Is an Essential and Specific Regulator of Plasmacytoid Dendritic Cell Development ». *Cell* 135, n° 1 (3 octobre 2008): 37-48. doi:10.1016/j.cell.2008.09.016.
- Coelho-Dos-Reis, Jordana G., Jing Huang, Tiffany Tsao, Felipe V. Pereira, Ryota Funakoshi, Hiroko Nakajima, Haruo Sugiyama, et Moriya Tsuji. « Co-Administration of α -GalCer Analog and TLR4 Agonist Induces Robust CD8(+) T-Cell Responses to PyCS Protein and WT-1 Antigen and Activates Memory-like Effector NKT Cells ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 168 (2016): 6-15. doi:10.1016/j.clim.2016.04.014.
- Cohen, Nadia R., Raju V. V. Tatituri, Amariliz Rivera, Gerald F. M. Watts, Edy Y. Kim, Asako Chiba, Beth B. Fuchs, et al. « Innate Recognition of Cell Wall β -Glucans Drives Invariant Natural Killer T Cell Responses against Fungi ». *Cell Host & Microbe* 10, n° 5 (17 novembre 2011): 437-50. doi:10.1016/j.chom.2011.09.011.
- Coles, M. C., et D. H. Raulet. « NK1.1+ T Cells in the Liver Arise in the Thymus and Are Selected by Interactions with Class I Molecules on CD4+CD8+ Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164, n° 5 (1 mars 2000): 2412-18.
- Constantinides, Michael G., et Albert Bendelac. « Transcriptional Regulation of the NKT Cell Lineage ». *Current Opinion in Immunology* 25, n° 2 (avril 2013): 161-67. doi:10.1016/j.coi.2013.01.003.
- Cools, Nathalie, Peter Ponsaerts, Viggo F. I. Van Tendeloo, et Zwi N. Berneman. « Balancing between Immunity and Tolerance: An Interplay between Dendritic Cells, Regulatory T Cells, and Effector T Cells ». *Journal of Leukocyte Biology* 82, n° 6 (décembre 2007): 1365-74. doi:10.1189/jlb.0307166.
- Coquet, Jonathan M., Sumone Chakravarti, Konstantinos Kyparissoudis, Finlay W. McNab, Lauren A. Pitt, Brent S. McKenzie, Stuart P. Berzins, Mark J. Smyth, et Dale I. Godfrey. « Diverse Cytokine Production by NKT Cell Subsets and Identification of an IL-17-Producing CD4-NK1.1- NKT Cell Population ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n° 32 (12 août 2008): 11287-92. doi:10.1073/pnas.0801631105.
- Corgnac, Stéphanie, Rachel Perret, Laurent Derré, Lianjun Zhang, Kathrin Stirnemann, Maurice Zauderer, Daniel E. Speiser, Jean-Pierre Mach, Pedro Romero, et Alena Donda. « CD1d-Antibody Fusion Proteins Target iNKT Cells to the Tumor and Trigger Long-Term Therapeutic Responses ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 62, n° 4 (avril 2013): 747-60. doi:10.1007/s00262-012-1381-7.
- Corgnac, Stéphanie, Rachel Perret, Lianjun Zhang, Jean-Pierre Mach, Pedro Romero, et Alena Donda. « iNKT/CD1d-Antitumor Immunotherapy Significantly Increases the Efficacy of Therapeutic CpG/Peptide-Based Cancer Vaccine ». *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2, n° 1 (2014): 39. doi:10.1186/s40425-014-0039-8.
- Courtney, Amy N., Prakash Thapa, Shailbala Singh, Ameerah M. Wishahy, Dapeng Zhou, et Jagannadha Sastry. « Intranasal but Not Intravenous Delivery of the Adjuvant α -Galactosylceramide Permits Repeated Stimulation of Natural Killer T Cells in the Lung ». *European Journal of Immunology* 41, n° 11 (novembre 2011): 3312-22. doi:10.1002/eji.201041359.
- Crowe, Nadine Y., Adam P. Uldrich, Konstantinos Kyparissoudis, Kirsten J. L. Hammond, Yoshihiro Hayakawa, Stephané Sidobre, Rachael Keating, Mitchell Kronenberg, Mark J. Smyth, et Dale I. Godfrey. « Glycolipid Antigen Drives Rapid Expansion and

- Sustained Cytokine Production by NK T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171, n° 8 (15 octobre 2003): 4020-27.
- Crowe, Nadine Y., Mark J. Smyth, et Dale I. Godfrey. « A Critical Role for Natural Killer T Cells in Immunosurveillance of Methylcholanthrene-Induced Sarcomas ». *The Journal of Experimental Medicine* 196, n° 1 (1 juillet 2002): 119-27.
- Crozat, Karine, Rachel Guiton, Vanessa Contreras, Vincent Feuillet, Charles-Antoine Dutertre, Erwan Ventre, Thien-Phong Vu Manh, et al. « The XC Chemokine Receptor 1 Is a Conserved Selective Marker of Mammalian Cells Homologous to Mouse CD8alpha+ Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 207, n° 6 (7 juin 2010): 1283-92. doi:10.1084/jem.20100223.
- Cruz, Luis J., Paul J. Tacke, Fernando Bonetto, Sonja I. Buschow, Huib J. Croes, Mietske Wijers, I. Jolanda de Vries, et Carl G. Figdor. « Multimodal Imaging of Nanovaccine Carriers Targeted to Human Dendritic Cells ». *Molecular Pharmaceutics* 8, n° 2 (4 avril 2011): 520-31. doi:10.1021/mp100356k.
- Cruz, Luis J., Paul J. Tacke, Remco Fokkink, Ben Joosten, Martien Cohen Stuart, Fernando Albericio, Ruurd Torensma, et Carl G. Figdor. « Targeted PLGA Nano- but Not Microparticles Specifically Deliver Antigen to Human Dendritic Cells via DC-SIGN in Vitro ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 144, n° 2 (1 juin 2010): 118-26. doi:10.1016/j.jconrel.2010.02.013.
- Cruz, Luis J., Rodney A. Rosalia, Jan Willem Kleinovink, Felix Rueda, Clemens W. G. M. Löwik, et Ferry Ossendorp. « Targeting Nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c Molecules on Dendritic Cells for Efficient CD8(+) T Cell Response: A Comparative Study ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 192 (28 octobre 2014): 209-18. doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.040.
- Cui, J., T. Shin, T. Kawano, H. Sato, E. Kondo, I. Taura, Y. Kaneko, H. Koseki, M. Kanno, et M. Taniguchi. « Requirement for Valpha14 NKT Cells in IL-12-Mediated Rejection of Tumors ». *Science (New York, N.Y.)* 278, n° 5343 (28 novembre 1997): 1623-26.
- Danhier, Fabienne, Eduardo Ansorena, Joana M. Silva, Régis Coco, Aude Le Breton, et Véronique Pr at. « PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 161, n° 2 (20 juillet 2012): 505-22. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
- Das, Rupali, Derek B. Sant'Angelo, et Kim E. Nichols. « Transcriptional Control of Invariant NKT Cell Development ». *Immunological Reviews* 238, n° 1 (novembre 2010): 195-215. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00962.x.
- Das, Rupali, Hamid Bassiri, Peng Guan, Susan Wiener, Pinaki P. Banerjee, Ming-Chao Zhong, Andr e Veillette, Jordan S. Orange, et Kim E. Nichols. « The Adaptor Molecule SAP Plays Essential Roles during Invariant NKT Cell Cytotoxicity and Lytic Synapse Formation ». *Blood* 121, n° 17 (25 avril 2013): 3386-95. doi:10.1182/blood-2012-11-468868.
- Dellabona, Paolo, Sergio Abrignani, et Giulia Casorati. « iNKT-Cell Help to B Cells: A Cooperative Job between Innate and Adaptive Immune Responses ». *European Journal of Immunology* 44, n° 8 (août 2014): 2230-37. doi:10.1002/eji.201344399.
- Demento, Stacey L., Alyssa L. Siefert, Arunima Bandyopadhyay, Fiona A. Sharp, et Tarek M. Fahmy. « Pathogen-Associated Molecular Patterns on Biomaterials: A Paradigm for Engineering New Vaccines ». *Trends in Biotechnology* 29, n° 6 (juin 2011): 294-306. doi:10.1016/j.tibtech.2011.02.004.
- Demento, Stacey L., Weiguo Cui, Jason M. Criscione, Eric Stern, Jacob Tulipan, Susan M. Kaech, et Tarek M. Fahmy. « Role of Sustained Antigen Release from Nanoparticle Vaccines in Shaping the T Cell Memory Phenotype ». *Biomaterials* 33, n° 19 (juin 2012): 4957-64. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.041.
- Dhodapkar, Madhav V., Matthew D. Geller, David H. Chang, Kanako Shimizu, Shin-Ichiro Fujii, Kavita M. Dhodapkar, et Joseph Krasovsky. « A Reversible Defect in Natural

- Killer T Cell Function Characterizes the Progression of Premalignant to Malignant Multiple Myeloma ». *The Journal of Experimental Medicine* 197, n° 12 (16 juin 2003): 1667-76. doi:10.1084/jem.20021650.
- Ding, Yitian, Andrew Wilkinson, Adi Idris, Ben Fancke, Meredith O’Keeffe, Dalia Khalil, Xinsheng Ju, et al. « FLT3-Ligand Treatment of Humanized Mice Results in the Generation of Large Numbers of CD141+ and CD1c+ Dendritic Cells in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192, n° 4 (15 février 2014): 1982-89. doi:10.4049/jimmunol.1302391.
- Doisne, Jean-Marc, Chantal Becourt, Latiffa Amniai, Nadia Duarte, Jean-Benoît Le Luduec, Gérard Eberl, et Kamel Benlagha. « Skin and Peripheral Lymph Node Invariant NKT Cells Are Mainly Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor (Gamma)t+ and Respond Preferentially under Inflammatory Conditions ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183, n° 3 (1 août 2009): 2142-49. doi:10.4049/jimmunol.0901059.
- Dölen, Yusuf, Martin Kreuzt, Uzi Gileadi, Jurjen Tel, Angela Vasaturo, Eric A. W. van Dinther, Maaïke A. van Hout-Kuijter, Vincenzo Cerundolo, et Carl G. Figdor. « Co-delivery of PLGA encapsulated invariant NKT cell agonist with antigenic protein induce strong T cell-mediated antitumor immune responses ». *Oncoimmunology* 5, n° 1 (12 août 2015). doi:10.1080/2162402X.2015.1068493.
- Dong, Tiangeng, Tuo Yi, Mengxuan Yang, Shengli Lin, Wenxiang Li, Xingyuan Xu, Jianwei Hu, Lijun Jia, Xinqiang Hong, et Weixin Niu. « Co-Operation of α -Galactosylceramide-Loaded Tumour Cells and TLR9 Agonists Induce Potent Anti-Tumour Responses in a Murine Colon Cancer Model ». *The Biochemical Journal* 473, n° 1 (1 janvier 2016): 7-19. doi:10.1042/BJ20150129.
- Dorner, Brigitte G., Martin B. Dorner, Xuefei Zhou, Corinna Opitz, Ahmed Mora, Steffen Güttler, Andreas Hutloff, et al. « Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-Presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells ». *Immunity* 31, n° 5 (20 novembre 2009): 823-33. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.027.
- Dougan, S. K., A. Kaser, et R. S. Blumberg. « CD1 Expression on Antigen-Presenting Cells ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 314 (2007): 113-41.
- Drake, Charles G. “Immunotherapy for Prostate Cancer: Walk, Don’t Run.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, no. 25 (September 1, 2009): 4035–37. doi:10.1200/JCO.2009.22.2299.
- Drake, Charles G., Elizabeth Jaffee, and Drew M. Pardoll. “Mechanisms of Immune Evasion by Tumors.” In *Advances in Immunology*, 90:51–81. Elsevier, 2006. doi:10.1016/S0065-2776(06)90002-9.
- Drennan, Michael B., Ann-Sophie Franki, Pieter Dewint, Katrien Van Beneden, Sylvie Seeuws, Serge A. van de Pavert, Emma C. Reilly, et al. « Cutting Edge: The Chemokine Receptor CXCR3 Retains Invariant NK T Cells in the Thymus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183, n° 4 (15 août 2009): 2213-16. doi:10.4049/jimmunol.0901213.
- Dudziak, Diana, Alice O. Kamphorst, Gordon F. Heidkamp, Veit R. Buchholz, Christine Trumpheller, Sayuri Yamazaki, Cheolho Cheong, et al. « Differential Antigen Processing by Dendritic Cell Subsets in Vivo ». *Science (New York, N.Y.)* 315, n° 5808 (5 janvier 2007): 107-11. doi:10.1126/science.1136080.
- Durant, Lydia R., Catherine Pereira, Aime Boakye, Spyridon Makris, Fahima Kausar, Michelle Goritzka, et Cecilia Johansson. « DNGR-1 Is Dispensable for CD8+ T-Cell Priming during Respiratory Syncytial Virus Infection ». *European Journal of Immunology* 44, n° 8 (août 2014): 2340-48. doi:10.1002/eji.201444454.
- Duthie, Malcolm S., Maria Kahn, Maria White, Raj P. Kapur, et Stuart J. Kahn. « Both CD1d Antigen Presentation and Interleukin-12 Are Required to Activate Natural Killer

- T Cells during Trypanosoma Cruzi Infection ». *Infection and Immunity* 73, n° 3 (mars 2005): 1890-94. doi:10.1128/IAI.73.3.1890-1894.2005.
- Dzionic, A., Y. Sohma, J. Nagafune, M. Cella, M. Colonna, F. Facchetti, G. Günther, et al. « BDCA-2, a Novel Plasmacytoid Dendritic Cell-Specific Type II C-Type Lectin, Mediates Antigen Capture and Is a Potent Inhibitor of Interferon Alpha/Beta Induction ». *The Journal of Experimental Medicine* 194, n° 12 (17 décembre 2001): 1823-34.
- Eberl, G., et H. R. MacDonald. « Rapid Death and Regeneration of NKT Cells in Anti-CD3epsilon- or IL-12-Treated Mice: A Major Role for Bone Marrow in NKT Cell Homeostasis ». *Immunity* 9, n° 3 (septembre 1998): 345-53.
- Eberl, G., P. Brawand, et H. R. MacDonald. « Selective Bystander Proliferation of Memory CD4+ and CD8+ T Cells upon NK T or T Cell Activation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165, n° 8 (15 octobre 2000): 4305-11.
- Edelson, Brian T., Wumesh Kc, Richard Juang, Masako Kohyama, Loralyn A. Benoit, Paul A. Klekotka, Clara Moon, et al. « Peripheral CD103+ Dendritic Cells Form a Unified Subset Developmentally Related to CD8alpha+ Conventional Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 207, n° 4 (12 avril 2010): 823-36. doi:10.1084/jem.20091627.
- Egawa, Takeshi, Gerard Eberl, Ichiro Taniuchi, Kamel Benlagha, Frederic Geissmann, Lothar Hennighausen, Albert Bendelac, et Dan R. Littman. « Genetic Evidence Supporting Selection of the Valpha14i NKT Cell Lineage from Double-Positive Thymocyte Precursors ». *Immunity* 22, n° 6 (juin 2005): 705-16. doi:10.1016/j.immuni.2005.03.011.
- Egli, Adrian, Deanna M. Santer, Daire O'Shea, D. Lorne Tyrrell, et Michael Houghton. « The Impact of the Interferon-Lambda Family on the Innate and Adaptive Immune Response to Viral Infections ». *Emerging Microbes & Infections* 3, n° 7 (juillet 2014): e51. doi:10.1038/emi.2014.51.
- Elamanchili, Praveen, Christine M. E. Lutsiak, Samar Hamdy, Manish Diwan, et John Samuel. « "Pathogen-Mimicking" nanoparticles for Vaccine Delivery to Dendritic Cells ». *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)* 30, n° 4 (juin 2007): 378-95. doi:10.1097/CJI.0b013e31802cf3e3.
- Elamanchili, Praveen, Christine M. E. Lutsiak, Samar Hamdy, Manish Diwan, and John Samuel. "Pathogen-Mimicking' nanoparticles for Vaccine Delivery to Dendritic Cells." *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)* 30, no. 4 (June 2007): 378-95. doi:10.1097/CJI.0b013e31802cf3e3.
- Facciotti, Federica, Gundimeda S. Ramanjaneyulu, Marco Lepore, Sebastiano Sansano, Marco Cavallari, Magdalena Kistowska, Sonja Forss-Petter, et al. « Peroxisome-Derived Lipids Are Self Antigens That Stimulate Invariant Natural Killer T Cells in the Thymus ». *Nature Immunology* 13, n° 5 (18 mars 2012): 474-80. doi:10.1038/ni.2245.
- Fifis, Theodora, Anita Gamvrellis, Blessing Crimeen-Irwin, Geoffrey A. Pietersz, Jie Li, Patricia L. Mottram, Ian F. C. McKenzie, et Magdalena Plebanski. « Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173, n° 5 (1 septembre 2004): 3148-54.
- Firat, Elke, Loredana Saveanu, Peter Aichele, Peter Staeheli, Jisen Huai, Simone Gaedicke, Ahmed Nil, et al. « The Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Aminopeptidase 1 in Immunity to Infection and in Cross-Presentation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178, n° 4 (15 février 2007): 2241-48.
- Fischer, Karsten, Emmanuel Scotet, Marcus Niemeyer, Heidrun Koebernick, Jens Zerrahn, Sophie Maillat, Robert Hurwitz, et al. « Mycobacterial Phosphatidylinositol Mannoside Is a Natural Antigen for CD1d-Restricted T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, n° 29 (20 juillet 2004): 10685-90. doi:10.1073/pnas.0403787101.

- Fishman, Mayer. "A Changing World for DCvax: A PSMA Loaded Autologous Dendritic Cell Vaccine for Prostate Cancer." *Expert Opinion on Biological Therapy* 9, no. 12 (December 2009): 1565–75. doi:10.1517/14712590903446921.
- Forestier, Claire, Toshiyuki Takaki, Alberto Molano, Jin S. Im, Ian Baine, Elliot S. Jerud, Petr Illarionov, et al. « Improved Outcomes in NOD Mice Treated with a Novel Th2 Cytokine-Biasing NKT Cell Activator ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178, n° 3 (1 février 2007): 1415-25.
- Fox, Lisa M., Daryl G. Cox, Jennifer L. Lockridge, Xiaohua Wang, Xiuxu Chen, Louise Scharf, David L. Trott, et al. « Recognition of Lyso-Phospholipids by Human Natural Killer T Lymphocytes ». *PLoS Biology* 7, n° 10 (octobre 2009): e1000228. doi:10.1371/journal.pbio.1000228.
- Freigang, Stefan, Elise Landais, Victoria Zadorozhny, Lisa Kain, Kenji Yoshida, Yang Liu, Shenglou Deng, et al. « Scavenger Receptors Target Glycolipids for Natural Killer T Cell Activation ». *The Journal of Clinical Investigation* 122, n° 11 (novembre 2012): 3943-54. doi:10.1172/JCI62267.
- Fujii, Shin-ichiro, Kanako Shimizu, Mitchell Kronenberg, et Ralph M. Steinman. « Prolonged IFN-Gamma-Producing NKT Response Induced with Alpha-Galactosylceramide-Loaded DCs ». *Nature Immunology* 3, n° 9 (septembre 2002): 867-74. doi:10.1038/ni827.
- Fujii, Shin-ichiro, Kanako Shimizu, Yoshitaka Okamoto, Naoki Kunii, Toshinori Nakayama, Shinichiro Motohashi, et Masaru Taniguchi. « NKT Cells as an Ideal Anti-Tumor Immunotherapeutic ». *Frontiers in Immunology* 4 (2 décembre 2013): 409. doi:10.3389/fimmu.2013.00409.
- Fujii, Shin-ichiro. « Exploiting Dendritic Cells and Natural Killer T Cells in Immunotherapy against Malignancies ». *Trends in Immunology* 29, n° 5 (mai 2008): 242-49. doi:10.1016/j.it.2008.02.002.
- Gadola, Stephan D., Jonathan D. Silk, Aruna Jeans, Petr A. Illarionov, Mariolina Salio, Gurdyal S. Besra, Raymond Dwek, Terry D. Butters, Frances M. Platt, et Vincenzo Cerundolo. « Impaired Selection of Invariant Natural Killer T Cells in Diverse Mouse Models of Glycosphingolipid Lysosomal Storage Diseases ». *The Journal of Experimental Medicine* 203, n° 10 (2 octobre 2006): 2293-2303. doi:10.1084/jem.20060921.
- Gadue, P., N. Morton, et P. L. Stein. « The Src Family Tyrosine Kinase Fyn Regulates Natural Killer T Cell Development ». *The Journal of Experimental Medicine* 190, n° 8 (18 octobre 1999): 1189-96.
- Gadue, Paul, et Paul L. Stein. « NK T Cell Precursors Exhibit Differential Cytokine Regulation and Require Itk for Efficient Maturation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169, n° 5 (1 septembre 2002): 2397-2406.
- Galibert, Laurent, Geoffrey S. Diemer, Zhi Liu, Richard S. Johnson, Jeffrey L. Smith, Thierry Walzer, Michael R. Comeau, et al. « 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 ». *The Journal of Biological Chemistry* 280, n° 23 (10 juin 2005): 21955-64. doi:10.1074/jbc.M502095200.
- Galli, Grazia, Paola Pittoni, Elena Tonti, Carmine Malzone, Yasushi Uematsu, Marco Tortoli, Domenico Maione, et al. « Invariant NKT Cells Sustain Specific B Cell Responses and Memory ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n° 10 (6 mars 2007): 3984-89. doi:10.1073/pnas.0700191104.
- Galli, Grazia, Sandra Nuti, Simona Tavarini, Luisa Galli-Stampino, Claudia De Lalla, Giulia Casorati, Paolo Dellabona, et Sergio Abrignani. « CD1d-Restricted Help to B Cells by Human Invariant Natural Killer T Lymphocytes ». *The Journal of Experimental Medicine* 197, n° 8 (21 avril 2003): 1051-57. doi:10.1084/jem.20021616.

- Gao, Yan, Simone A. Nish, Ruoyi Jiang, Lin Hou, Paula Licona-Limón, Jason S. Weinstein, Hongyu Zhao, et Ruslan Medzhitov. « Control of T Helper 2 Responses by Transcription Factor IRF4-Dependent Dendritic Cells ». *Immunity* 39, n° 4 (17 octobre 2013): 722-32. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.028.
- Gattinoni, Luca, Steven E. Finkelstein, Christopher A. Klebanoff, Paul A. Antony, Douglas C. Palmer, Paul J. Spiess, Leroy N. Hwang, et al. "Removal of Homeostatic Cytokine Sinks by Lymphodepletion Enhances the Efficacy of Adoptively Transferred Tumor-Specific CD8⁺ T Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 202, no. 7 (October 3, 2005): 907–12. doi:10.1084/jem.20050732.
- Geijtenbeek, Teunis B. H., et Sonja I. Gringhuis. « Signalling through C-Type Lectin Receptors: Shaping Immune Responses ». *Nature Reviews. Immunology* 9, n° 7 (juillet 2009): 465-79. doi:10.1038/nri2569.
- Geissmann, Frederic, Thomas O. Cameron, Stephane Sidobre, Natasha Manlongat, Mitchell Kronenberg, Michael J. Briskin, Michael L. Dustin, et Dan R. Littman. « Intravascular Immune Surveillance by CXCR6+ NKT Cells Patrolling Liver Sinusoids ». *PLoS Biology* 3, n° 4 (avril 2005): e113. doi:10.1371/journal.pbio.0030113.
- GeurtsvanKessel, Corine H., Monique A. M. Willart, Leonie S. van Rijt, Femke Muskens, Mirjam Kool, Chantal Baas, Kris Thielemans, et al. « Clearance of Influenza Virus from the Lung Depends on Migratory langerin+CD11b- but Not Plasmacytoid Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 205, n° 7 (7 juillet 2008): 1621-34. doi:10.1084/jem.20071365.
- Giaccone, Giuseppe, Cornelis J. A. Punt, Yoshitaka Ando, Rita Ruijter, Nobusuke Nishi, Marlies Peters, B. Mary E. von Blomberg, et al. « A Phase I Study of the Natural Killer T-Cell Ligand Alpha-Galactosylceramide (KRN7000) in Patients with Solid Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8, n° 12 (décembre 2002): 3702-9.
- Gibbins, John D., Lindsay R. Ancelet, Robert Weinkove, Benjamin J. Compton, Gavin F. Painter, Troels R. Petersen, et Ian F. Hermans. « An Autologous Leukemia Cell Vaccine Prevents Murine Acute Leukemia Relapse after Cytarabine Treatment ». *Blood* 124, n° 19 (6 novembre 2014): 2953-63. doi:10.1182/blood-2014-04-568956.
- Gilliet, Michel, Wei Cao, et Yong-Jun Liu. « Plasmacytoid Dendritic Cells: Sensing Nucleic Acids in Viral Infection and Autoimmune Diseases ». *Nature Reviews. Immunology* 8, n° 8 (août 2008): 594-606. doi:10.1038/nri2358.
- Ginhoux, Florent, Kang Liu, Julie Helft, Milena Bogunovic, Melanie Greter, Daigo Hashimoto, Jeremy Price, et al. « The Origin and Development of Nonlymphoid Tissue CD103+ DCs ». *The Journal of Experimental Medicine* 206, n° 13 (21 décembre 2009): 3115-30. doi:10.1084/jem.20091756.
- Godfrey, Dale I., Adam P. Uldrich, James McCluskey, Jamie Rossjohn, et D. Branch Moody. « The Burgeoning Family of Unconventional T Cells ». *Nature Immunology* 16, n° 11 (novembre 2015): 1114-23. doi:10.1038/ni.3298.
- Godfrey, Dale I., et Stuart P. Berzins. « Control Points in NKT-Cell Development ». *Nature Reviews. Immunology* 7, n° 7 (juillet 2007): 505-18. doi:10.1038/nri2116.
- Godfrey, Dale I., H. Robson MacDonald, Mitchell Kronenberg, Mark J. Smyth, et Luc Van Kaer. « NKT Cells: What's in a Name? » *Nature Reviews. Immunology* 4, n° 3 (2004): 231-37. doi:10.1038/nri1309.
- Godfrey, Dale I., Sanda Stankovic, et Alan G. Baxter. « Raising the NKT Cell Family ». *Nature Immunology* 11, n° 3 (mars 2010): 197-206. doi:10.1038/ni.1841.
- Gombert, J. M., A. Herbelin, E. Tancrède-Bohin, M. Dy, C. Carnaud, et J. F. Bach. « Early Quantitative and Functional Deficiency of NK1+-like Thymocytes in the NOD Mouse ». *European Journal of Immunology* 26, n° 12 (décembre 1996): 2989-98. doi:10.1002/eji.1830261226.

- Gottschalk, Catherine, Elisabeth Mettke, et Christian Kurts. « The Role of Invariant Natural Killer T Cells in Dendritic Cell Licensing, Cross-Priming, and Memory CD8(+) T Cell Generation ». *Frontiers in Immunology* 6 (2015): 379. doi:10.3389/fimmu.2015.00379.
- Grajales-Reyes, Gary E., Arifumi Iwata, Jörn Albring, Xiaodi Wu, Roxane Tussiwand, Wumesh Kc, Nicole M. Kretzer, et al. « Batf3 Maintains Autoactivation of Irf8 for Commitment of a CD8 α (+) Conventional DC Clonogenic Progenitor ». *Nature Immunology* 16, n° 7 (juillet 2015): 708-17. doi:10.1038/ni.3197.
- Grubor-Bauk, Branka, Anthony Simmons, Graham Mayrhofer, et Peter G. Speck. « Impaired Clearance of Herpes Simplex Virus Type 1 from Mice Lacking CD1d or NKT Cells Expressing the Semivariant V Alpha 14-J Alpha 281 TCR ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170, n° 3 (1 février 2003): 1430-34.
- Guermonprez, Pierre, Loredana Saveanu, Monique Kleijmeer, Jean Davoust, Peter Van Endert, et Sebastian Amigorena. « ER-Phagosome Fusion Defines an MHC Class I Cross-Presentation Compartment in Dendritic Cells ». *Nature* 425, n° 6956 (25 septembre 2003): 397-402. doi:10.1038/nature01911.
- Guilliams, Martin, Charles-Antoine Dutertre, Charlotte L. Scott, Naomi McGovern, Dorine Sichen, Svetoslav Chakarov, Sofie Van Gassen, et al. « Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species ». *Immunity* 45, n° 3 (20 septembre 2016): 669-84. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.015.
- Guilliams, Martin, Florent Ginhoux, Claudia Jakubzick, Shalin H. Naik, Nobuyuki Onai, Barbara U. Schraml, Elodie Segura, Roxane Tussiwand, et Simon Yona. « Dendritic Cells, Monocytes and Macrophages: A Unified Nomenclature Based on Ontogeny ». *Nature Reviews. Immunology* 14, n° 8 (2014): 571-78. doi:10.1038/nri3712.
- Gumperz, J. E., C. Roy, A. Makowska, D. Lum, M. Sugita, T. Podrebarac, Y. Koezuka, et al. « Murine CD1d-Restricted T Cell Recognition of Cellular Lipids ». *Immunity* 12, n° 2 (février 2000): 211-21.
- Gumperz, Jenny E., Sachiko Miyake, Takashi Yamamura, et Michael B. Brenner. « Functionally Distinct Subsets of CD1d-Restricted Natural Killer T Cells Revealed by CD1d Tetramer Staining ». *The Journal of Experimental Medicine* 195, n° 5 (4 mars 2002): 625-36.
- Guo, Chunqing, Masoud H. Manjili, John R. Subjeck, Devanand Sarkar, Paul B. Fisher, and Xiang-Yang Wang. "Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present, and Future." *Advances in Cancer Research* 119 (2013): 421–75. doi:10.1016/B978-0-12-407190-2.00007-1.
- Hacker, Christine, Ralf D. Kirsch, Xin-Sheng Ju, Thomas Hieronymus, Tatjana C. Gust, Christiane Kuhl, Thorsten Jorgas, et al. « Transcriptional Profiling Identifies Id2 Function in Dendritic Cell Development ». *Nature Immunology* 4, n° 4 (avril 2003): 380-86. doi:10.1038/ni903.
- Hailemichael, Yared, Zhimin Dai, Nina Jaffarad, Yang Ye, Miguel A. Medina, Xue-Fei Huang, Stephanie M. Dorta-Estremera, et al. « Persistent Antigen at Vaccination Sites Induces Tumor-Specific CD8⁺ T Cell Sequestration, Dysfunction and Deletion ». *Nature Medicine* 19, n° 4 (avril 2013): 465-72. doi:10.1038/nm.3105.
- Halder, Ramesh C., Carlos Aguilera, Igor Maricic, et Vipin Kumar. « Type II NKT Cell-Mediated Anergy Induction in Type I NKT Cells Prevents Inflammatory Liver Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 117, n° 8 (août 2007): 2302-12. doi:10.1172/JCI31602.
- Hambleton, Sophie, Sandra Salem, Jacinta Bustamante, Venetia Bigley, Stéphanie Boisson-Dupuis, Joana Azevedo, Anny Fortin, et al. « IRF8 Mutations and Human Dendritic-Cell Immunodeficiency ». *The New England Journal of Medicine* 365, n° 2 (14 juillet 2011): 127-38. doi:10.1056/NEJMoa1100066.
- Hammond, K. J., L. D. Poulton, L. J. Palmisano, P. A. Silveira, D. I. Godfrey, et A. G. Baxter. « Alpha/Beta-T Cell Receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) Thymocytes Prevent

- Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Nonobese Diabetic (NOD)/Lt Mice by the Influence of Interleukin (IL)-4 And/Or IL-10 ». *The Journal of Experimental Medicine* 187, n° 7 (6 avril 1998): 1047-56.
- Hams, Emily, Richard M. Locksley, Andrew N. J. McKenzie, et Padraic G. Fallon. « Cutting Edge: IL-25 Elicits Innate Lymphoid Type 2 and Type II NKT Cells That Regulate Obesity in Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191, n° 11 (1 décembre 2013): 5349-53. doi:10.4049/jimmunol.1301176.
- Haniffa, Muzlifah, Amanda Shin, Venetia Bigley, Naomi McGovern, Pearline Teo, Peter See, Pavandip Singh Wasan, et al. « Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells ». *Immunity* 37, n° 1 (27 juillet 2012): 60-73. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.012.
- Harada, Michishige, Ken-ichiro Seino, Hiroshi Wakao, Sakura Sakata, Yuko Ishizuka, Toshihiro Ito, Satoshi Kojo, Toshinori Nakayama, et Masaru Taniguchi. « Down-Regulation of the Invariant Valpha14 Antigen Receptor in NKT Cells upon Activation ». *International Immunology* 16, n° 2 (février 2004): 241-47.
- Havenar-Daughton, Colin, Shamin Li, Kamel Benlagha, et Julien C. Marie. « Development and Function of Murine RORyt+ iNKT Cells Are under TGF- β Signaling Control ». *Blood* 119, n° 15 (12 avril 2012): 3486-94. doi:10.1182/blood-2012-01-401604.
- Hayakawa, Y., K. Takeda, H. Yagita, S. Kakuta, Y. Iwakura, L. Van Kaer, I. Saiki, et K. Okumura. « Critical Contribution of IFN-Gamma and NK Cells, but Not Perforin-Mediated Cytotoxicity, to Anti-Metastatic Effect of Alpha-Galactosylceramide ». *European Journal of Immunology* 31, n° 6 (juin 2001): 1720-27.
- Hayakawa, Yoshihiro, Kazuyoshi Takeda, Hideo Yagita, Mark J. Smyth, Luc Van Kaer, Ko Okumura, et Ikuo Saiki. « IFN-Gamma-Mediated Inhibition of Tumor Angiogenesis by Natural Killer T-Cell Ligand, Alpha-Galactosylceramide ». *Blood* 100, n° 5 (1 septembre 2002): 1728-33.
- Hayakawa, Yoshihiro, Stefania Rovero, Guido Forni, et Mark J. Smyth. « Alpha-Galactosylceramide (KRN7000) Suppression of Chemical- and Oncogene-Dependent Carcinogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, n° 16 (5 août 2003): 9464-69. doi:10.1073/pnas.1630663100.
- Heczey, Andras, Daofeng Liu, Gengwen Tian, Amy N. Courtney, Jie Wei, Ekaterina Marinova, Xiuhua Gao, et al. « Invariant NKT Cells with Chimeric Antigen Receptor Provide a Novel Platform for Safe and Effective Cancer Immunotherapy ». *Blood* 124, n° 18 (30 octobre 2014): 2824-33. doi:10.1182/blood-2013-11-541235.
- Helft, Julie, Balaji Manicassamy, Pierre Guermonprez, Daigo Hashimoto, Aymeric Silvin, Judith Agudo, Brian D. Brown, et al. « Cross-Presenting CD103+ Dendritic Cells Are Protected from Influenza Virus Infection ». *The Journal of Clinical Investigation* 122, n° 11 (novembre 2012): 4037-47. doi:10.1172/JCI60659.
- Hermans, Ian F., Jonathan D. Silk, Uzi Gileadi, Mariolina Salio, Bini Mathew, Gerd Ritter, Richard Schmidt, Adrian L. Harris, Lloyd Old, et Vincenzo Cerundolo. « NKT Cells Enhance CD4+ and CD8+ T Cell Responses to Soluble Antigen in Vivo through Direct Interaction with Dendritic Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171, n° 10 (15 novembre 2003): 5140-47.
- Hermans, Ian F., Jonathan D. Silk, Uzi Gileadi, S. Hajar Masri, Dawn Shepherd, Kathryn J. Farrand, Mariolina Salio, et Vincenzo Cerundolo. « Dendritic Cell Function Can Be Modulated through Cooperative Actions of TLR Ligands and Invariant NKT Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178, n° 5 (1 mars 2007): 2721-29.
- Heuvel, Marianne J. van den, Nitan Garg, Luc Van Kaer, et S. M. Mansour Haeryfar. « NKT Cell Costimulation: Experimental Progress and Therapeutic Promise ».

- Trends in Molecular Medicine* 17, n° 2 (février 2011): 65-77. doi:10.1016/j.molmed.2010.10.007.
- Higano, Celestia S., John M. Corman, David C. Smith, Arthur S. Centeno, Christopher P. Steidle, Marc Gittleman, Jonathan W. Simons, Natalie Sacks, Junko Aimi, and Eric J. Small. "Phase 1/2 Dose-Escalation Study of a GM-CSF-Secreting, Allogeneic, Cellular Immunotherapy for Metastatic Hormone-Refractory Prostate Cancer." *Cancer* 113, no. 5 (September 1, 2008): 975–84. doi:10.1002/cncr.23669.
- Hildner, Kai, Brian T. Edelson, Whitney E. Purtha, Mark Diamond, Hirokazu Matsushita, Masako Kohyama, Boris Calderon, et al. « Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8alpha+ Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity ». *Science (New York, N.Y.)* 322, n° 5904 (14 novembre 2008): 1097-1100. doi:10.1126/science.1164206.
- Hirai, Y., M. Haque, T. Yoshida, K. Yokota, T. Yasuda, et K. Oguma. « Unique Cholesteryl Glucosides in Helicobacter Pylori: Composition and Structural Analysis ». *Journal of Bacteriology* 177, n° 18 (septembre 1995): 5327-33.
- Hix, Laura M., Yihui H. Shi, Randy R. Brutkiewicz, Paul L. Stein, Chyung-Ru Wang, et Ming Zhang. « CD1d-Expressing Breast Cancer Cells Modulate NKT Cell-Mediated Antitumor Immunity in a Murine Model of Breast Cancer Metastasis ». *PloS One* 6, n° 6 (2011): e20702. doi:10.1371/journal.pone.0020702.
- Hodi, F. Stephen, Steven J. O'Day, David F. McDermott, Robert W. Weber, Jeffrey A. Sosman, John B. Haanen, Rene Gonzalez, et al. "Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma." *New England Journal of Medicine* 363, no. 8 (August 19, 2010): 711–23. doi:10.1056/NEJMoa1003466.
- Hong, Changwan, Hyunji Lee, Mihwa Oh, Chang-Yuil Kang, Seokmann Hong, et Se-Ho Park. « CD4+ T Cells in the Absence of the CD8+ Cytotoxic T Cells Are Critical and Sufficient for NKT Cell-Dependent Tumor Rejection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177, n° 10 (15 novembre 2006): 6747-57.
- Hong, S., M. T. Wilson, I. Serizawa, L. Wu, N. Singh, O. V. Naidenko, T. Miura, et al. « The Natural Killer T-Cell Ligand Alpha-Galactosylceramide Prevents Autoimmune Diabetes in Non-Obese Diabetic Mice ». *Nature Medicine* 7, n° 9 (septembre 2001): 1052-56. doi:10.1038/nm0901-1052.
- Houde, Mathieu, Sylvie Bertholet, Etienne Gagnon, Sylvain Brunet, Guillaume Goyette, Annie Laplante, Michael F. Princiotta, Pierre Thibault, David Sacks, et Michel Desjardins. « Phagosomes Are Competent Organelles for Antigen Cross-Presentation ». *Nature* 425, n° 6956 (25 septembre 2003): 402-6. doi:10.1038/nature01912.
- Hu, Taishan, Idoia Gimferrer, Amie Simmons, David Wiest, et José Alberola-Ila. « The Ras/MAPK Pathway Is Required for Generation of iNKT Cells ». *PloS One* 6, n° 5 (10 mai 2011): e19890. doi:10.1371/journal.pone.0019890.
- Huh, Jin Young, Jong In Kim, Yoon Jeong Park, In Jae Hwang, Yun Sok Lee, Jee Hyung Sohn, Sung Kyu Lee, et al. « A Novel Function of Adipocytes in Lipid Antigen Presentation to iNKT Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 33, n° 2 (janvier 2013): 328-39. doi:10.1128/MCB.00552-12.
- Hunn, Martin K., Kathryn J. Farrand, Kate W. R. Broadley, Robert Weinkove, Peter Ferguson, Rose J. Miller, Cameron S. Field, Troels Petersen, Melanie J. McConnell, et Ian F. Hermans. « Vaccination with Irradiated Tumor Cells Pulsed with an Adjuvant That Stimulates NKT Cells Is an Effective Treatment for Glioma ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18, n° 23 (1 décembre 2012): 6446-59. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0704.
- Huysamen, Cristal, Janet A. Willment, Kevin M. Dennehy, et Gordon D. Brown. « CLEC9A Is a Novel Activation C-Type Lectin-like Receptor Expressed on BDCA3+ Dendritic Cells and a Subset of Monocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 283, n° 24 (13 juin 2008): 16693-701. doi:10.1074/jbc.M709923200.

- Idoyaga, Juliana, Ashira Lubkin, Christopher Fiorese, Mireille H. Lahoud, Irina Caminschi, Yaoxing Huang, Anthony Rodriguez, et al. « Comparable T Helper 1 (Th1) and CD8 T-Cell Immunity by Targeting HIV Gag p24 to CD8 Dendritic Cells within Antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, n° 6 (8 février 2011): 2384-89. doi:10.1073/pnas.1019547108.
- Ignjatovic, Nenad L., Zorica R. Ajdukovic, Vojin P. Savic, et Dragan P. Uskokovic. « Size Effect of Calcium Phosphate Coated with Poly-DL-Lactide- Co-Glycolide on Healing Processes in Bone Reconstruction ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 94, n° 1 (juillet 2010): 108-17. doi:10.1002/jbm.b.31630.
- Igyártó, Botond Z., Krystal Haley, Daniela Ortner, Aleh Bobr, Maryam Gerami-Nejad, Brian T. Edelson, Sandra M. Zurawski, et al. « Skin-Resident Murine Dendritic Cell Subsets Promote Distinct and Opposing Antigen-Specific T Helper Cell Responses ». *Immunity* 35, n° 2 (26 août 2011): 260-72. doi:10.1016/j.immuni.2011.06.005.
- Ikarashi, Yoshinori, Akira Iizuka, Yumie Koshidaka, Yuji Heike, Yoichi Takaeue, Mitsuzi Yoshida, Mitchell Kronenberg, et Hiro Wakasugi. « Phenotypical and Functional Alterations during the Expansion Phase of Invariant Valpha14 Natural Killer T (Valpha14i NKT) Cells in Mice Primed with Alpha-Galactosylceramide ». *Immunology* 116, n° 1 (septembre 2005): 30-37. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02193.x.
- Im, Jin S., Pooja Arora, Gabriel Bricard, Alberto Molano, Manjunatha M. Venkataswamy, Ian Baine, Elliot S. Jerud, et al. « Kinetics and Cellular Site of Glycolipid Loading Control the Outcome of Natural Killer T Cell Activation ». *Immunity* 30, n° 6 (19 juin 2009): 888-98. doi:10.1016/j.immuni.2009.03.022.
- Ippolito, Gregory C., Joseph D. Dekker, Yui-Hsi Wang, Bum-Kyu Lee, Arthur L. Shaffer, Jian Lin, Jason K. Wall, et al. « Dendritic Cell Fate Is Determined by BCL11A ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, n° 11 (18 mars 2014): E998-1006. doi:10.1073/pnas.1319228111.
- Irvine, Darrell J., Melissa C. Hanson, Kavya Rakhra, et Talar Tokatljan. « Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy ». *Chemical Reviews* 115, n° 19 (14 octobre 2015): 11109-46. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00109.
- Ishikawa, Aki, Shinichiro Motohashi, Eiichi Ishikawa, Hiroki Fuchida, Kazuko Higashino, Mizuto Otsuji, Toshihiko Iizasa, Toshinori Nakayama, Masaru Taniguchi, et Takehiko Fujisawa. « A Phase I Study of Alpha-Galactosylceramide (KRN7000)-Pulsed Dendritic Cells in Patients with Advanced and Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11, n° 5 (1 mars 2005): 1910-17. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1453.
- Ishikawa, H., H. Hisaeda, M. Taniguchi, T. Nakayama, T. Sakai, Y. Maekawa, Y. Nakano, et al. « CD4(+) v(alpha)14 NKT Cells Play a Crucial Role in an Early Stage of Protective Immunity against Infection with *Leishmania Major* ». *International Immunology* 12, n° 9 (septembre 2000): 1267-74.
- Ivanov, Stoyan, Christophe Paget, et François Trottein. « Role of Non-Conventional T Lymphocytes in Respiratory Infections: The Case of the Pneumococcus ». *PLoS Pathogens* 10, n° 10 (octobre 2014): e1004300. doi:10.1371/journal.ppat.1004300.
- Ivanov, Stoyan, Joelle Renneson, Josette Fontaine, Adeline Barthelemy, Christophe Paget, Elodie Macho Fernandez, Fany Blanc, et al. « Interleukin-22 Reduces Lung Inflammation during Influenza A Virus Infection and Protects against Secondary Bacterial Infection ». *Journal of Virology* 87, n° 12 (juin 2013): 6911-24. doi:10.1128/JVI.02943-12.
- Ivanov, Stoyan, Josette Fontaine, Christophe Paget, Elodie Macho Fernandez, Laurye Van Maele, Joelle Renneson, Isabelle Maillat, et al. « Key Role for Respiratory CD103(+) Dendritic Cells, IFN- γ , and IL-17 in Protection against *Streptococcus*

- Pneumoniae Infection in Response to α -Galactosylceramide ». *The Journal of Infectious Diseases* 206, n° 5 (1 septembre 2012): 723-34. doi:10.1093/infdis/jis413.
- Iwabuchi, K., C. Iwabuchi, S. Tone, D. Itoh, N. Tosa, I. Negishi, K. Ogasawara, T. Uede, et K. Onoé. « Defective Development of NK1.1+ T-Cell Antigen Receptor Alpha β + Cells in Zeta-Associated Protein 70 Null Mice with an Accumulation of NK1.1+ CD3-NK-like Cells in the Thymus ». *Blood* 97, n° 6 (15 mars 2001): 1765-75.
- Iyoda, Tomonori, Maki Ushida, Yukino Kimura, Kento Minamino, Akiko Hayuka, Shoichi Yokohata, Hiromi Ehara, et Kayo Inaba. « Invariant NKT Cell Anergy Is Induced by a Strong TCR-Mediated Signal plus Co-Stimulation ». *International Immunology* 22, n° 11 (novembre 2010): 905-13. doi:10.1093/intimm/dxq444.
- Izhak, Liat, Elena Ambrosino, Shingo Kato, Stanley T. Parish, Jessica J. O'Konek, Hannah Weber, Zheng Xia, David Venzon, Jay A. Berzofsky, et Masaki Terabe. « Delicate Balance among Three Types of T Cells in Concurrent Regulation of Tumor Immunity ». *Cancer Research* 73, n° 5 (1 mars 2013): 1514-23. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2567.
- Jahng, Alex, Igor Maricic, Carlos Aguilera, Susanna Cardell, Ramesh C. Halder, et Vipin Kumar. « Prevention of Autoimmunity by Targeting a Distinct, Noninvariant CD1d-Reactive T Cell Population Reactive to Sulfatide ». *The Journal of Experimental Medicine* 199, n° 7 (5 avril 2004): 947-57. doi:10.1084/jem.20031389.
- Jain, R. A. « The Manufacturing Techniques of Various Drug Loaded Biodegradable Poly(lactide-Co-Glycolide) (PLGA) Devices ». *Biomaterials* 21, n° 23 (décembre 2000): 2475-90.
- Jeanbart, Laura, et Melody A. Swartz. « Engineering Opportunities in Cancer Immunotherapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, n° 47 (24 novembre 2015): 14467-72. doi:10.1073/pnas.1508516112.
- Ji, Yewei, Shengyi Sun, Aimin Xu, Prerna Bhargava, Liu Yang, Karen S. L. Lam, Bin Gao, Chih-Hao Lee, Sander Kersten, et Ling Qi. « Activation of Natural Killer T Cells Promotes M2 Macrophage Polarization in Adipose Tissue and Improves Systemic Glucose Tolerance via Interleukin-4 (IL-4)/STAT6 Protein Signaling Axis in Obesity ». *The Journal of Biological Chemistry* 287, n° 17 (20 avril 2012): 13561-71. doi:10.1074/jbc.M112.350066.
- Jiang, Janina, Ouafae Karimi, Sander Ouburg, Cheryl I. Champion, Archana Khurana, Guangchao Liu, Amanda Freed, et al. « Interruption of CXCL13-CXCR5 Axis Increases Upper Genital Tract Pathology and Activation of NKT Cells Following Chlamydial Genital Infection ». *PloS One* 7, n° 11 (2012): e47487. doi:10.1371/journal.pone.0047487.
- Joffre, Olivier P., David Sancho, Santiago Zelenay, Anna M. Keller, et Caetano Reis e Sousa. « Efficient and Versatile Manipulation of the Peripheral CD4+ T-Cell Compartment by Antigen Targeting to DNGR-1/CLEC9A ». *European Journal of Immunology* 40, n° 5 (mai 2010): 1255-65. doi:10.1002/eji.201040419.
- Johansen, P., F. Estevez, R. Zurbriggen, H. P. Merkle, R. Glück, G. Corradin, and B. Gander. "Towards Clinical Testing of a Single-Administration Tetanus Vaccine Based on PLA/PLGA Microspheres." *Vaccine* 19, no. 9–10 (December 8, 2000): 1047–54.
- Johansen, Pål, Tazio Storni, Lorna Rettig, Zhiyong Qiu, Ani Der-Sarkissian, Kent A. Smith, Vania Manolova, et al. « Antigen Kinetics Determines Immune Reactivity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n° 13 (1 avril 2008): 5189-94. doi:10.1073/pnas.0706296105.
- Jongbloed, Sarah L., Andrew J. Kassianos, Kylie J. McDonald, Georgina J. Clark, Xinsheng Ju, Catherine E. Angel, Chun-Jen J. Chen, et al. « Human CD141+ (BDCA-3)+ Dendritic Cells (DCs) Represent a Unique Myeloid DC Subset That Cross-Presents Necrotic Cell Antigens ». *Journal of Experimental Medicine* 207, n° 6 (7 juin 2010): 1247-60. doi:10.1084/jem.20092140.

- Jordan, Martha S., Jennifer E. Smith, Jeremy C. Burns, Jessica-Elise T. Austin, Kim E. Nichols, Anna C. Aschenbrenner, et Gary A. Koretzky. « Complementation in Trans of Altered Thymocyte Development in Mice Expressing Mutant Forms of the Adaptor Molecule SLP76 ». *Immunity* 28, n° 3 (mars 2008): 359-69. doi:10.1016/j.immuni.2008.01.010.
- Jordanova, Ekaterina S., Arko Gorter, Ouissam Ayachi, Frans Prins, Lindy G. Durrant, Gemma G. Kenter, Sjoerd H. van der Burg, et Gert Jan Fleuren. « Human Leukocyte Antigen Class I, MHC Class I Chain-Related Molecule A, and CD8+/Regulatory T-Cell Ratio: Which Variable Determines Survival of Cervical Cancer Patients? » *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14, n° 7 (1 avril 2008): 2028-35. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4554.
- Joshi, Medha D., Wendy J. Unger, Gert Storm, Yvette van Kooyk, et Enrico Mastrobattista. « Targeting Tumor Antigens to Dendritic Cells Using Particulate Carriers ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 161, n° 1 (10 juillet 2012): 25-37. doi:10.1016/j.jconrel.2012.05.010.
- Joshi, Vijaya B., Sean M. Geary, et Aliasger K. Salem. « Biodegradable Particles as Vaccine Delivery Systems: Size Matters ». *The AAPS Journal* 15, n° 1 (janvier 2013): 85-94. doi:10.1208/s12248-012-9418-6.
- Joyee, Antony George, Hongyu Qiu, Shuhe Wang, Yijun Fan, Laura Bilenki, et Xi Yang. « Distinct NKT Cell Subsets Are Induced by Different Chlamydia Species Leading to Differential Adaptive Immunity and Host Resistance to the Infections ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178, n° 2 (15 janvier 2007): 1048-58.
- Jung, Steffen, Derya Unutmaz, Phillip Wong, Gen-Ichiro Sano, Kenia De los Santos, Tim Sparwasser, Shengji Wu, et al. « In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens ». *Immunity* 17, n° 2 (août 2002): 211-20.
- Kain, Lisa, Bill Webb, Brian L. Anderson, Shenglou Deng, Marie Holt, Anne Costanzo, Anne Constanzo, et al. « The Identification of the Endogenous Ligands of Natural Killer T Cells Reveals the Presence of Mammalian α -Linked Glycosylceramides ». *Immunity* 41, n° 4 (16 octobre 2014): 543-54. doi:10.1016/j.immuni.2014.08.017.
- Kamaladasa, A., N. Wickramasinghe, T. N. Adikari, L. Gomes, N. L. A. Shyamali, M. Salio, V. Cerundolo, G. S. Ogg, et G. Neelika Malavige. « Expansion of Highly Activated Invariant Natural Killer T Cells with Altered Phenotype in Acute Dengue Infection ». *Clinical and Experimental Immunology* 185, n° 2 (août 2016): 228-38. doi:10.1111/cei.12778.
- Kamata, Toshiko, Akane Suzuki, Naoko Mise, Fumie Ihara, Mariko Takami, Yuji Makita, Atsushi Horinaka, et al. « Blockade of Programmed Death-1/Programmed Death Ligand Pathway Enhances the Antitumor Immunity of Human Invariant Natural Killer T Cells ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 65, n° 12 (décembre 2016): 1477-89. doi:10.1007/s00262-016-1901-y.
- Kanchan, Vibhu, Yogesh K. Katare, et Amulya K. Panda. « Memory Antibody Response from Antigen Loaded Polymer Particles and the Effect of Antigen Release Kinetics ». *Biomaterials* 30, n° 27 (septembre 2009): 4763-76. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.075.
- Kang, Suk-Jo, et Peter Cresswell. « Saposins Facilitate CD1d-Restricted Presentation of an Exogenous Lipid Antigen to T Cells ». *Nature Immunology* 5, n° 2 (février 2004): 175-81. doi:10.1038/ni1034.
- Kantoff, Philip W., Celestia S. Higano, Neal D. Shore, E. Roy Berger, Eric J. Small, David F. Penson, Charles H. Redfern, et al. « Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 363, n° 5 (29 juillet 2010): 411-22. doi:10.1056/NEJMoa1001294.
- Kantoff, Philip W., Celestia S. Higano, Neal D. Shore, E. Roy Berger, Eric J. Small, David F. Penson, Charles H. Redfern, et al. « Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-

- Resistant Prostate Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 363, no. 5 (July 29, 2010): 411–22. doi:10.1056/NEJMoa1001294.
- Kashiwada, Masaki, Nhat-Long L. Pham, Lecia L. Pewe, John T. Harty, et Paul B. Rothman. « NFIL3/E4BP4 Is a Key Transcription Factor for CD8 α ⁺ Dendritic Cell Development ». *Blood* 117, n^o 23 (9 juin 2011): 6193-97. doi:10.1182/blood-2010-07-295873.
- Katare, Yogesh K., T. Muthukumaran, et Amulya K. Panda. « Influence of Particle Size, Antigen Load, Dose and Additional Adjuvant on the Immune Response from Antigen Loaded PLA Microparticles ». *International Journal of Pharmaceutics* 301, n^o 1-2 (14 septembre 2005): 149-60. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.05.028.
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. « Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity ». *Immunity* 34, n^o 5 (27 mai 2011): 637-50. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006.
- Kawakami, K., Y. Kinjo, K. Uezu, S. Yara, K. Miyagi, Y. Koguchi, T. Nakayama, M. Taniguchi, et A. Saito. « Monocyte Chemoattractant Protein-1-Dependent Increase of V Alpha 14 NKT Cells in Lungs and Their Roles in Th1 Response and Host Defense in Cryptococcal Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167, n^o 11 (1 décembre 2001): 6525-32.
- Kawakami, Kazuyoshi, Natsuo Yamamoto, Yuki Kinjo, Kazuya Miyagi, Chikara Nakasone, Kaori Uezu, Takeshi Kinjo, Toshinori Nakayama, Masaru Taniguchi, et Atsushi Saito. « Critical Role of V α 14⁺ Natural Killer T Cells in the Innate Phase of Host Protection against *Streptococcus Pneumoniae* Infection ». *European Journal of Immunology* 33, n^o 12 (décembre 2003): 3322-30. doi:10.1002/eji.200324254.
- Kawamura, T., K. Takeda, S. K. Mendiratta, H. Kawamura, L. Van Kaer, H. Yagita, T. Abo, et K. Okumura. « Critical Role of NK1⁺ T Cells in IL-12-Induced Immune Responses in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160, n^o 1 (1 janvier 1998): 16-19.
- Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, et al. « CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of v α 14 NKT Cells by Glycosylceramides ». *Science (New York, N.Y.)* 278, n^o 5343 (28 novembre 1997): 1626-29.
- Kee, Seung-Jung, Yong-Soo Kwon, Yong-Wook Park, Young-Nan Cho, Sung-Ji Lee, Tae-Jong Kim, Shin-Seok Lee, et al. « Dysfunction of Natural Killer T Cells in Patients with Active Mycobacterium Tuberculosis Infection ». *Infection and Immunity* 80, n^o 6 (juin 2012): 2100-2108. doi:10.1128/IAI.06018-11.
- Kent, Sally C., Yahua Chen, Sue M. Clemmings, Vissia Viglietta, Norma Sue Kenyon, Camillo Ricordi, Bernhard Hering, et David A. Hafler. « Loss of IL-4 Secretion from Human Type 1a Diabetic Pancreatic Draining Lymph Node NKT Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175, n^o 7 (1 octobre 2005): 4458-64.
- Kim, Edy Y., John T. Battaile, Anand C. Patel, Yingjian You, Eugene Agapov, Mitchell H. Grayson, Loralyn A. Benoit, et al. « Persistent Activation of an Innate Immune Response Translates Respiratory Viral Infection into Chronic Lung Disease ». *Nature Medicine* 14, n^o 6 (juin 2008): 633-40. doi:10.1038/nm1770.
- Kim, Peter J., Sung-Yun Pai, Manfred Brigl, Gurdyal S. Besra, Jenny Gumperz, et I.-Cheng Ho. « GATA-3 Regulates the Development and Function of Invariant NKT Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177, n^o 10 (15 novembre 2006): 6650-59.
- Kim, Sarah, Vera Kaiser, Esther Beier, Matthias Bechheim, Margit Guenther-Biller, Andrea Ablasser, Michael Berger, Stefan Endres, Gunther Hartmann, et Veit Hornung. « Self-Priming Determines High Type I IFN Production by Plasmacytoid Dendritic Cells ». *European Journal of Immunology* 44, n^o 3 (mars 2014): 807-18. doi:10.1002/eji.201343806.

- King, Irah L., Anne Fortier, Michael Tighe, John Dibble, Gerald F. M. Watts, Natacha Veerapen, Ann M. Haberman, et al. « Invariant Natural Killer T Cells Direct B Cell Responses to Cognate Lipid Antigen in an IL-21-Dependent Manner ». *Nature Immunology* 13, n° 1 (27 novembre 2011): 44-50. doi:10.1038/ni.2172.
- Kinjo, Yuki, Bo Pei, Simone Bufali, Ravinder Raju, Stewart K. Richardson, Masakazu Imamura, Masakazu Fujio, et al. « Natural Sphingomonas Glycolipids Vary Greatly in Their Ability to Activate Natural Killer T Cells ». *Chemistry & Biology* 15, n° 7 (21 juillet 2008): 654-64. doi:10.1016/j.chembiol.2008.05.012.
- Kinjo, Yuki, Douglass Wu, Gisen Kim, Guo-Wen Xing, Michael A. Poles, David D. Ho, Moriya Tsuji, Kazuyoshi Kawahara, Chi-Huey Wong, et Mitchell Kronenberg. « Recognition of Bacterial Glycosphingolipids by Natural Killer T Cells ». *Nature* 434, n° 7032 (24 mars 2005): 520-25. doi:10.1038/nature03407.
- Kinjo, Yuki, Emmanuel Tupin, Douglass Wu, Masakazu Fujio, Raquel Garcia-Navarro, Mohammed Rafii-El-Idrissi Benhnia, Dirk M. Zajonc, et al. « Natural Killer T Cells Recognize Diacylglycerol Antigens from Pathogenic Bacteria ». *Nature Immunology* 7, n° 9 (septembre 2006): 978-86. doi:10.1038/ni1380.
- Kinjo, Yuki, Naoki Kitano, et Mitchell Kronenberg. « The Role of Invariant Natural Killer T Cells in Microbial Immunity ». *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy* 19, n° 4 (août 2013): 560-70. doi:10.1007/s10156-013-0638-1.
- Kinjo, Yuki, Petr Illarionov, José Luis Vela, Bo Pei, Enrico Girardi, Xiangming Li, Yali Li, et al. « Invariant Natural Killer T Cells Recognize Glycolipids from Pathogenic Gram-Positive Bacteria ». *Nature Immunology* 12, n° 10 (4 septembre 2011): 966-74. doi:10.1038/ni.2096.
- Kirkwood, John M., Ahmad A. Tarhini, Monica C. Panelli, Stergios J. Moschos, Hassane M. Zarour, Lisa H. Butterfield, and Helen J. Gogas. "Next Generation of Immunotherapy for Melanoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, no. 20 (July 10, 2008): 3445–55. doi:10.1200/JCO.2007.14.6423.
- Kitamura, H., K. Iwakabe, T. Yahata, S. Nishimura, A. Ohta, Y. Ohmi, M. Sato, et al. « The Natural Killer T (NKT) Cell Ligand Alpha-Galactosylceramide Demonstrates Its Immunopotentiating Effect by Inducing Interleukin (IL)-12 Production by Dendritic Cells and IL-12 Receptor Expression on NKT Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 189, n° 7 (5 avril 1999): 1121-28.
- Kitayama, Shuichi, Rong Zhang, Tian-Yi Liu, Norihiro Ueda, Shoichi Iriguchi, Yutaka Yasui, Yohei Kawai, et al. « Cellular Adjuvant Properties, Direct Cytotoxicity of Re-Differentiated Vα24 Invariant NKT-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells ». *Stem Cell Reports* 6, n° 2 (9 février 2016): 213-27. doi:10.1016/j.stemcr.2016.01.005.
- Klebanoff, Christopher A., Steven E. Finkelstein, Deborah R. Surman, Michael K. Lichtman, Luca Gattinoni, Marc R. Theoret, Navrose Grewal, et al. "IL-15 Enhances the *in Vivo* Antitumor Activity of Tumor-Reactive CD8⁺ T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, no. 7 (February 17, 2004): 1969–74. doi:10.1073/pnas.0307298101.
- Knutson, Keith L., Matthew J. Maurer, Claudia C. Preston, Kirsten B. Moysich, Krista Goergen, Kieran M. Hawthorne, Julie M. Cunningham, et al. « Regulatory T Cells, Inherited Variation, and Clinical Outcome in Epithelial Ovarian Cancer ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 64, n° 12 (décembre 2015): 1495-1504. doi:10.1007/s00262-015-1753-x.
- Ko, Hyun-Jeong, Jung-Mi Lee, Yeon-Jeong Kim, Yun-Sun Kim, Kyoo-A. Lee, et Chang-Yuil Kang. « Immunosuppressive Myeloid-Derived Suppressor Cells Can Be Converted into Immunogenic APCs with the Help of Activated NKT Cells: An

- Alternative Cell-Based Antitumor Vaccine ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 4 (15 février 2009): 1818-28. doi:10.4049/jimmunol.0802430.
- Koch, Michael, Victoria S. Stronge, Dawn Shepherd, Stephan D. Gadola, Bini Mathew, Gerd Ritter, Alan R. Fersht, et al. « The Crystal Structure of Human CD1d with and without Alpha-Galactosylceramide ». *Nature Immunology* 6, n° 8 (août 2005): 819-26. doi:10.1038/ni1225.
- Kojo, Satoshi, Chris Elly, Yohsuke Harada, Wallace Y. Langdon, Mitchell Kronenberg, et Yun-Cai Liu. « Mechanisms of NKT Cell Anergy Induction Involve Cbl-B-Promoted Monoubiquitination of CARMA1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, n° 42 (20 octobre 2009): 17847-51. doi:10.1073/pnas.0904078106.
- Kovacsovics-Bankowski, M., et K. L. Rock. « A Phagosome-to-Cytosol Pathway for Exogenous Antigens Presented on MHC Class I Molecules ». *Science (New York, N.Y.)* 267, n° 5195 (13 janvier 1995): 243-46.
- Kovalovsky, Damian, Olisambu U. Uche, Sonia Eladad, Robin M. Hobbs, Woelsung Yi, Eric Alonzo, Kevin Chua, et al. « The BTB-Zinc Finger Transcriptional Regulator PLZF Controls the Development of Invariant Natural Killer T Cell Effector Functions ». *Nature Immunology* 9, n° 9 (septembre 2008): 1055-64. doi:10.1038/ni.1641.
- Kronenberg, Mitchell, et Alexander Rudensky. « Regulation of Immunity by Self-Reactive T Cells ». *Nature* 435, n° 7042 (2 juin 2005): 598-604. doi:10.1038/nature03725.
- Kronenberg, Mitchell. « Toward an Understanding of NKT Cell Biology: Progress and Paradoxes ». *Annual Review of Immunology* 23 (2005): 877-900. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115742.
- Kumagai, Yutaro, Himanshu Kumar, Shohei Koyama, Taro Kawai, Osamu Takeuchi, et Shizuo Akira. « Cutting Edge: TLR-Dependent Viral Recognition along with Type I IFN Positive Feedback Signaling Masks the Requirement of Viral Replication for IFN- α Production in Plasmacytoid Dendritic Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 7 (1 avril 2009): 3960-64. doi:10.4049/jimmunol.0804315.
- Kunii, Naoki, Shigetoshi Horiguchi, Shinichiro Motohashi, Heizaburo Yamamoto, Naoyuki Ueno, Seiji Yamamoto, Daiju Sakurai, Masaru Taniguchi, Toshinori Nakayama, et Yoshitaka Okamoto. « Combination Therapy of in Vitro-Expanded Natural Killer T Cells and Alpha-Galactosylceramide-Pulsed Antigen-Presenting Cells in Patients with Recurrent Head and Neck Carcinoma ». *Cancer Science* 100, n° 6 (juin 2009): 1092-98. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01135.x.
- Kurosaki, Motoyoshi, Shigetoshi Horiguchi, Kazuki Yamasaki, Yoshitaka Uchida, Shinichiro Motohashi, Toshinori Nakayama, Akira Sugimoto, et Yoshitaka Okamoto. « Migration and Immunological Reaction after the Administration of α GalCer-Pulsed Antigen-Presenting Cells into the Submucosa of Patients with Head and Neck Cancer ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 60, n° 2 (février 2011): 207-15. doi:10.1007/s00262-010-0932-z.
- Kurts, Christian, Bruce W. S. Robinson, et Percy A. Knolle. « Cross-priming in health and disease ». *Nature Reviews Immunology* 10, n° 6 (juin 2010): 403-14. doi:10.1038/nri2780.
- Kuylenstierna, Carlotta, Niklas K. Björkström, Sofia K. Andersson, Peter Sahlström, Lidija Bosnjak, Dominic Paquin-Proulx, Karl-Johan Malmberg, Hans-Gustaf Ljunggren, Markus Moll, et Johan K. Sandberg. « NKG2D Performs Two Functions in Invariant NKT Cells: Direct TCR-Independent Activation of NK-like Cytotoxicity and Co-Stimulation of Activation by CD1d ». *European Journal of Immunology* 41, n° 7 (juillet 2011): 1913-23. doi:10.1002/eji.200940278.
- Kwon, Y. J., E. James, N. Shastri, and J. M. J. Frechet. "In Vivo Targeting of Dendritic Cells for Activation of Cellular Immunity Using Vaccine Carriers Based on pH-

- Responsive Microparticles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, no. 51 (December 20, 2005): 18264–68. doi:10.1073/pnas.0509541102.
- Kyaw, Tin, Amy Winship, Christopher Tay, Peter Kanellakis, Hamid Hosseini, Anh Cao, Priscilla Li, Peter Tipping, Alex Bobik, et Ban-Hock Toh. « Cytotoxic and Proinflammatory CD8+ T Lymphocytes Promote Development of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in ApoE-Deficient Mice ». *Circulation* 127, n° 9 (3 mai 2013): 1028-39. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001347.
- Lahoud, Mireille H., Fatma Ahmet, Susie Kitsoulis, Soo San Wan, David Vremec, Chin-Nien Lee, Belinda Phipson, et al. « Targeting Antigen to Mouse Dendritic Cells via Clec9A Induces Potent CD4 T Cell Responses Biased toward a Follicular Helper Phenotype ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187, n° 2 (15 juillet 2011): 842-50. doi:10.4049/jimmunol.1101176.
- Laloux, V., L. Beaudoin, D. Jeske, C. Carnaud, et A. Lehuen. « NK T Cell-Induced Protection against Diabetes in V Alpha 14-J Alpha 281 Transgenic Nonobese Diabetic Mice Is Associated with a Th2 Shift Circumscribed Regionally to the Islets and Functionally to Islet Autoantigen ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166, n° 6 (15 mars 2001): 3749-56.
- Lang, Gillian A., T. Scott Devera, et Mark L. Lang. « Requirement for CD1d Expression by B Cells to Stimulate NKT Cell-Enhanced Antibody Production ». *Blood* 111, n° 4 (15 février 2008): 2158-62. doi:10.1182/blood-2007-10-117309.
- Lantz, O., et A. Bendelac. « An Invariant T Cell Receptor Alpha Chain Is Used by a Unique Subset of Major Histocompatibility Complex Class I-Specific CD4+ and CD4-8- T Cells in Mice and Humans ». *The Journal of Experimental Medicine* 180, n° 3 (1 septembre 1994): 1097-1106.
- Lauterbach, Henning, Barbara Bathke, Stefanie Gilles, Claudia Traidl-Hoffmann, Christian A. Luber, György Fejer, Marina A. Freudenberg, et al. « Mouse CD8alpha+ DCs and Human BDCA3+ DCs Are Major Producers of IFN-Lambda in Response to Poly IC ». *The Journal of Experimental Medicine* 207, n° 12 (22 novembre 2010): 2703-17. doi:10.1084/jem.20092720.
- Leadbetter, Elizabeth A., Manfred Brigl, Petr Illarionov, Nadia Cohen, Megan C. Luteran, Shiv Pillai, Gurdyal S. Besra, et Michael B. Brenner. « NK T Cells Provide Lipid Antigen-Specific Cognate Help for B Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n° 24 (17 juin 2008): 8339-44. doi:10.1073/pnas.0801375105.
- Lee, Jung-Mi, Jeong-Hwan Seo, Yeon-Jeong Kim, Yun-Sun Kim, Hyun-Jeong Ko, et Chang-Yuil Kang. « The Restoration of Myeloid-Derived Suppressor Cells as Functional Antigen-Presenting Cells by NKT Cell Help and All-Trans-Retinoic Acid Treatment ». *International Journal of Cancer* 131, n° 3 (1 août 2012): 741-51. doi:10.1002/ijc.26411.
- Lee, Peter T., Kamel Benlagha, Luc Teyton, et Albert Bendelac. « Distinct Functional Lineages of Human V(alpha)24 Natural Killer T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 195, n° 5 (4 mars 2002): 637-41.
- Lee, Woo-Yong, Tara J. Moriarty, Connie H. Y. Wong, Hong Zhou, Robert M. Strieter, Nico van Rooijen, George Chaconas, et Paul Kubers. « An Intravascular Immune Response to *Borrelia burgdorferi* Involves Kupffer Cells and iNKT Cells ». *Nature Immunology* 11, n° 4 (avril 2010): 295-302. doi:10.1038/ni.1855.
- Lee, You Jeong, Keli L. Holzapfel, Jinfang Zhu, Stephen C. Jameson, et Kristin A. Hogquist. « Steady-State Production of IL-4 Modulates Immunity in Mouse Strains and Is Determined by Lineage Diversity of iNKT Cells ». *Nature Immunology* 14, n° 11 (novembre 2013): 1146-54. doi:10.1038/ni.2731.
- Lehuen, A., O. Lantz, L. Beaudoin, V. Laloux, C. Carnaud, A. Bendelac, J. F. Bach, et R. C. Monteiro. « Overexpression of Natural Killer T Cells Protects Valpha14- Jalpha281

- Transgenic Nonobese Diabetic Mice against Diabetes ». *The Journal of Experimental Medicine* 188, n° 10 (16 novembre 1998): 1831-39.
- Leite-De-Moraes, M. C., A. Hameg, A. Arnould, F. Machavoine, Y. Koezuka, E. Schneider, A. Herbelin, et M. Dy. « A Distinct IL-18-Induced Pathway to Fully Activate NK T Lymphocytes Independently from TCR Engagement ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163, n° 11 (1 décembre 1999): 5871-76.
- Leleux, Jardin, et Krishnendu Roy. « Micro and Nanoparticle-Based Delivery Systems for Vaccine Immunotherapy: An Immunological and Materials Perspective ». *Advanced Healthcare Materials* 2, n° 1 (janvier 2013): 72-94. doi:10.1002/adhm.201200268.
- Levy, Ofer, Jordan S. Orange, Patricia Hibberd, Sharon Steinberg, Phillip LaRussa, Adriana Weinberg, S. Brian Wilson, et al. « Disseminated Varicella Infection due to the Vaccine Strain of Varicella-Zoster Virus, in a Patient with a Novel Deficiency in Natural Killer T Cells ». *The Journal of Infectious Diseases* 188, n° 7 (1 octobre 2003): 948-53. doi:10.1086/378503.
- Li, Jessica, Fatma Ahmet, Lucy C. Sullivan, Andrew G. Brooks, Stephen J. Kent, Robert De Rose, Andres M. Salazar, et al. « Antibodies Targeting Clec9A Promote Strong Humoral Immunity without Adjuvant in Mice and Non-Human Primates ». *European Journal of Immunology* 45, n° 3 (mars 2015): 854-64. doi:10.1002/eji.201445127.
- Li, Xiangming, Masakazu Fujio, Masakazu Imamura, Douglass Wu, Sandhya Vasan, Chi-Huey Wong, David D. Ho, et Moriya Tsuji. « Design of a Potent CD1d-Binding NKT Cell Ligand as a Vaccine Adjuvant ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, n° 29 (20 juillet 2010): 13010-15. doi:10.1073/pnas.1006662107.
- Li, Xiangming, Takayuki Shiratsuchi, Guangwu Chen, Paolo Dellabona, Giulia Casorati, Richard W. Franck, et Moriya Tsuji. « Invariant TCR rather than CD1d Shapes the Preferential Activities of C-Glycoside Analogues against Human versus Murine Invariant NKT Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183, n° 7 (1 octobre 2009): 4415-21. doi:10.4049/jimmunol.0901021.
- Li, Yunsen, Prakash Thapa, David Hawke, Yuji Kondo, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa, Fong-Fu Hsu, et al. « Immunologic Glycosphingolipidomics and NKT Cell Development in Mouse Thymus ». *Journal of Proteome Research* 8, n° 6 (juin 2009): 2740-51. doi:10.1021/pr801040h.
- Link, Alexander, Franziska Zabel, Yvonne Schnetzler, Alexander Titz, Frank Brombacher, et Martin F. Bachmann. « Innate Immunity Mediates Follicular Transport of Particulate but Not Soluble Protein Antigen ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188, n° 8 (15 avril 2012): 3724-33. doi:10.4049/jimmunol.1103312.
- Lisbonne, Mariette, Séverine Diem, Alexandre de Castro Keller, Jean Lefort, Luiza M. Araujo, Patricia Hachem, Jean-Marie Fourneau, et al. « Cutting Edge: Invariant V Alpha 14 NKT Cells Are Required for Allergen-Induced Airway Inflammation and Hyperreactivity in an Experimental Asthma Model ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171, n° 4 (15 août 2003): 1637-41.
- Liu, Daofeng, Liping Song, Jie Wei, Amy N. Courtney, Xiuhua Gao, Ekaterina Marinova, Linjie Guo, et al. « IL-15 Protects NKT Cells from Inhibition by Tumor-Associated Macrophages and Enhances Antimetastatic Activity ». *The Journal of Clinical Investigation* 122, n° 6 (juin 2012): 2221-33. doi:10.1172/JCI59535.
- Liu, Kang, Juliana Idoyaga, Anna Charalambous, Shin-Ichiro Fujii, Anthony Bonito, Jose Mordoh, Rosa Wainstok, Xue-Feng Bai, Yang Liu, et Ralph M. Steinman. « Innate NKT Lymphocytes Confer Superior Adaptive Immunity via Tumor-Capturing Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 202, n° 11 (5 décembre 2005): 1507-16. doi:10.1084/jem.20050956.
- Longo, Dan L. "New Therapies for Castration-Resistant Prostate Cancer." *The New England Journal of Medicine* 363, no. 5 (July 29, 2010): 479–81. doi:10.1056/NEJMe1006300.

- Lu, Xuequan, Liping Song, Leonid S. Metelitsa, et Robert Bittman. « Synthesis and Evaluation of an Alpha-C-Galactosylceramide Analogue That Induces Th1-Biased Responses in Human Natural Killer T Cells ». *ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology* 7, n° 11 (novembre 2006): 1750-56. doi:10.1002/cbic.200600197.
- Lund, Jennifer M., Melissa M. Linehan, Norifumi Iijima, et Akiko Iwasaki. « Cutting Edge: Plasmacytoid Dendritic Cells Provide Innate Immune Protection against Mucosal Viral Infection in Situ ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177, n° 11 (1 décembre 2006): 7510-14.
- Lynch, Lydia, Donal O'Shea, Desmond C. Winter, Justin Geoghegan, Derek G. Doherty, et Cliona O'Farrelly. « Invariant NKT Cells and CD1d(+) Cells Amass in Human Omentum and Are Depleted in Patients with Cancer and Obesity ». *European Journal of Immunology* 39, n° 7 (juillet 2009): 1893-1901. doi:10.1002/eji.200939349.
- Lynch, Lydia, Michael Nowak, Bindu Varghese, Justice Clark, Andrew E. Hogan, Vasillis Toxavidis, Steven P. Balk, Donal O'Shea, Cliona O'Farrelly, et Mark A. Exley. « Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder through Regulatory Cytokine Production ». *Immunity* 37, n° 3 (21 septembre 2012): 574-87. doi:10.1016/j.immuni.2012.06.016.
- Lynch, Lydia, Xavier Michelet, Sai Zhang, Patrick J. Brennan, Ashley Moseman, Chantel Lester, Gurdyal Besra, et al. « Regulatory iNKT Cells Lack Expression of the Transcription Factor PLZF and Control the Homeostasis of T(reg) Cells and Macrophages in Adipose Tissue ». *Nature Immunology* 16, n° 1 (janvier 2015): 85-95. doi:10.1038/ni.3047.
- Macho-Fernandez, Elodie, Luis Javier Cruz, Reem Ghinnagow, Josette Fontaine, Emilie Bialecki, Benoit Frisch, François Trottein, et Christelle Faveeuw. « Targeted Delivery of α -Galactosylceramide to CD8 α + Dendritic Cells Optimizes Type I NKT Cell-Based Antitumor Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193, n° 2 (15 juillet 2014): 961-69. doi:10.4049/jimmunol.1303029.
- Mallevaey, Thierry, Josette Fontaine, Laetitia Breuilh, Christophe Paget, Alexandre Castro-Keller, Catherine Vendeville, Monique Capron, Maria Leite-de-Moraes, François Trottein, et Christelle Faveeuw. « Invariant and Noninvariant Natural Killer T Cells Exert Opposite Regulatory Functions on the Immune Response during Murine Schistosomiasis ». *Infection and Immunity* 75, n° 5 (mai 2007): 2171-80. doi:10.1128/IAI.01178-06.
- Manolova, Vania, Anna Flace, Monika Bauer, Katrin Schwarz, Philippe Saudan, et Martin F. Bachmann. « Nanoparticles Target Distinct Dendritic Cell Populations according to Their Size ». *European Journal of Immunology* 38, n° 5 (mai 2008): 1404-13. doi:10.1002/eji.200737984.
- Maricic, Igor, Huiming Sheng, Idania Marrero, Ekihiro Seki, Tatiana Kisseleva, Som Chaturvedi, Natasha Molle, Stephanie A. Mathews, Bin Gao, et Vipin Kumar. « Inhibition of Type I Natural Killer T Cells by Retinoids or Following Sulfatide-Mediated Activation of Type II Natural Killer T Cells Attenuates Alcoholic Liver Disease in Mice ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61, n° 4 (avril 2015): 1357-69. doi:10.1002/hep.27632.
- Maricic, Igor, Ramesh Halder, Felix Bischof, et Vipin Kumar. « Dendritic Cells and Anergic Type I NKT Cells Play a Crucial Role in Sulfatide-Mediated Immune Regulation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193, n° 3 (1 août 2014): 1035-46. doi:10.4049/jimmunol.1302898.
- Marrero, Idania, Randle Ware, et Vipin Kumar. « Type II NKT Cells in Inflammation, Autoimmunity, Microbial Immunity, and Cancer ». *Frontiers in Immunology* 6 (2015): 316. doi:10.3389/fimmu.2015.00316.
- Mars, Lennart T., Anne-Sophie Gautron, Jan Novak, Lucie Beaudoin, Julien Diana, Roland S. Liblau, et Agnès Lehuen. « Invariant NKT Cells Regulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Infiltrate the Central Nervous System in a CD1d-

- Independent Manner ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181, n° 4 (15 août 2008): 2321-29.
- Mars, Lennart T., Véronique Laloux, Karine Goude, Sabine Desbois, Abdelhadi Saoudi, Luc Van Kaer, Hans Lassmann, André Herbelin, Agnès Lehuen, et Roland S. Liblau. « Cutting Edge: V Alpha 14-J Alpha 281 NKT Cells Naturally Regulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Nonobese Diabetic Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168, n° 12 (15 juin 2002): 6007-11.
- Masson, Frederick, Margherita Ghisi, Joanna R. Groom, Axel Kallies, Cyril Seillet, Ricky W. Johnstone, Stephen L. Nutt, et Gabrielle T. Belz. « Id2 Represses E2A-Mediated Activation of IL-10 Expression in T Cells ». *Blood* 123, n° 22 (29 mai 2014): 3420-28. doi:10.1182/blood-2014-03-561456.
- Matangkasombut, Ponpan, Wilawan Chan-In, Anunya Opasawaschai, Pisut Pongchaikul, Nattaya Tangthawornchaikul, Sirijitt Vasanawathana, Wannee Limpitikul, et al. « Invariant NKT Cell Response to Dengue Virus Infection in Human ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, n° 6 (juin 2014): e2955. doi:10.1371/journal.pntd.0002955.
- Matricardi, P. M., F. Rosmini, S. Riondino, M. Fortini, L. Ferrigno, M. Rapicetta, et S. Bonini. « Exposure to Foodborne and Orofecal Microbes versus Airborne Viruses in Relation to Atopy and Allergic Asthma: Epidemiological Study ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 320, n° 7232 (12 février 2000): 412-17.
- Matsuda, J. L., O. V. Naidenko, L. Gapin, T. Nakayama, M. Taniguchi, C. R. Wang, Y. Koezuka, et M. Kronenberg. « Tracking the Response of Natural Killer T Cells to a Glycolipid Antigen Using CD1d Tetramers ». *The Journal of Experimental Medicine* 192, n° 5 (4 septembre 2000): 741-54.
- Matsuda, Jennifer L., Qianjun Zhang, Rachel Ndonge, Stewart K. Richardson, Amy R. Howell, et Laurent Gapin. « T-Bet Concomitantly Controls Migration, Survival, and Effector Functions during the Development of V α 14i NKT Cells ». *Blood* 107, n° 7 (1 avril 2006): 2797-2805. doi:10.1182/blood-2005-08-3103.
- Matsuda, Jennifer L., Thaddeus C. George, James Hagman, et Laurent Gapin. « Temporal Dissection of T-Bet Functions ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178, n° 6 (15 mars 2007): 3457-65.
- Matsuda, Jennifer L., Thierry Mallevaey, James Scott-Browne, et Laurent Gapin. « CD1d-Restricted iNKT Cells, the "Swiss-Army Knife" of the Immune System ». *Current Opinion in Immunology* 20, n° 3 (juin 2008): 358-68. doi:10.1016/j.coi.2008.03.018.
- Matsumoto, G., Y. Omi, U. Lee, T. Nishimura, J. Shindo, et J. M. Penninger. « Adhesion Mediated by LFA-1 Is Required for Efficient IL-12-Induced NK and NKT Cell Cytotoxicity ». *European Journal of Immunology* 30, n° 12 (décembre 2000): 3723-31. doi:10.1002/1521-4141(200012)30:12<3723::AID-IMMU3723>3.0.CO;2-9.
- Mattarollo, Stephen R., Alison C. West, Kim Steegh, Helene Duret, Christophe Paget, Ben Martin, Geoffrey M. Matthews, et al. « NKT Cell Adjuvant-Based Tumor Vaccine for Treatment of Myc Oncogene-Driven Mouse B-Cell Lymphoma ». *Blood* 120, n° 15 (11 octobre 2012): 3019-29. doi:10.1182/blood-2012-04-426643.
- Mattarollo, Stephen R., Kim Steegh, Ming Li, Helene Duret, Shin Foong Ngiow, et Mark J. Smyth. « Transient Foxp3(+) Regulatory T-Cell Depletion Enhances Therapeutic Anticancer Vaccination Targeting the Immune-Stimulatory Properties of NKT Cells ». *Immunology and Cell Biology* 91, n° 1 (janvier 2013): 105-14. doi:10.1038/icb.2012.58.
- Mattner, Jochen, Kristin L. Debord, Nahed Ismail, Randal D. Goff, Carlos Cantu, Dapeng Zhou, Pierre Saint-Mezard, et al. « Exogenous and Endogenous Glycolipid Antigens Activate NKT Cells during Microbial Infections ». *Nature* 434, n° 7032 (24 mars 2005): 525-29. doi:10.1038/nature03408.

- McKee, Sara J., Vivienne L. Young, Fiona Clow, Colin M. Hayman, Margaret A. Baird, Ian F. Hermans, Sarah L. Young, et Vernon K. Ward. « Virus-like Particles and α -Galactosylceramide Form a Self-Adjuvanting Composite Particle That Elicits Anti-Tumor Responses ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 159, n° 3 (10 mai 2012): 338-45. doi:10.1016/j.jconrel.2012.02.015.
- McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, et al. « Mice Lacking flt3 Ligand Have Deficient Hematopoiesis Affecting Hematopoietic Progenitor Cells, Dendritic Cells, and Natural Killer Cells ». *Blood* 95, n° 11 (1 juin 2000): 3489-97.
- Medvedev, A. E., A. C. Johnsen, J. Haux, B. Steinkjer, K. Egeberg, D. H. Lynch, A. Sundan, et T. Espevik. « Regulation of Fas and Fas-Ligand Expression in NK Cells by Cytokines and the Involvement of Fas-Ligand in NK/LAK Cell-Mediated Cytotoxicity ». *Cytokine* 9, n° 6 (juin 1997): 394-404. doi:10.1006/cyto.1996.0181.
- Mellman, Ira, George Coukos, and Glenn Dranoff. « Cancer Immunotherapy Comes of Age. » *Nature* 480, no. 7378 (December 21, 2011): 480–89. doi:10.1038/nature10673.
- Mendiratta, S. K., W. D. Martin, S. Hong, A. Boesteanu, S. Joyce, et L. Van Kaer. « CD1d1 Mutant Mice Are Deficient in Natural T Cells That Promptly Produce IL-4 ». *Immunity* 6, n° 4 (avril 1997): 469-77.
- Meredith, Matthew M., Kang Liu, Guillaume Darrasse-Jeze, Alice O. Kamphorst, Heidi A. Schreiber, Pierre Guermonprez, Juliana Idoyaga, et al. « Expression of the Zinc Finger Transcription Factor zDC (Zbtb46, Btbd4) Defines the Classical Dendritic Cell Lineage ». *The Journal of Experimental Medicine* 209, n° 6 (4 juin 2012): 1153-65. doi:10.1084/jem.20112675.
- Merzougui, Nawel, Roland Kratzer, Loredana Saveanu, et Peter van Endert. « A Proteasome-Dependent, TAP-Independent Pathway for Cross-Presentation of Phagocytosed Antigen ». *EMBO Reports* 12, n° 12 (1 décembre 2011): 1257-64. doi:10.1038/embor.2011.203.
- Metelitsa, L. S., K. I. Weinberg, P. D. Emanuel, et R. C. Seeger. « Expression of CD1d by Myelomonocytic Leukemias Provides a Target for Cytotoxic NKT Cells ». *Leukemia* 17, n° 6 (juin 2003): 1068-77. doi:10.1038/sj.leu.2402943.
- Meyer-Wentrup, Friederike, Alessandra Cambi, Ben Joosten, Maaïke W. Looman, I. Jolanda M. de Vries, Carl G. Figdor, et Gosse J. Adema. « DCIR Is Endocytosed into Human Dendritic Cells and Inhibits TLR8-Mediated Cytokine Production ». *Journal of Leukocyte Biology* 85, n° 3 (mars 2009): 518-25. doi:10.1189/jlb.0608352.
- Meyer-Wentrup, Friederike, Daniel Benitez-Ribas, Paul J. Tacke, Cornelis J. A. Punt, Carl G. Figdor, I. Jolanda M. de Vries, et Gosse J. Adema. « Targeting DCIR on Human Plasmacytoid Dendritic Cells Results in Antigen Presentation and Inhibits IFN-Alpha Production ». *Blood* 111, n° 8 (15 avril 2008): 4245-53. doi:10.1182/blood-2007-03-081398.
- Michel, Marie-Laure, Alexandre Castro Keller, Christophe Paget, Masakazu Fujio, François Trottein, Paul B. Savage, Chi-Huey Wong, Elke Schneider, Michel Dy, et Maria C. Leite-de-Moraes. « Identification of an IL-17-Producing NK1.1(neg) iNKT Cell Population Involved in Airway Neutrophilia ». *The Journal of Experimental Medicine* 204, n° 5 (14 mai 2007): 995-1001. doi:10.1084/jem.20061551.
- Michel, Marie-Laure, Daniella Mendes-da-Cruz, Alexandre Castro Keller, Matthias Lochner, Elke Schneider, Michel Dy, Gérard Eberl, et Maria C. Leite-de-Moraes. « Critical Role of ROR- γ t in a New Thymic Pathway Leading to IL-17-Producing Invariant NKT Cell Differentiation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n° 50 (16 décembre 2008): 19845-50. doi:10.1073/pnas.0806472105.
- Miller, Jennifer C., Brian D. Brown, Tal Shay, Emmanuel L. Gautier, Vladimir Jovic, Ariella Cohain, Gaurav Pandey, et al. « Deciphering the Transcriptional Network of the

- Dendritic Cell Lineage ». *Nature Immunology* 13, n° 9 (septembre 2012): 888-99. doi:10.1038/ni.2370.
- Moll, Markus, Carlotta Kuylenstierna, Veronica D. Gonzalez, Sofia K. Andersson, Lidija Bosnjak, Anders Sönnnerborg, Máire F. Quigley, et Johan K. Sandberg. « Severe Functional Impairment and Elevated PD-1 Expression in CD1d-Restricted NKT Cells Retained during Chronic HIV-1 Infection ». *European Journal of Immunology* 39, n° 3 (mars 2009): 902-11. doi:10.1002/eji.200838780.
- Molling, Johan W., Jacqueline A. E. Langius, Johannes A. Langendijk, C. René Leemans, Hetty J. Bontkes, Hans J. J. van der Vliet, B. Mary E. von Blomberg, Rik J. Scheper, et Alfons J. M. van den Eertwegh. « Low Levels of Circulating Invariant Natural Killer T Cells Predict Poor Clinical Outcome in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, n° 7 (1 mars 2007): 862-68. doi:10.1200/JCO.2006.08.5787.
- Molling, Johan W., Wendy Kölgen, Hans J. J. van der Vliet, Martijn F. Boomsma, Hinke Kruizenga, Carolien H. Smorenburg, Barbara G. Molenkamp, et al. « Peripheral Blood IFN-Gamma-Secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT Cell Numbers Are Decreased in Cancer Patients Independent of Tumor Type or Tumor Load ». *International Journal of Cancer* 116, n° 1 (10 août 2005): 87-93. doi:10.1002/ijc.20998.
- Monteiro, Marta, Catarina F. Almeida, Ana Agua-Doce, et Luis Graca. « Induced IL-17-Producing Invariant NKT Cells Require Activation in Presence of TGF- β and IL-1 β ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190, n° 2 (15 janvier 2013): 805-11. doi:10.4049/jimmunol.1201010.
- Monteiro, Marta, Catarina F. Almeida, Marta Caridade, Julie C. Ribot, Joana Duarte, Ana Agua-Doce, Ivonne Wollenberg, Bruno Silva-Santos, et Luis Graca. « Identification of Regulatory Foxp3+ Invariant NKT Cells Induced by TGF-Beta ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185, n° 4 (15 août 2010): 2157-63. doi:10.4049/jimmunol.1000359.
- Monteiro, Marta, et Luis Graca. « iNKT Cells: Innate Lymphocytes with a Diverse Response ». *Critical Reviews in Immunology* 34, n° 1 (2014): 81-90.
- Moreno, María, Johan W. Molling, Silvia von Mensdorff-Pouilly, René H. M. Verheijen, Erik Hooijberg, Duco Kramer, Anneke W. Reurs, et al. « IFN-Gamma-Producing Human Invariant NKT Cells Promote Tumor-Associated Antigen-Specific Cytotoxic T Cell Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181, n° 4 (15 août 2008): 2446-54.
- Motohashi, Shinichiro, Aki Ishikawa, Eiichi Ishikawa, Mizuto Otsuji, Toshihiko Iizasa, Hideki Hanaoka, Naomi Shimizu, et al. « A Phase I Study of in Vitro Expanded Natural Killer T Cells in Patients with Advanced and Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, n° 20 Pt 1 (15 octobre 2006): 6079-86. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0114.
- Motohashi, Shinichiro, Kaoru Nagato, Naoki Kunii, Heizaburo Yamamoto, Kazuki Yamasaki, Kohsuke Okita, Hideki Hanaoka, et al. « A Phase I-II Study of Alpha-Galactosylceramide-Pulsed IL-2/GM-CSF-Cultured Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Advanced and Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 4 (15 février 2009): 2492-2501. doi:10.4049/jimmunol.0800126.
- Motomura, Yasutaka, Hiroshi Kitamura, Atsushi Hijikata, Yuko Matsunaga, Koichiro Matsumoto, Hiromasa Inoue, Koji Atarashi, et al. « The Transcription Factor E4BP4 Regulates the Production of IL-10 and IL-13 in CD4+ T Cells ». *Nature Immunology* 12, n° 5 (mai 2011): 450-59. doi:10.1038/ni.2020.

- Mundargi, Raghavendra C., V. Ramesh Babu, Vidhya Rangaswamy, Pradip Patel, et Tejraj M. Aminabhavi. « Nano/Micro Technologies for Delivering Macromolecular Therapeutics Using poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) and Its Derivatives ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 125, n° 3 (11 février 2008): 193-209. doi:10.1016/j.jconrel.2007.09.013.
- Mycko, Marcin P., Isabel Ferrero, Anne Wilson, Wei Jiang, Teresa Bianchi, Andreas Trumpp, et H. Robson MacDonald. « Selective Requirement for c-Myc at an Early Stage of V(alpha)14i NKT Cell Development ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 8 (15 avril 2009): 4641-48. doi:10.4049/jimmunol.0803394.
- Nagaraj, S., C. Ziske, J. Strehl, D. Messmer, T. Sauerbruch, et I. G. H. Schmidt-Wolf. « Dendritic Cells Pulsed with Alpha-Galactosylceramide Induce Anti-Tumor Immunity against Pancreatic Cancer in Vivo ». *International Immunology* 18, n° 8 (août 2006): 1279-83. doi:10.1093/intimm/dx1059.
- Nagarajan, Niranjana A., et Mitchell Kronenberg. « Invariant NKT Cells Amplify the Innate Immune Response to Lipopolysaccharide ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178, n° 5 (1 mars 2007): 2706-13.
- Nagato, Kaoru, Shinichiro Motohashi, Fumihiko Ishibashi, Kohsuke Okita, Kazuki Yamasaki, Yasumitsu Moriya, Hidehisa Hoshino, et al. « Accumulation of Activated Invariant Natural Killer T Cells in the Tumor Microenvironment after α -Galactosylceramide-Pulsed Antigen Presenting Cells ». *Journal of Clinical Immunology* 32, n° 5 (octobre 2012): 1071-81. doi:10.1007/s10875-012-9697-9.
- Naik, Shalin H., Priyanka Sathe, Hae-Young Park, Donald Metcalf, Anna I. Proietto, Aleksander Dakic, Sebastian Carotta, et al. « Development of Plasmacytoid and Conventional Dendritic Cell Subtypes from Single Precursor Cells Derived in Vitro and in Vivo ». *Nature Immunology* 8, n° 11 (novembre 2007): 1217-26. doi:10.1038/ni1522.
- Nair, Shiny, Chandra Sekhar Boddupalli, Rakesh Verma, Jun Liu, Ruhua Yang, Gregory M. Pastores, Pramod K. Mistry, et Madhav V. Dhodapkar. « Type II NKT-TFH Cells against Gaucher Lipids Regulate B-Cell Immunity and Inflammation ». *Blood* 125, n° 8 (19 février 2015): 1256-71. doi:10.1182/blood-2014-09-600270.
- Najera Chuc, Alicia E., Laura A. Montiel Cervantes, Flor Pérez Retiguin, Jorge Vela Ojeda, et Elba Reyes Maldonado. « Low Number of Invariant NKT Cells Is Associated with Poor Survival in Acute Myeloid Leukemia ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 138, n° 8 (août 2012): 1427-32. doi:10.1007/s00432-012-1251-x.
- Nakagawa, R., I. Nagafune, Y. Tazunoki, H. Ehara, H. Tomura, R. Iijima, K. Motoki, M. Kamishohara, et S. Seki. « Mechanisms of the Antimetastatic Effect in the Liver and of the Hepatocyte Injury Induced by Alpha-Galactosylceramide in Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166, n° 11 (1 juin 2001): 6578-84.
- Nakagawa, R., K. Motoki, H. Nakamura, H. Ueno, R. Iijima, A. Yamauchi, S. Tsuyuki, T. Inamoto, et Y. Koezuka. « Antitumor Activity of Alpha-Galactosylceramide, KRN7000, in Mice with EL-4 Hepatic Metastasis and Its Cytokine Production ». *Oncology Research* 10, n° 11-12 (1998): 561-68.
- Nakagawa, R., K. Motoki, H. Ueno, R. Iijima, H. Nakamura, E. Kobayashi, A. Shimosaka, et Y. Koezuka. « Treatment of Hepatic Metastasis of the colon26 Adenocarcinoma with an Alpha-Galactosylceramide, KRN7000 ». *Cancer Research* 58, n° 6 (15 mars 1998): 1202-7.
- Neumann, Silke, Katie Young, Benji Compton, Regan Anderson, Gavin Painter, et Sarah Hook. « Synthetic TRP2 Long-Peptide and α -Galactosylceramide Formulated into Cationic Liposomes Elicit CD8+ T-Cell Responses and Prevent Tumour Progression ». *Vaccine* 33, n° 43 (26 octobre 2015): 5838-44. doi:10.1016/j.vaccine.2015.08.083.

- Nichols, Kim E., Jamie Hom, Shun-You Gong, Arupa Ganguly, Cindy S. Ma, Jennifer L. Cannons, Stuart G. Tangye, Pamela L. Schwartzberg, Gary A. Koretzky, et Paul L. Stein. « Regulation of NKT Cell Development by SAP, the Protein Defective in XLP ». *Nature Medicine* 11, n° 3 (mars 2005): 340-45. doi:10.1038/nm1189.
- Nicol, Andrew J., Andrea Tazbirkova, et Mie Nieda. « Comparison of Clinical and Immunological Effects of Intravenous and Intradermal Administration of α -Galactosylceramide (KRN7000)-Pulsed Dendritic Cells ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17, n° 15 (1 août 2011): 5140-51. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3105.
- Nieda, Mie, Miki Okai, Andrea Tazbirkova, Henry Lin, Ayako Yamaura, Kazuki Ide, Rick Abraham, Takeo Juji, David J. Macfarlane, et Andrew J. Nicol. « Therapeutic Activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT Cells in Human Subjects Results in Highly Coordinated Secondary Activation of Acquired and Innate Immunity ». *Blood* 103, n° 2 (15 janvier 2004): 383-89. doi:10.1182/blood-2003-04-1155.
- Nishikawa, Hiroyoshi, Takuma Kato, Koji Tanida, Atsunori Hiasa, Isao Tawara, Hiroaki Ikeda, Yoshinori Ikarashi, et al. « CD4+ CD25+ T Cells Responding to Serologically Defined Autoantigens Suppress Antitumor Immune Responses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, n° 19 (16 septembre 2003): 10902-6. doi:10.1073/pnas.1834479100.
- Novak, Jan, et Agnes Lehuen. « Mechanism of Regulation of Autoimmunity by iNKT Cells ». *Cytokine* 53, n° 3 (mars 2011): 263-70. doi:10.1016/j.cyto.2010.11.001.
- O'Reilly, Vincent, Shijuan G. Zeng, Gabriel Bricard, Ann Atzberger, Andrew E. Hogan, John Jackson, Conleth Feighery, Steven A. Porcelli, et Derek G. Doherty. « Distinct and Overlapping Effector Functions of Expanded Human CD4+, CD8 α + and CD4-CD8 α - Invariant Natural Killer T Cells ». *PLoS One* 6, n° 12 (2011): e28648. doi:10.1371/journal.pone.0028648.
- Oh, Keunhee, Sanghee Kim, Se-Ho Park, Hua Gu, Derry Roopenian, Doo Hyun Chung, Yon Su Kim, et Dong-Sup Lee. « Direct Regulatory Role of NKT Cells in Allogeneic Graft Survival Is Dependent on the Quantitative Strength of Antigenicity ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174, n° 4 (15 février 2005): 2030-36.
- Oh, Sae Jin, et Doo Hyun Chung. « Invariant NKT Cells Producing IL-4 or IL-10, but Not IFN-Gamma, Inhibit the Th1 Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Whereas None of These Cells Inhibits the Th17 Response ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186, n° 12 (15 juin 2011): 6815-21. doi:10.4049/jimmunol.1003916.
- Oki, Shinji, Chiharu Tomi, Takashi Yamamura, et Sachiko Miyake. « Preferential T(h)2 Polarization by OCH Is Supported by Incompetent NKT Cell Induction of CD40L and Following Production of Inflammatory Cytokines by Bystander Cells in Vivo ». *International Immunology* 17, n° 12 (décembre 2005): 1619-29. doi:10.1093/intimm/dxh342.
- Olson, Chris M., Tonya C. Bates, Hooman Izadi, Justin D. Radolf, Sally A. Huber, Jonathan E. Boyson, et Juan Anguita. « Local Production of IFN-Gamma by Invariant NKT Cells Modulates Acute Lyme Carditis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 6 (15 mars 2009): 3728-34. doi:10.4049/jimmunol.0804111.
- Onai, Nobuyuki, Aya Obata-Onai, Michael A. Schmid, Toshiaki Ohteki, David Jarrossay, et Markus G. Manz. « Identification of Clonogenic Common Flt3+M-CSFR+ Plasmacytoid and Conventional Dendritic Cell Progenitors in Mouse Bone Marrow ». *Nature Immunology* 8, n° 11 (novembre 2007): 1207-16. doi:10.1038/ni1518.
- Ortaldo, John R., Howard A. Young, Robin T. Winkler-Pickett, Earl W. Bere, William J. Murphy, et Robert H. Wiltrot. « Dissociation of NKT Stimulation, Cytokine Induction, and NK Activation in Vivo by the Use of Distinct TCR-Binding Ceramides ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172, n° 2 (15 janvier 2004): 943-53.

- Ostrand-Rosenberg, Suzanne, et Pratima Sinha. « Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 8 (15 avril 2009): 4499-4506. doi:10.4049/jimmunol.0802740.
- Oyewumi, Moses O., Amit Kumar, et Zhengrong Cui. « Nano-Microparticles as Immune Adjuvants: Correlating Particle Sizes and the Resultant Immune Responses ». *Expert Review of Vaccines* 9, n° 9 (septembre 2010): 1095-1107. doi:10.1586/erv.10.89.
- Padte, Neal N., Mar Boente-Carrera, Chasity D. Andrews, Jenny McManus, Brooke F. Grasperge, Agegnehu Gettie, Jordana G. Coelho-dos-Reis, et al. « A Glycolipid Adjuvant, 7DW8-5, Enhances CD8+ T Cell Responses Induced by an Adenovirus-Vectored Malaria Vaccine in Non-Human Primates ». *PloS One* 8, n° 10 (2013): e78407. doi:10.1371/journal.pone.0078407.
- Paget, Christophe, Stoyan Ivanov, Josette Fontaine, Joelle Renneson, Fany Blanc, Muriel Pichavant, Laure Dumoutier, et al. « Interleukin-22 Is Produced by Invariant Natural Killer T Lymphocytes during Influenza A Virus Infection: Potential Role in Protection against Lung Epithelial Damages ». *The Journal of Biological Chemistry* 287, n° 12 (16 mars 2012): 8816-29. doi:10.1074/jbc.M111.304758.
- Paget, Christophe, Thierry Malleval, Anneliese O. Speak, David Torres, Josette Fontaine, Kathleen C. F. Sheehan, Monique Capron, et al. « Activation of Invariant NKT Cells by Toll-like Receptor 9-Stimulated Dendritic Cells Requires Type I Interferon and Charged Glycosphingolipids ». *Immunity* 27, n° 4 (octobre 2007): 597-609. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.017.
- Parekh, Vrajesh V., Michael T. Wilson, Danyvid Olivares-Villagómez, Avneesh K. Singh, Lan Wu, Chyung-Ru Wang, Sebastian Joyce, et Luc Van Kaer. « Glycolipid Antigen Induces Long-Term Natural Killer T Cell Anergy in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 115, n° 9 (septembre 2005): 2572-83. doi:10.1172/JCI24762.
- Parekh, Vrajesh V., Saif Lalani, et Luc Van Kaer. « The in Vivo Response of Invariant Natural Killer T Cells to Glycolipid Antigens ». *International Reviews of Immunology* 26, n° 1-2 (avril 2007): 31-48. doi:10.1080/08830180601070179.
- Parekh, Vrajesh V., Saif Lalani, Sungjune Kim, Ramesh Halder, Miyuki Azuma, Hideo Yagita, Vipin Kumar, Lan Wu, et Luc Van Kaer. « PD-1/PD-L Blockade Prevents Anergy Induction and Enhances the Anti-Tumor Activities of Glycolipid-Activated Invariant NKT Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 5 (1 mars 2009): 2816-26. doi:10.4049/jimmunol.0803648.
- Park, Hae-Young, Amanda Light, Mireille H. Lahoud, Irina Caminschi, David M. Tarlinton, et Ken Shortman. « Evolution of B Cell Responses to Clec9A-Targeted Antigen ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191, n° 10 (15 novembre 2013): 4919-25. doi:10.4049/jimmunol.1301947.
- Park, Se-Ho, Tim Kynin, Albert Bendelac, et Claude Carnaud. « The Contribution of NKT Cells, NK Cells, and Other Gamma-Chain-Dependent Non-T Non-B Cells to IL-12-Mediated Rejection of Tumors ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170, n° 3 (1 février 2003): 1197-1201.
- Park, Yeong-Min, Seung Jun Lee, Young Seob Kim, Moon Hee Lee, Gil Sun Cha, In Duk Jung, Tae Heung Kang, and Hee Dong Han. "Nanoparticle-Based Vaccine Delivery for Cancer Immunotherapy." *Immune Network* 13, no. 5 (2013): 177. doi:10.4110/in.2013.13.5.177.
- Pasquier, Benoit, Luo Yin, Marie-Claude Fondanèche, Francis Relouzat, Coralie Bloch-Queyrat, Nathalie Lambert, Alain Fischer, Geneviève de Saint-Basile, et Sylvain Latour. « Defective NKT Cell Development in Mice and Humans Lacking the Adapter SAP, the X-Linked Lymphoproliferative Syndrome Gene Product ». *The Journal of Experimental Medicine* 201, n° 5 (7 mars 2005): 695-701. doi:10.1084/jem.20042432.
- Pei, Bo, Anneliese O. Speak, Dawn Shepherd, Terry Butters, Vincenzo Cerundolo, Frances M. Platt, et Mitchell Kronenberg. « Diverse Endogenous Antigens for Mouse NKT Cells: Self-Antigens That Are Not Glycosphingolipids ». *Journal of Immunology*

- (*Baltimore, Md.: 1950*) 186, n° 3 (1 février 2011): 1348-60. doi:10.4049/jimmunol.1001008.
- Pellicci, Daniel G., Adam P. Uldrich, Konstantinos Kyparissoudis, Nadine Y. Crowe, Andrew G. Brooks, Kirsten J. L. Hammond, Stephané Sidobre, Mitchell Kronenberg, Mark J. Smyth, et Dale I. Godfrey. « Intrathymic NKT Cell Development Is Blocked by the Presence of Alpha-Galactosylceramide ». *European Journal of Immunology* 33, n° 7 (juillet 2003): 1816-23. doi:10.1002/eji.200323894.
- Persson, Emma K., Heli Uronen-Hansson, Monika Semmrich, Aymeric Rivollier, Karin Hägerbrand, Jan Marsal, Sigurdur Gudjonsson, et al. « IRF4 Transcription-Factor-Dependent CD103(+)CD11b(+) Dendritic Cells Drive Mucosal T Helper 17 Cell Differentiation ». *Immunity* 38, n° 5 (23 mai 2013): 958-69. doi:10.1016/j.immuni.2013.03.009.
- Petersen, Troels R., Dianne Sika-Paotonu, Deborah A. Knight, Helen M. A. Simkins, et Ian F. Hermans. « Exploiting the Role of Endogenous Lymphoid-Resident Dendritic Cells in the Priming of NKT Cells and CD8+ T Cells to Dendritic Cell-Based Vaccines ». *PLoS One* 6, n° 3 (31 mars 2011): e17657. doi:10.1371/journal.pone.0017657.
- Picco, Gianfranco, Richard Beatson, Joyce Taylor-Papadimitriou, et Joy M. Burchell. « Targeting DNGR-1 (CLEC9A) with Antibody/MUC1 Peptide Conjugates as a Vaccine for Carcinomas ». *European Journal of Immunology* 44, n° 7 (juillet 2014): 1947-55. doi:10.1002/eji.201344076.
- Plantinga, Maud, Martin Williams, Manon Vanheerswynghels, Kim Deswarte, Filipe Branco-Madeira, Wendy Toussaint, Leen Vanhoutte, et al. « Conventional and Monocyte-Derived CD11b(+) Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen ». *Immunity* 38, n° 2 (21 février 2013): 322-35. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.016.
- Porubsky, Stefan, Anneliese O. Speak, Bruno Luckow, Vincenzo Cerundolo, Frances M. Platt, et Hermann-Josef Gröne. « Normal Development and Function of Invariant Natural Killer T Cells in Mice with Isoglobotrihexosylceramide (iGb3) Deficiency ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n° 14 (3 avril 2007): 5977-82. doi:10.1073/pnas.0611139104.
- Poulin, Lionel F., Yasmin Reyat, Heli Uronen-Hansson, Barbara U. Schraml, David Sancho, Kenneth M. Murphy, Ulf K. Håkansson, et al. « DNGR-1 Is a Specific and Universal Marker of Mouse and Human Batf3-Dependent Dendritic Cells in Lymphoid and Nonlymphoid Tissues ». *Blood* 119, n° 25 (21 juin 2012): 6052-62. doi:10.1182/blood-2012-01-406967.
- Poulin, Lionel Franz, Mariolina Salio, Emmanuel Griessinger, Fernando Anjos-Afonso, Ligia Craciun, Ji-Li Chen, Anna M. Keller, et al. « Characterization of Human DNGR-1+ BDCA3+ Leukocytes as Putative Equivalents of Mouse CD8alpha+ Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 207, n° 6 (7 juin 2010): 1261-71. doi:10.1084/jem.20092618.
- Preston, Claudia C., Matthew J. Maurer, Ann L. Oberg, Daniel W. Visscher, Kimberly R. Kalli, Lynn C. Hartmann, Ellen L. Goode, et Keith L. Knutson. « The Ratios of CD8+ T Cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T Cells Correlate with Poor Clinical Outcome in Human Serous Ovarian Cancer ». *PLoS One* 8, n° 11 (2013): e80063. doi:10.1371/journal.pone.0080063.
- Prevot, Nicolas, Kalyani Pyaram, Evan Bischoff, Jyoti Misra Sen, Jonathan D. Powell, et Cheong-Hee Chang. « Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 Regulates Invariant NKT Cell Development and Function Independent of Promyelocytic Leukemia Zinc-Finger ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194, n° 1 (1 janvier 2015): 223-30. doi:10.4049/jimmunol.1401985.
- Proietto, A. I., D. Mittag, A. W. Roberts, N. Sprigg, et L. Wu. « 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 ». *Cellular & Molecular Immunology* 9, n° 6 (novembre 2012): 446-54. doi:10.1038/cmi.2012.48.
- Pulendran, B., J. Banchereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, et al. « Flt3-Ligand and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Mobilize Distinct Human Dendritic Cell Subsets in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165, n° 1 (1 juillet 2000): 566-72.
- Rachitskaya, Aleksandra V., Anna M. Hansen, Reiko Horai, Zhuqing Li, Rafael Villasmil, Dror Luger, Robert B. Nussenblatt, et Rachel R. Caspi. « Cutting Edge: NKT Cells Constitutively Express IL-23 Receptor and ROR γ and Rapidly Produce IL-17 upon Receptor Ligation in an IL-6-Independent Fashion ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180, n° 8 (15 avril 2008): 5167-71.
- Rakhshandehroo, Maryam, Sanne M. W. Gijzel, Rasmus Siersbæk, Marjoleine F. Broekema, Colin de Haar, Henk S. Schipper, Marianne Boes, Susanne Mandrup, et Eric Kalkhoven. « CD1d-Mediated Presentation of Endogenous Lipid Antigens by Adipocytes Requires Microsomal Triglyceride Transfer Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 289, n° 32 (8 août 2014): 22128-39. doi:10.1074/jbc.M114.551242.
- Reibman, Joan, Michael Marmor, Joshua Filner, Maria-Elena Fernandez-Beros, Linda Rogers, Guillermo I. Perez-Perez, et Martin J. Blaser. « Asthma Is Inversely Associated with Helicobacter Pylori Status in an Urban Population ». *PLoS One* 3, n° 12 (2008): e4060. doi:10.1371/journal.pone.0004060.
- Reizis, Boris, Anna Bunin, Hiyaa S. Ghosh, Kanako L. Lewis, et Vanja Sisirak. « Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions ». *Annual Review of Immunology* 29 (2011): 163-83. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101345.
- Renukaradhya, Gourapura J., Masood A. Khan, Marcus Vieira, Wenjun Du, Jacquelyn Gervay-Hague, et Randy R. Brutkiewicz. « Type I NKT Cells Protect (and Type II NKT Cells Suppress) the Host's Innate Antitumor Immune Response to a B-Cell Lymphoma ». *Blood* 111, n° 12 (15 juin 2008): 5637-45. doi:10.1182/blood-2007-05-092866.
- Richter, Joshua, Natalia Neparidze, Lin Zhang, Shiny Nair, Tamara Monesmith, Ranjini Sundaram, Fred Miesowicz, Kavita M. Dhodapkar, et Madhav V. Dhodapkar. « Clinical Regressions and Broad Immune Activation Following Combination Therapy Targeting Human NKT Cells in Myeloma ». *Blood* 121, n° 3 (17 janvier 2013): 423-30. doi:10.1182/blood-2012-06-435503.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, et P. Matzinger. « A Conditioned Dendritic Cell Can Be a Temporal Bridge between a CD4+ T-Helper and a T-Killer Cell ». *Nature* 393, n° 6684 (4 juin 1998): 474-78. doi:10.1038/30989.
- Roark, J. H., S. H. Park, J. Jayawardena, U. Kavita, M. Shannon, et A. Bendelac. « CD1.1 Expression by Mouse Antigen-Presenting Cells and Marginal Zone B Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160, n° 7 (1 avril 1998): 3121-27.
- Robbins, Scott H., Thierry Walzer, Doulaye Dembélé, Christelle Thibault, Axel Defays, Gilles Bessou, Huichun Xu, et al. « Novel Insights into the Relationships between Dendritic Cell Subsets in Human and Mouse Revealed by Genome-Wide Expression Profiling ». *Genome Biology* 9, n° 1 (24 janvier 2008): R17. doi:10.1186/gb-2008-9-1-r17.
- Robert, Caroline, Luc Thomas, Igor Bondarenko, Steven O'Day, Jeffrey Weber, Claus Garbe, Celeste Lebbe, et al. "Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma." *New England Journal of Medicine* 364, no. 26 (June 30, 2011): 2517–26. doi:10.1056/NEJMoa1104621.

- Rosalia, Rodney A., Luis J. Cruz, Suzanne van Duikeren, Angelino T. Tromp, Ana L. Silva, Wim Jiskoot, Tanja de Gruijl, et al. « CD40-Targeted Dendritic Cell Delivery of PLGA-Nanoparticle Vaccines Induce Potent Anti-Tumor Responses ». *Biomaterials* 40 (février 2015): 88-97. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.053.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, R. M. Sherry, U. S. Kammula, M. S. Hughes, G. Q. Phan, D. E. Citrin, et al. "Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy." *Clinical Cancer Research* 17, no. 13 (July 1, 2011): 4550–57. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.
- Rosenberg, Steven A., Nicholas P. Restifo, James C. Yang, Richard A. Morgan, and Mark E. Dudley. "Adoptive Cell Transfer: A Clinical Path to Effective Cancer Immunotherapy." *Nature Reviews. Cancer* 8, no. 4 (April 2008): 299–308. doi:10.1038/nrc2355.
- Rossjohn, Jamie, Daniel G. Pellicci, Onisha Patel, Laurent Gapin, et Dale I. Godfrey. « Recognition of CD1d-Restricted Antigens by Natural Killer T Cells ». *Nature Reviews. Immunology* 12, n° 12 (décembre 2012): 845-57. doi:10.1038/nri3328.
- Sag, Duygu, Petra Krause, Catherine C. Hedrick, Mitchell Kronenberg, et Gerhard Wingender. « IL-10–producing NKT10 Cells Are a Distinct Regulatory Invariant NKT Cell Subset ». *Journal of Clinical Investigation* 124, n° 9 (2 septembre 2014): 3725-40. doi:10.1172/JCI72308.
- Salio, Mariolina, Anneliese O. Speak, Dawn Shepherd, Paolo Polzella, Petr A. Illarionov, Natacha Veerapen, Gurdyal S. Besra, Frances M. Platt, et Vincenzo Cerundolo. « Modulation of Human Natural Killer T Cell Ligands on TLR-Mediated Antigen-Presenting Cell Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n° 51 (18 décembre 2007): 20490-95. doi:10.1073/pnas.0710145104.
- Sánchez-Paulete, Alfonso R., Francisco J. Cueto, María Martínez-López, Sara Labiano, Aizea Morales-Kastresana, María E. Rodríguez-Ruiz, Maria Jure-Kunkel, et al. « Cancer Immunotherapy with Immunomodulatory Anti-CD137 and Anti-PD-1 Monoclonal Antibodies Requires BATF3-Dependent Dendritic Cells ». *Cancer Discovery* 6, n° 1 (janvier 2016): 71-79. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0510.
- Sancho, David, Diego Mourão-Sá, Olivier P. Joffre, Oliver Schulz, Neil C. Rogers, Daniel J. Pennington, James R. Carlyle, et Caetano Reis e Sousa. « Tumor Therapy in Mice via Antigen Targeting to a Novel, DC-Restricted C-Type Lectin ». *The Journal of Clinical Investigation* 118, n° 6 (juin 2008): 2098-2110. doi:10.1172/JCI34584.
- Sancho, David, Olivier P. Joffre, Anna M. Keller, Neil C. Rogers, Dolores Martínez, Patricia Hernanz-Falcón, Ian Rosewell, et Caetano Reis e Sousa. « Identification of a Dendritic Cell Receptor That Couples Sensing of Necrosis to Immunity ». *Nature* 458, n° 7240 (16 avril 2009): 899-903. doi:10.1038/nature07750.
- Sato, Eiichi, Sara H. Olson, Jiyoung Ahn, Brian Bundy, Hiroyoshi Nishikawa, Feng Qian, Achim A. Jungbluth, et al. « Intraepithelial CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and a High CD8+/Regulatory T Cell Ratio Are Associated with Favorable Prognosis in Ovarian Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n° 51 (20 décembre 2005): 18538-43. doi:10.1073/pnas.0509182102.
- Satpathy, Ansuman T., Wumesh Kc, Jörn C. Albring, Brian T. Edelson, Nicole M. Kretzer, Deepta Bhattacharya, Theresa L. Murphy, et Kenneth M. Murphy. « Zbtb46 Expression Distinguishes Classical Dendritic Cells and Their Committed Progenitors from Other Immune Lineages ». *The Journal of Experimental Medicine* 209, n° 6 (4 juin 2012): 1135-52. doi:10.1084/jem.20120030.
- Savage, Adam K., Michael G. Constantinides, Jin Han, Damien Picard, Emmanuel Martin, Bofeng Li, Olivier Lantz, et Albert Bendelac. « The Transcription Factor PLZF Directs the Effector Program of the NKT Cell Lineage ». *Immunity* 29, n° 3 (19 septembre 2008): 391-403. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.011.

- Saveanu, Loredana, Oliver Carroll, Mirjana Weimershaus, Pierre Guermonprez, Elke Firat, Vivian Lindo, Fiona Greer, et al. « IRAP Identifies an Endosomal Compartment Required for MHC Class I Cross-Presentation ». *Science (New York, N.Y.)* 325, n° 5937 (10 juillet 2009): 213-17. doi:10.1126/science.1172845.
- Savina, Ariel, Audrey Peres, Ignacio Cebrian, Nuno Carmo, Catarina Moita, Nir Hacohen, Luis F. Moita, et Sebastian Amigorena. « The Small GTPase Rac2 Controls Phagosomal Alkalinization and Antigen Crosspresentation Selectively in CD8(+) Dendritic Cells ». *Immunity* 30, n° 4 (17 avril 2009): 544-55. doi:10.1016/j.immuni.2009.01.013.
- Scanlon, Seth T., Seddon Y. Thomas, Caroline M. Ferreira, Li Bai, Thomas Krausz, Paul B. Savage, et Albert Bendelac. « Airborne Lipid Antigens Mobilize Resident Intravascular NKT Cells to Induce Allergic Airway Inflammation ». *The Journal of Experimental Medicine* 208, n° 10 (26 septembre 2011): 2113-24. doi:10.1084/jem.20110522.
- Schiavoni, Giovanna, Fabrizio Mattei, Paola Sestili, Paola Borghi, Massimo Venditti, Herbert C. Morse, Filippo Belardelli, et Lucia Gabriele. « ICSBP Is Essential for the Development of Mouse Type I Interferon-Producing Cells and for the Generation and Activation of CD8alpha(+) Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 196, n° 11 (2 décembre 2002): 1415-25.
- Schiffman, Mark, and Sholom Wacholder. "Success of HPV Vaccination Is Now a Matter of Coverage." *The Lancet. Oncology* 13, no. 1 (January 2012): 10–12. doi:10.1016/S1470-2045(11)70324-2.
- Schipper, Henk S., Maryam Rakhshandehroo, Stan F. J. van de Graaf, Koen Venken, Arjen Koppen, Rinke Stienstra, Serge Prop, et al. « Natural Killer T Cells in Adipose Tissue Prevent Insulin Resistance ». *The Journal of Clinical Investigation* 122, n° 9 (septembre 2012): 3343-54. doi:10.1172/JCI62739.
- Schlitzer, Andreas, Naomi McGovern, Pearline Teo, Teresa Zelante, Koji Atarashi, Donovan Low, Adrian W. S. Ho, et al. « IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses ». *Immunity* 38, n° 5 (23 mai 2013): 970-83. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.011.
- Schlitzer, Andreas, V. Sivakamasundari, Jinmiao Chen, Hermi Rizal Bin Sumatoh, Jaring Schreuder, Josephine Lum, Benoit Malleret, et al. « Identification of cDC1- and cDC2-Committed DC Progenitors Reveals Early Lineage Priming at the Common DC Progenitor Stage in the Bone Marrow ». *Nature Immunology* 16, n° 7 (juillet 2015): 718-28. doi:10.1038/ni.3200.
- Schmieg, John, Guangli Yang, Richard W. Franck, et Moriya Tsuji. « Superior Protection against Malaria and Melanoma Metastases by a C-Glycoside Analogue of the Natural Killer T Cell Ligand Alpha-Galactosylceramide ». *The Journal of Experimental Medicine* 198, n° 11 (1 décembre 2003): 1631-41. doi:10.1084/jem.20031192.
- Schmieg, John, Guangli Yang, Richard W. Franck, Nico Van Rooijen, et Moriya Tsuji. « Glycolipid Presentation to Natural Killer T Cells Differs in an Organ-Dependent Fashion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n° 4 (25 janvier 2005): 1127-32. doi:10.1073/pnas.0408288102.
- Schmoltdt, A., H. F. Benthe, et G. Haberland. « Digitoxin Metabolism by Rat Liver Microsomes ». *Biochemical Pharmacology* 24, n° 17 (1 septembre 1975): 1639-41.
- Schneiders, Famke L., Renée C. G. de Bruin, Alfons J. M. van den Eertwegh, Rik J. Scheper, C. René Leemans, Ruud H. Brakenhoff, Johannes A. Langendijk, et al. « Circulating Invariant Natural Killer T-Cell Numbers Predict Outcome in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Updated Analysis with 10-Year Follow-Up ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, n° 5 (10 février 2012): 567-70. doi:10.1200/JCO.2011.38.8819.

- Schreibelt, Gerty, Lieke J. J. Klinkenberg, Luis J. Cruz, Paul J. Tacken, Jurjen Tel, Martin Kreutz, Gosse J. Adema, Gordon D. Brown, Carl G. Figdor, et I. Jolanda M. de Vries. « The C-Type Lectin Receptor CLEC9A Mediates Antigen Uptake and (Cross-)Presentation by Human Blood BDCA3+ Myeloid Dendritic Cells ». *Blood* 119, n° 10 (8 mars 2012): 2284-92. doi:10.1182/blood-2011-08-373944.
- Schulte, Barbara M., Paul R. Gielen, Esther D. Kers-Rebel, Gerty Schreibelt, Frank J. M. van Kuppeveld, et Gosse J. Adema. « Enterovirus-Infected β -Cells Induce Distinct Response Patterns in BDCA1+ and BDCA3+ Human Dendritic Cells ». *PLoS One* 10, n° 3 (2015): e0121670. doi:10.1371/journal.pone.0121670.
- Schümann, Jens, Paola Pittoni, Elena Tonti, H. Robson Macdonald, Paolo Dellabona, et Giulia Casorati. « Targeted Expression of Human CD1d in Transgenic Mice Reveals Independent Roles for Thymocytes and Thymic APCs in Positive and Negative Selection of Valpha14i NKT Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175, n° 11 (1 décembre 2005): 7303-10.
- Schwartzentruber, Douglas J., David H. Lawson, Jon M. Richards, Robert M. Conry, Donald M. Miller, Jonathan Treisman, Fawaz Gailani, et al. "gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients with Advanced Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 364, no. 22 (June 2, 2011): 2119–27. doi:10.1056/NEJMoa1012863.
- Segura, Elodie, Jenny Valladeau-Guilemond, Marie-Hélène Donnadieu, Xavier Sastre-Garau, Vassili Soumelis, et Sebastian Amigorena. « Characterization of Resident and Migratory Dendritic Cells in Human Lymph Nodes ». *The Journal of Experimental Medicine* 209, n° 4 (9 avril 2012): 653-60. doi:10.1084/jem.20111457.
- Seiler, Michael P., Rebecca Mathew, Megan K. Liszewski, Chauncey J. Spooner, Chauncey Spooner, Kenneth Barr, Fanyong Meng, Harinder Singh, et Albert Bendelac. « Elevated and Sustained Expression of the Transcription Factors Egr1 and Egr2 Controls NKT Lineage Differentiation in Response to TCR Signaling ». *Nature Immunology* 13, n° 3 (5 février 2012): 264-71. doi:10.1038/ni.2230.
- Semmling, Verena, Veronika Lukacs-Kornek, Christoph A. Thaiss, Thomas Quast, Katharina Hochheiser, Ulf Panzer, Jamie Rossjohn, et al. « Alternative Cross-Priming through CCL17-CCR4-Mediated Attraction of CTLs toward NKT Cell-Licensed DCs ». *Nature Immunology* 11, n° 4 (avril 2010): 313-20. doi:10.1038/ni.1848.
- Shao, Kun, Ning Ding, Shixian Huang, Sumei Ren, Yu Zhang, Yuyang Kuang, Yubo Guo, et al. « Smart Nanodevice Combined Tumor-Specific Vector with Cellular Microenvironment-Triggered Property for Highly Effective Antiglioma Therapy ». *ACS Nano* 8, n° 2 (25 février 2014): 1191-1203. doi:10.1021/nn406285x.
- Sharma, Padmanee, and James P. Allison. "Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential." *Cell* 161, no. 2 (April 2015): 205–14. doi:10.1016/j.cell.2015.03.030.
- Sharma, Padmanee, et James P. Allison. « The Future of Immune Checkpoint Therapy ». *Science (New York, N.Y.)* 348, n° 6230 (3 avril 2015): 56-61. doi:10.1126/science.aaa8172.
- Sharp, Fiona A., Darren Ruane, Benjamin Claass, Emma Creagh, James Harris, Padma Malyala, Manomohan Singh, et al. « Uptake of Particulate Vaccine Adjuvants by Dendritic Cells Activates the NALP3 Inflammasome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, n° 3 (20 janvier 2009): 870-75. doi:10.1073/pnas.0804897106.
- Shen, Hong, Anne L. Ackerman, Virginia Cody, Alessandra Giodini, Ella R. Hinson, Peter Cresswell, Richard L. Edelson, W. Mark Saltzman, et Douglas J. Hanlon. « Enhanced and Prolonged Cross-Presentation Following Endosomal Escape of Exogenous Antigens Encapsulated in Biodegradable Nanoparticles ». *Immunology* 117, n° 1 (janvier 2006): 78-88. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02268.x.
- Shen, Hong, Anne L. Ackerman, Virginia Cody, Alessandra Giodini, Ella R. Hinson, Peter Cresswell, Richard L. Edelson, W. Mark Saltzman, and Douglas J. Hanlon.

- “Enhanced and Prolonged Cross-Presentation Following Endosomal Escape of Exogenous Antigens Encapsulated in Biodegradable Nanoparticles.” *Immunology* 117, no. 1 (January 2006): 78–88. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02268.x.
- Shen, Lianjun, Luis J. Sigal, Marianne Boes, et Kenneth L. Rock. « Important Role of Cathepsin S in Generating Peptides for TAP-Independent MHC Class I Crosspresentation in Vivo ». *Immunity* 21, n° 2 (août 2004): 155-65. doi:10.1016/j.immuni.2004.07.004.
- Shi, F. D., M. Flodstrom, B. Balasa, S. H. Kim, K. Van Gunst, J. L. Strominger, S. B. Wilson, et N. Sarvetnick. « Germ Line Deletion of the CD1 Locus Exacerbates Diabetes in the NOD Mouse ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, n° 12 (5 juin 2001): 6777-82. doi:10.1073/pnas.121169698.
- Shimizu, Kanako, Akira Goto, Mikiko Fukui, Masaru Taniguchi, et Shin-ichiro Fujii. « Tumor Cells Loaded with Alpha-Galactosylceramide Induce Innate NKT and NK Cell-Dependent Resistance to Tumor Implantation in Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178, n° 5 (1 mars 2007): 2853-61.
- Shimizu, Kanako, Miki Asakura, Jun Shinga, Yusuke Sato, Shuji Kitahara, Katsuaki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho, Stephen P. Schoenberger, Taichi Ezaki, et Shin-ichiro Fujii. « Invariant NKT Cells Induce Plasmacytoid Dendritic Cell (DC) Cross-Talk with Conventional DCs for Efficient Memory CD8+ T Cell Induction ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190, n° 11 (1 juin 2013): 5609-19. doi:10.4049/jimmunol.1300033.
- Shimizu, Kanako, Takuya Mizuno, Jun Shinga, Miki Asakura, Kazuhiro Kakimi, Yasuyuki Ishii, Kenichi Masuda, et al. « Vaccination with Antigen-Transfected, NKT Cell Ligand-Loaded, Human Cells Elicits Robust in Situ Immune Responses by Dendritic Cells ». *Cancer Research* 73, n° 1 (1 janvier 2013): 62-73. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0759.
- Shimizu, Kanako, Yuri Kurosawa, Masaru Taniguchi, Ralph M. Steinman, et Shin-ichiro Fujii. « Cross-Presentation of Glycolipid from Tumor Cells Loaded with Alpha-Galactosylceramide Leads to Potent and Long-Lived T Cell Mediated Immunity via Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 204, n° 11 (29 octobre 2007): 2641-53. doi:10.1084/jem.20070458.
- Shin, Jinwook, Shang Wang, Wenhai Deng, Jinhong Wu, Jimin Gao, et Xiao-Ping Zhong. « Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Is Critical for Invariant Natural Killer T-Cell Development and Effector Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, n° 8 (25 février 2014): E776-783. doi:10.1073/pnas.1315435111.
- Shive, null, et null Anderson. « Biodegradation and Biocompatibility of PLA and PLGA Microspheres ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, n° 1 (13 octobre 1997): 5-24.
- Sidobre, Stéphane, Olga V. Naidenko, Bee-Cheng Sim, Nicholas R. J. Gascoigne, K. Christopher Garcia, et Mitchell Kronenberg. « The V Alpha 14 NKT Cell TCR Exhibits High-Affinity Binding to a Glycolipid/CD1d Complex ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169, n° 3 (1 août 2002): 1340-48.
- Silk, Jonathan D., Ian F. Hermans, Uzi Gileadi, Tsung Wen Chong, Dawn Shepherd, Mariolina Salio, Bini Mathew, et al. « Utilizing the Adjuvant Properties of CD1d-Dependent NK T Cells in T Cell-Mediated Immunotherapy ». *The Journal of Clinical Investigation* 114, n° 12 (décembre 2004): 1800-1811. doi:10.1172/JCI22046.
- Silk, Jonathan D., Mariolina Salio, B. Gopal Reddy, Dawn Shepherd, Uzi Gileadi, James Brown, S. Hajar Masri, et al. « Cutting Edge: Nonglycosidic CD1d Lipid Ligands Activate Human and Murine Invariant NKT Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180, n° 10 (15 mai 2008): 6452-56.
- Silva, A. L., R. A. Rosalia, E. Varypataki, S. Sibuea, F. Ossendorp, et W. Jiskoot. « Poly-(Lactic-Co-Glycolic-Acid)-Based Particulate Vaccines: Particle Uptake by Dendritic

- Cells Is a Key Parameter for Immune Activation ». *Vaccine* 33, n° 7 (11 février 2015): 847-54. doi:10.1016/j.vaccine.2014.12.059.
- Simon, Lacey C., et Cristina M. Sabliov. « The Effect of Nanoparticle Properties, Detection Method, Delivery Route and Animal Model on Poly(lactic-Co-Glycolic) Acid Nanoparticles Biodistribution in Mice and Rats ». *Drug Metabolism Reviews* 46, n° 2 (mai 2014): 128-41. doi:10.3109/03602532.2013.864664.
- Simoni, Y., J. Diana, L. Ghazarian, L. Beaudoin, et A. Lehuen. « Therapeutic Manipulation of Natural Killer (NK) T Cells in Autoimmunity: Are We close to Reality? » *Clinical and Experimental Immunology* 171, n° 1 (janvier 2013): 8-19. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04625.x.
- Singh, M., W. Quispe-Tintaya, D. Chandra, A. Jahangir, M. M. Venkataswamy, T. W. Ng, S. Sharma-Kharkwal, L. J. Carreño, S. A. Porcelli, et C. Gravekamp. « Direct Incorporation of the NKT-Cell Activator α -Galactosylceramide into a Recombinant *Listeria Monocytogenes* Improves Breast Cancer Vaccine Efficacy ». *British Journal of Cancer* 111, n° 10 (11 novembre 2014): 1945-54. doi:10.1038/bjc.2014.486.
- Singh, Shailbala, Guojun Yang, Kimberly S. Schluns, Scott M. Anthony, et K. Jagannadha Sastry. « Sublingual Vaccination Induces Mucosal and Systemic Adaptive Immunity for Protection against Lung Tumor Challenge ». *PloS One* 9, n° 3 (2014): e90001. doi:10.1371/journal.pone.0090001.
- Smyth, M. J., E. Cretney, K. Takeda, R. H. Wiltrot, L. M. Sedger, N. Kayagaki, H. Yagita, et K. Okumura. « Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Contributes to Interferon Gamma-Dependent Natural Killer Cell Protection from Tumor Metastasis ». *The Journal of Experimental Medicine* 193, n° 6 (19 mars 2001): 661-70.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, E. Cretney, J. A. Trapani, M. Taniguchi, T. Kawano, S. B. Pelikan, N. Y. Crowe, et D. I. Godfrey. « Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (NK) and NKT Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 191, n° 4 (21 février 2000): 661-68.
- Smyth, Mark J., Nadine Y. Crowe, Daniel G. Pellicci, Konstantinos Kyparissoudis, Janice M. Kelly, Kazuyoshi Takeda, Hideo Yagita, et Dale I. Godfrey. « Sequential Production of Interferon-Gamma by NK1.1(+) T Cells and Natural Killer Cells Is Essential for the Antimetastatic Effect of Alpha-Galactosylceramide ». *Blood* 99, n° 4 (15 février 2002): 1259-66.
- Snyder-Cappione, Jennifer E., Douglas F. Nixon, Joyce C. Chi, Michelle-Linh T. Nguyen, Christopher K. Kirby, Jeffrey M. Milush, et Laura L. Koth. « Invariant Natural Killer T (iNKT) Cell Exhaustion in Sarcoidosis ». *European Journal of Immunology* 43, n° 8 (août 2013): 2194-2205. doi:10.1002/eji.201243185.
- Song, Liping, Shahab Asgharzadeh, Jill Salo, Kelly Engell, Hong-wei Wu, Richard Sposto, Tasnim Ara, et al. « Valpha24-Invariant NKT Cells Mediate Antitumor Activity via Killing of Tumor-Associated Macrophages ». *The Journal of Clinical Investigation* 119, n° 6 (juin 2009): 1524-36. doi:10.1172/JCI37869.
- Sorkin, Alexander, et Mark Von Zastrow. « Signal Transduction and Endocytosis: Close Encounters of Many Kinds ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3, n° 8 (août 2002): 600-614. doi:10.1038/nrm883.
- Speak, Anneliese O., Mariolina Salio, David C. A. Neville, Josette Fontaine, David A. Priestman, Nick Platt, Tanya Heare, et al. « Implications for Invariant Natural Killer T Cell Ligands due to the Restricted Presence of Isoglobotrihexosylceramide in Mammals ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n° 14 (3 avril 2007): 5971-76. doi:10.1073/pnas.0607285104.
- Speiser, Daniel E., Danielle Liénard, Nathalie Rufer, Verena Rubio-Godoy, Donata Rimoldi, Ferdy Lejeune, Arthur M. Krieg, Jean-Charles Cerottini, et Pedro Romero. « Rapid and Strong Human CD8+ T Cell Responses to Vaccination with Peptide,

- IFA, and CpG Oligodeoxynucleotide 7909 ». *The Journal of Clinical Investigation* 115, n° 3 (mars 2005): 739-46. doi:10.1172/JCI23373.
- Speiser, Daniel E., Katrin Schwarz, Petra Baumgaertner, Vania Manolova, Estelle Devevre, Wolfram Sterry, Peter Walden, et al. "Memory and Effector CD8 T-Cell Responses after Nanoparticle Vaccination of Melanoma Patients." *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)* 33, no. 8 (October 2010): 848–58. doi:10.1097/CJI.0b013e3181f1d614.
- Sriram, Venkataraman, Wenjun Du, Jacquelyn Gervay-Hague, et Randy R. Brutkiewicz. « Cell Wall Glycosphingolipids of *Sphingomonas Paucimobilis* Are CD1d-Specific Ligands for NKT Cells ». *European Journal of Immunology* 35, n° 6 (juin 2005): 1692-1701. doi:10.1002/eji.200526157.
- Steinman, R. M., J. C. Adams, et Z. A. Cohn. « Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. IV. Identification and Distribution in Mouse Spleen ». *The Journal of Experimental Medicine* 141, n° 4 (1 avril 1975): 804-20.
- Steinman, Ralph M. « Decisions about Dendritic Cells: Past, Present, and Future ». *Annual Review of Immunology* 30 (2012): 1-22. doi:10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
- Steinman, Ralph M., et Jacques Banchereau. « Taking Dendritic Cells into Medicine ». *Nature* 449, n° 7161 (27 septembre 2007): 419-26. doi:10.1038/nature06175.
- Stenström, Martin, Markus Sköld, Anna Ericsson, Lucie Beaudoin, Stephane Sidobre, Mitchell Kronenberg, Agnès Lehuen, et Susanna Cardell. « Surface Receptors Identify Mouse NK1.1+ T Cell Subsets Distinguished by Function and T Cell Receptor Type ». *European Journal of Immunology* 34, n° 1 (janvier 2004): 56-65. doi:10.1002/eji.200323963.
- Stirnemann, Kathrin, Jackeline F. Romero, Lucia Baldi, Bruno Robert, Valérie Cesson, Gurdyal S. Besra, Maurice Zauderer, et al. « Sustained Activation and Tumor Targeting of NKT Cells Using a CD1d-Anti-HER2-scFv Fusion Protein Induce Antitumor Effects in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 118, n° 3 (mars 2008): 994-1005. doi:10.1172/JCI33249.
- Stober, Detlef, Ieva Jomantaite, Reinhold Schirmbeck, et Jörg Reimann. « NKT Cells Provide Help for Dendritic Cell-Dependent Priming of MHC Class I-Restricted CD8+ T Cells in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170, n° 5 (1 mars 2003): 2540-48.
- Stock, Philippe, Vincent Lombardi, Viola Kohlrautz, et Omid Akbari. « Induction of Airway Hyperreactivity by IL-25 Is Dependent on a Subset of Invariant NKT Cells Expressing IL-17RB ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 8 (15 avril 2009): 5116-22. doi:10.4049/jimmunol.0804213.
- Subramanian, Lakshminath, Hartley Blumenfeld, Robert Tohn, Dalam Ly, Carlos Aguilera, Igor Maricic, Jan-Eric Mansson, Karsten Buschard, Vipin Kumar, et Terry L. Delovitch. « NKT Cells Stimulated by Long Fatty Acyl Chain Sulfatides Significantly Reduce the Incidence of Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice [Corrected] ». *PLoS One* 7, n° 5 (2012): e37771. doi:10.1371/journal.pone.0037771.
- Suzuki, Shoichi, Kiri Honma, Toshifumi Matsuyama, Kazuo Suzuki, Kan Toriyama, Ichinose Akito, Kazuo Yamamoto, et al. « Critical Roles of Interferon Regulatory Factor 4 in CD11b^{high}CD8 α - Dendritic Cell Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, n° 24 (15 juin 2004): 8981-86. doi:10.1073/pnas.0402139101.
- Swann, Jeremy B., Adam P. Uldrich, Serani van Dommelen, Janelle Sharkey, William K. Murray, Dale I. Godfrey, et Mark J. Smyth. « Type I Natural Killer T Cells Suppress Tumors Caused by p53 Loss in Mice ». *Blood* 113, n° 25 (18 juin 2009): 6382-85. doi:10.1182/blood-2009-01-198564.
- Swiecki, Melissa, Susan Gilfillan, William Vermi, Yaming Wang, et Marco Colonna. « Plasmacytoid Dendritic Cell Ablation Impacts Early Interferon Responses and

- Antiviral NK and CD8(+) T Cell Accrual ». *Immunity* 33, n° 6 (14 décembre 2010): 955-66. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.020.
- Tahir, S. M., O. Cheng, A. Shaulov, Y. Koezuka, G. J. Buble, S. B. Wilson, S. P. Balk, et M. A. Exley. « Loss of IFN-Gamma Production by Invariant NK T Cells in Advanced Cancer ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167, n° 7 (1 octobre 2001): 4046-50.
- Takahashi, T., M. Nieda, Y. Koezuka, A. Nicol, S. A. Porcelli, Y. Ishikawa, K. Tadokoro, H. Hirai, et T. Juji. « Analysis of Human V Alpha 24+ CD4+ NKT Cells Activated by Alpha-Glycosylceramide-Pulsed Monocyte-Derived Dendritic Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164, n° 9 (1 mai 2000): 4458-64.
- Takahashi, Tsuyoshi, Shigeru Chiba, Mie Nieda, Takeshi Azuma, Soichiro Ishihara, Yoichi Shibata, Takeo Juji, et Hisamaru Hirai. « Cutting Edge: Analysis of Human V Alpha 24+CD8+ NK T Cells Activated by Alpha-Galactosylceramide-Pulsed Monocyte-Derived Dendritic Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168, n° 7 (1 avril 2002): 3140-44.
- Takeda, K., S. Seki, K. Ogasawara, R. Anzai, W. Hashimoto, K. Sugiura, M. Takahashi, M. Satoh, et K. Kumagai. « Liver NK1.1+ CD4+ Alpha Beta T Cells Activated by IL-12 as a Major Effector in Inhibition of Experimental Tumor Metastasis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 156, n° 9 (1 mai 1996): 3366-73.
- Taniguchi, M., H. Koseki, T. Tokuhisa, K. Masuda, H. Sato, E. Kondo, T. Kawano, et al. « Essential Requirement of an Invariant V Alpha 14 T Cell Antigen Receptor Expression in the Development of Natural Killer T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, n° 20 (1 octobre 1996): 11025-28.
- Taniguchi, Masaru, Takuya Tashiro, Nyambayar Dashtsoodol, Naomi Hongo, et Hiroshi Watarai. « The Specialized iNKT Cell System Recognizes Glycolipid Antigens and Bridges the Innate and Acquired Immune Systems with Potential Applications for Cancer Therapy ». *International Immunology* 22, n° 1 (janvier 2010): 1-6. doi:10.1093/intimm/dxp104.
- Tel, Jurjen, Daniel Benitez-Ribas, Sander Hoosmans, Alessandra Cambi, Gosse J. Adema, Carl G. Figdor, Paul J. Tacken, et I. Jolanda M. de Vries. « DEC-205 Mediates Antigen Uptake and Presentation by Both Resting and Activated Human Plasmacytoid Dendritic Cells ». *European Journal of Immunology* 41, n° 4 (avril 2011): 1014-23. doi:10.1002/eji.201040790.
- Tel, Jurjen, Simone P. Sittig, Rebecca A. M. Blom, Luis J. Cruz, Gerty Schreiber, Carl G. Figdor, et I. Jolanda M. de Vries. « Targeting Uptake Receptors on Human Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Antigen Cross-Presentation and Robust Type I IFN Secretion ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191, n° 10 (15 novembre 2013): 5005-12. doi:10.4049/jimmunol.1300787.
- Terabe, Masaki, et Jay A. Berzofsky. « The Role of NKT Cells in Tumor Immunity ». *Advances in Cancer Research* 101 (2008): 277-348. doi:10.1016/S0065-230X(08)00408-9.
- Terabe, Masaki, Jeremy Swann, Elena Ambrosino, Pratima Sinha, Shun Takaku, Yoshihiro Hayakawa, Dale I. Godfrey, Suzanne Ostrand-Rosenberg, Mark J. Smyth, et Jay A. Berzofsky. « A Nonclassical Non-Valpha14Jalpha18 CD1d-Restricted (Type II) NKT Cell Is Sufficient for down-Regulation of Tumor Immunosurveillance ». *The Journal of Experimental Medicine* 202, n° 12 (19 décembre 2005): 1627-33. doi:10.1084/jem.20051381.
- Terashima, Asuka, Hiroshi Watarai, Sayo Inoue, Etsuko Sekine, Ryusuke Nakagawa, Koji Hase, Chiaki Iwamura, Hiroshi Nakajima, Toshinori Nakayama, et Masaru Taniguchi. « A Novel Subset of Mouse NKT Cells Bearing the IL-17 Receptor B Responds to IL-25 and Contributes to Airway Hyperreactivity ». *The Journal of Experimental Medicine* 205, n° 12 (24 novembre 2008): 2727-33. doi:10.1084/jem.20080698.

- Theirez, Aurelie, Claudia de Lalla, Sophie Allain, Luca Zaccagnino, Stephane Sidobre, Claudio Garavaglia, Giovanna Borsellino, et al. « CD4 Engagement by CD1d Potentiates Activation of CD4+ Invariant NKT Cells ». *Blood* 110, n° 1 (1 juillet 2007): 251-58. doi:10.1182/blood-2007-01-066217.
- Thordardottir, Soley, Basav N. Hangalapura, Tim Hutten, Marta Cossu, Jan Spanholtz, Nicolaas Schaap, Timothy R. D. J. Radstake, Robbert van der Voort, et Harry Dolstra. « The Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonist StemRegenin 1 Promotes Human Plasmacytoid and Myeloid Dendritic Cell Development from CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells ». *Stem Cells and Development* 23, n° 9 (1 mai 2014): 955-67. doi:10.1089/scd.2013.0521.
- Tomura, M., S. Maruo, J. Mu, X. Y. Zhou, H. J. Ahn, T. Hamaoka, H. Okamura, et al. « Differential Capacities of CD4+, CD8+, and CD4-CD8- T Cell Subsets to Express IL-18 Receptor and Produce IFN-Gamma in Response to IL-18 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160, n° 8 (15 avril 1998): 3759-65.
- Tomura, M., W. G. Yu, H. J. Ahn, M. Yamashita, Y. F. Yang, S. Ono, T. Hamaoka, et al. « A Novel Function of Valpha14+CD4+NKT Cells: Stimulation of IL-12 Production by Antigen-Presenting Cells in the Innate Immune System ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163, n° 1 (1 juillet 1999): 93-101.
- Tonti, Elena, Grazia Galli, Carmine Malzone, Sergio Abrignani, Giulia Casorati, et Paolo Dellabona. « NKT-Cell Help to B Lymphocytes Can Occur Independently of Cognate Interaction ». *Blood* 113, n° 2 (8 janvier 2009): 370-76. doi:10.1182/blood-2008-06-166249.
- Toura, I., T. Kawano, Y. Akutsu, T. Nakayama, T. Ochiai, et M. Taniguchi. « Cutting Edge: Inhibition of Experimental Tumor Metastasis by Dendritic Cells Pulsed with Alpha-Galactosylceramide ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163, n° 5 (1 septembre 1999): 2387-91.
- Townsend, Michael J., Amy S. Weinmann, Jennifer L. Matsuda, Rachelle Salomon, Peggy J. Farnham, Christine A. Biron, Laurent Gapin, et Laurie H. Glimcher. « T-Bet Regulates the Terminal Maturation and Homeostasis of NK and Valpha14i NKT Cells ». *Immunity* 20, n° 4 (avril 2004): 477-94.
- Tran, Kenny K., et Hong Shen. « The Role of Phagosomal pH on the Size-Dependent Efficiency of Cross-Presentation by Dendritic Cells ». *Biomaterials* 30, n° 7 (mars 2009): 1356-62. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.11.034.
- Tran, Thanh-Huyen, George Mattheolabakis, Hibah Aldawsari, and Mansoor Amiji. "Exosomes as Nanocarriers for Immunotherapy of Cancer and Inflammatory Diseases." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 160, no. 1 (September 2015): 46–58. doi:10.1016/j.clim.2015.03.021.
- Tupin, Emmanuel, Yuki Kinjo, et Mitchell Kronenberg. « The Unique Role of Natural Killer T Cells in the Response to Microorganisms ». *Nature Reviews. Microbiology* 5, n° 6 (juin 2007): 405-17. doi:10.1038/nrmicro1657.
- Tyznik, Aaron J., Elisa Farber, Enrico Girardi, Alysia Birkholz, Yali Li, Sampada Chitale, Regina So, et al. « Glycolipids That Elicit IFN-γ-Biased Responses from Natural Killer T Cells ». *Chemistry & Biology* 18, n° 12 (23 décembre 2011): 1620-30. doi:10.1016/j.chembiol.2011.10.015.
- Tyznik, Aaron J., Emmanuel Tupin, Niranjana A. Nagarajan, Min J. Her, Chris A. Benedict, et Mitchell Kronenberg. « Cutting Edge: The Mechanism of Invariant NKT Cell Responses to Viral Danger Signals ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181, n° 7 (1 octobre 2008): 4452-56.
- Uchida, Tetsuro, Shigetoshi Horiguchi, Yuriko Tanaka, Heizaburo Yamamoto, Naoki Kunii, Shinichiro Motohashi, Masaru Taniguchi, Toshinori Nakayama, et Yoshitaka Okamoto. « Phase I Study of Alpha-Galactosylceramide-Pulsed Antigen Presenting Cells Administration to the Nasal Submucosa in Unresectable or Recurrent Head and

- Neck Cancer ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 57, n° 3 (mars 2008): 337-45. doi:10.1007/s00262-007-0373-5.
- Ueno, Yoshitaka, Shinji Tanaka, Masaharu Sumii, Sachiko Miyake, Susumu Tazuma, Masaru Taniguchi, Takashi Yamamura, et Kazuaki Chayama. « Single Dose of OCH Improves Mucosal T Helper Type 1/T Helper Type 2 Cytokine Balance and Prevents Experimental Colitis in the Presence of valpha14 Natural Killer T Cells in Mice ». *Inflammatory Bowel Diseases* 11, n° 1 (janvier 2005): 35-41.
- Uldrich, Adam P., Nadine Y. Crowe, Konstantinos Kyparissoudis, Daniel G. Pellicci, Yifan Zhan, Andrew M. Lew, Philippe Bouillet, Andreas Strasser, Mark J. Smyth, et Dale I. Godfrey. « NKT Cell Stimulation with Glycolipid Antigen in Vivo: Costimulation-Dependent Expansion, Bim-Dependent Contraction, and Hyporesponsiveness to Further Antigenic Challenge ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175, n° 5 (1 septembre 2005): 3092-3101.
- Umetsu, Dale T., Jennifer J. McIntire, Omid Akbari, Claudia Macaubas, et Rosemarie H. DeKruyff. « Asthma: An Epidemic of Dysregulated Immunity ». *Nature Immunology* 3, n° 8 (août 2002): 715-20. doi:10.1038/ni0802-715.
- Ushida, Maki, Tomonori Iyoda, Mitsuhiro Kanamori, Hiroshi Watarai, Kazuhiko Takahara, et Kayo Inaba. « In Vivo and in Vitro Analyses of α -Galactosylceramide Uptake by Conventional Dendritic Cell Subsets Using Its Fluorescence-Labeled Derivative ». *Immunology Letters* 168, n° 2 (décembre 2015): 300-305. doi:10.1016/j.imlet.2015.10.008.
- Van Kaer, Luc. « Alpha-Galactosylceramide Therapy for Autoimmune Diseases: Prospects and Obstacles ». *Nature Reviews. Immunology* 5, n° 1 (janvier 2005): 31-42. doi:10.1038/nri1531.
- Vander Lugt, Bryan, Aly A. Khan, Jason A. Hackney, Smita Agrawal, Justin Lesch, Meijuan Zhou, Wyne P. Lee, et al. « Transcriptional Programming of Dendritic Cells for Enhanced MHC Class II Antigen Presentation ». *Nature Immunology* 15, n° 2 (février 2014): 161-67. doi:10.1038/ni.2795.
- Vasir, Jaspreet K., et Vinod Labhassetwar. « Biodegradable Nanoparticles for Cytosolic Delivery of Therapeutics ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, n° 8 (10 août 2007): 718-28. doi:10.1016/j.addr.2007.06.003.
- Veinotte, Linnea, Simon Gebremeskel, et Brent Johnston. « CXCL16-Positive Dendritic Cells Enhance Invariant Natural Killer T Cell-Dependent IFN γ Production and Tumor Control ». *Oncoimmunology* 5, n° 6 (juin 2016): e1160979. doi:10.1080/2162402X.2016.1160979.
- Venkataswamy, Manjunatha M., et Steven A. Porcelli. « Lipid and Glycolipid Antigens of CD1d-Restricted Natural Killer T Cells ». *Seminars in Immunology* 22, n° 2 (avril 2010): 68-78. doi:10.1016/j.smim.2009.10.003.
- Venken, Koen, Tine Decruy, Sandrine Aspeslagh, Serge Van Calenbergh, Bart N. Lambrecht, et Dirk Elewaut. « Bacterial CD1d-Restricted Glycolipids Induce IL-10 Production by Human Regulatory T Cells upon Cross-Talk with Invariant NKT Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191, n° 5 (1 septembre 2013): 2174-83. doi:10.4049/jimmunol.1300562.
- Vliet, H. J. van der, B. M. von Blomberg, N. Nishi, M. Reijm, A. E. Voskuyl, A. A. van Bodegraven, C. H. Polman, et al. « Circulating V(α 24+) V β 11+ NKT Cell Numbers Are Decreased in a Wide Variety of Diseases That Are Characterized by Autoreactive Tissue Damage ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 100, n° 2 (août 2001): 144-48. doi:10.1006/clim.2001.5060.
- Wack, Andreas, Ewa Terczyńska-Dyła, et Rune Hartmann. « Guarding the Frontiers: The Biology of Type III Interferons ». *Nature Immunology* 16, n° 8 (août 2015): 802-9. doi:10.1038/ni.3212.
- Watarai, Hiroshi, Etsuko Sekine-Kondo, Tomokuni Shigeura, Yasutaka Motomura, Takuwa Yasuda, Rumi Satoh, Hisahiro Yoshida, et al. « Development and Function

- of Invariant Natural Killer T Cells Producing T(h)2- and T(h)17-Cytokines ». *PLoS Biology* 10, n° 2 (février 2012): e1001255. doi:10.1371/journal.pbio.1001255.
- Watarai, Hiroshi, Shin-ichiro Fujii, Daisuke Yamada, Andrei Rybouchkin, Sakura Sakata, Yuko Nagata, Midori Iida-Kobayashi, et al. « Murine Induced Pluripotent Stem Cells Can Be Derived from and Differentiate into Natural Killer T Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 120, n° 7 (juillet 2010): 2610-18. doi:10.1172/JCI42027.
- Watchmaker, Payal B., Katharina Lahl, Mike Lee, Dirk Baumjohann, John Morton, Sun Jung Kim, Ruizhu Zeng, et al. « Comparative Transcriptional and Functional Profiling Defines Conserved Programs of Intestinal DC Differentiation in Humans and Mice ». *Nature Immunology* 15, n° 1 (janvier 2014): 98-108. doi:10.1038/ni.2768.
- Wei, Jun, Kai Yang, et Hongbo Chi. « Cutting Edge: Discrete Functions of mTOR Signaling in Invariant NKT Cell Development and NKT17 Fate Decision ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193, n° 9 (1 novembre 2014): 4297-4301. doi:10.4049/jimmunol.1402042.
- Weng, Xiufang, Chia-Min Liao, Sreya Bagchi, Susanna L. Cardell, Paul L. Stein, et Chyung-Ru Wang. « The Adaptor Protein SAP Regulates Type II NKT-Cell Development, Cytokine Production, and Cytotoxicity against Lymphoma ». *European Journal of Immunology* 44, n° 12 (décembre 2014): 3646-57. doi:10.1002/eji.201444848.
- Williams, Jesse W., Melissa Y. Tjota, Bryan S. Clay, Bryan Vander Lugt, Hozefa S. Bandukwala, Cara L. Hrusch, Donna C. Decker, et al. « Transcription Factor IRF4 Drives Dendritic Cells to Promote Th2 Differentiation ». *Nature Communications* 4 (2013): 2990. doi:10.1038/ncomms3990.
- Wills-Karp, M. « Immunologic Basis of Antigen-Induced Airway Hyperresponsiveness ». *Annual Review of Immunology* 17 (1999): 255-81. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.255.
- Wilson, Michael T., Cecilia Johansson, Danyvid Olivares-Villagómez, Avneesh K. Singh, Aleksandar K. Stanic, Chyung-Ru Wang, Sebastian Joyce, Mary Jo Wick, et Luc Van Kaer. « The Response of Natural Killer T Cells to Glycolipid Antigens Is Characterized by Surface Receptor down-Modulation and Expansion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, n° 19 (16 septembre 2003): 10913-18. doi:10.1073/pnas.1833166100.
- Wingender, Gerhard, Alysia M. Birkholz, Duygu Sag, Elisa Farber, Sampada Chitale, Amy R. Howell, et Mitchell Kronenberg. « Selective Conditions Are Required for the Induction of Invariant NKT Cell Hyporesponsiveness by Antigenic Stimulation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195, n° 8 (15 octobre 2015): 3838-48. doi:10.4049/jimmunol.1500203.
- Wingender, Gerhard, Duygu Sag, et Mitchell Kronenberg. « NKT10 Cells: A Novel / NKT Cell Subset ». *Oncotarget* 6, n° 29 (28 septembre 2015): 26552-53. doi:10.18632/oncotarget.5270.
- Wingender, Gerhard, Philippe Krebs, Bruce Beutler, et Mitchell Kronenberg. « Antigen-Specific Cytotoxicity by Invariant NKT Cells in Vivo Is CD95/CD178-Dependent and Is Correlated with Antigenic Potency ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185, n° 5 (1 septembre 2010): 2721-29. doi:10.4049/jimmunol.1001018.
- Wolchok, Jedd D., Harriet Kluger, Margaret K. Callahan, Michael A. Postow, Naiyer A. Rizvi, Alexander M. Lesokhin, Neil H. Segal, et al. "Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma." *New England Journal of Medicine* 369, no. 2 (July 11, 2013): 122–33. doi:10.1056/NEJMoa1302369.
- Wu, Dianna Y., Neil H. Segal, Stephane Sidobre, Mitchell Kronenberg, et Paul B. Chapman. « Cross-Presentation of Disialoganglioside GD3 to Natural Killer T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 198, n° 1 (7 juillet 2003): 173-81. doi:10.1084/jem.20030446.

- Wu, L., A. D'Amico, K. D. Winkel, M. Suter, D. Lo, et K. Shortman. « RelB Is Essential for the Development of Myeloid-Related CD8alpha- Dendritic Cells but Not of Lymphoid-Related CD8alpha+ Dendritic Cells ». *Immunity* 9, n° 6 (décembre 1998): 839-47.
- Wu, Lan, et Luc Van Kaer. « Natural Killer T Cells in Health and Disease ». *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 3 (1 janvier 2011): 236-51.
- Wu, Lan, Vrajesh V. Parekh, Curtis L. Gabriel, Deanna P. Bracy, Pamela A. Marks-Shulman, Robyn A. Tamboli, Sungjune Kim, et al. « Activation of Invariant Natural Killer T Cells by Lipid Excess Promotes Tissue Inflammation, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Obese Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, n° 19 (8 mai 2012): E1143-1152. doi:10.1073/pnas.1200498109.
- Wun, Kwok S., Garth Cameron, Onisha Patel, Siew Siew Pang, Daniel G. Pellicci, Lucy C. Sullivan, Santosh Keshipeddy, et al. « A Molecular Basis for the Exquisite CD1d-Restricted Antigen Specificity and Functional Responses of Natural Killer T Cells ». *Immunity* 34, n° 3 (25 mars 2011): 327-39. doi:10.1016/j.immuni.2011.02.001.
- Xiang, Sue D., Anja Scholzen, Gabriela Minigo, Cassandra David, Vasso Apostolopoulos, Patricia L. Mottram, et Magdalena Plebanski. « Pathogen Recognition and Development of Particulate Vaccines: Does Size Matter? » *Methods (San Diego, Calif.)* 40, n° 1 (septembre 2006): 1-9. doi:10.1016/j.ymeth.2006.05.016.
- Xu, Honglin, Taehoon Chun, Angela Colmone, Hanh Nguyen, et Chyung-Ru Wang. « Expression of CD1d under the Control of a MHC Class Ia Promoter Skews the Development of NKT Cells, but Not CD8+ T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171, n° 8 (15 octobre 2003): 4105-12.
- Yamasaki, Kazuki, Shigetoshi Horiguchi, Motoyoshi Kurosaki, Naoki Kunii, Kaoru Nagato, Hideki Hanaoka, Naomi Shimizu, et al. « Induction of NKT Cell-Specific Immune Responses in Cancer Tissues after NKT Cell-Targeted Adoptive Immunotherapy ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 138, n° 3 (mars 2011): 255-65. doi:10.1016/j.clim.2010.11.014.
- Yan, Zhongyi, Yahong Wu, Jiangfeng Du, Guodong Li, Shengdian Wang, Wenpeng Cao, Xiuman Zhou, et al. « A Novel Peptide Targeting Clec9a on Dendritic Cell for Cancer Immunotherapy ». *Oncotarget* 7, n° 26 (28 juin 2016): 40437-50. doi:10.18632/oncotarget.9624.
- Yanagisawa, Kazuhiko, Ken-ichiro Seino, Yuriko Ishikawa, Mutsumi Nozue, Takeshi Todoroki, et Katashi Fukao. « Impaired Proliferative Response of V Alpha 24 NKT Cells from Cancer Patients against Alpha-Galactosylceramide ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168, n° 12 (15 juin 2002): 6494-99.
- Yanagisawa, Kazuhiko, Mark A. Exley, Xiaofeng Jiang, Nobuhiro Ohkuchi, Masaru Taniguchi, et Ken-ichiro Seino. « Hyporesponsiveness to Natural Killer T-Cell Ligand Alpha-Galactosylceramide in Cancer-Bearing State Mediated by CD11b+ Gr-1+ Cells Producing Nitric Oxide ». *Cancer Research* 66, n° 23 (1 décembre 2006): 11441-46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0944.
- Yoneda, Ken-ichirou, Takeshi Morii, Mie Nieda, Nobuhiko Tsukaguchi, Itsuto Amano, Haruyuki Tanaka, Hideo Yagi, Nobuhiro Narita, et Hiroshi Kimura. « The Peripheral Blood Valpha24+ NKT Cell Numbers Decrease in Patients with Haematopoietic Malignancy ». *Leukemia Research* 29, n° 2 (février 2005): 147-52. doi:10.1016/j.leukres.2004.06.005.
- Yoo, Je Young, Jong Min Kim, Kwang Su Seo, Yong Kyun Jeong, Hai Bang Lee, et Gilson Khang. « Characterization of Degradation Behavior for PLGA in Various pH Condition by Simple Liquid Chromatography Method ». *Bio-Medical Materials and Engineering* 15, n° 4 (2005): 279-88.
- Yoshio, Sachiyo, Tatsuya Kanto, Shoko Kuroda, Tokuhiko Matsubara, Koyo Higashitani, Naruyasu Kakita, Hisashi Ishida, et al. « Human Blood Dendritic Cell Antigen 3 (BDCA3)(+) Dendritic Cells Are a Potent Producer of Interferon-λ in Response to

- Hepatitis C Virus ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57, n° 5 (mai 2013): 1705-15. doi:10.1002/hep.26182.
- Yu, Chun I., Christian Becker, Yuanyuan Wang, Florentina Marches, Julie Helft, Marylene Leboeuf, Esperanza Anguiano, et al. « Human CD1c+ Dendritic Cells Drive the Differentiation of CD103+ CD8+ Mucosal Effector T Cells via the Cytokine TGF- β ». *Immunity* 38, n° 4 (18 avril 2013): 818-30. doi:10.1016/j.immuni.2013.03.004.
- Yu, Karl O. A., Jin S. Im, Alberto Molano, Yves Dutronc, Petr A. Illarionov, Claire Forestier, Nagatoshi Fujiwara, et al. « Modulation of CD1d-Restricted NKT Cell Responses by Using N-Acyl Variants of Alpha-Galactosylceramides ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n° 9 (1 mars 2005): 3383-88. doi:10.1073/pnas.0407488102.
- Zajonc, Dirk M., Carlos Cantu, Jochen Mattner, Dapeng Zhou, Paul B. Savage, Albert Bendelac, Ian A. Wilson, et Luc Teyton. « Structure and Function of a Potent Agonist for the Semi-Invariant Natural Killer T Cell Receptor ». *Nature Immunology* 6, n° 8 (août 2005): 810-18. doi:10.1038/ni1224.
- Zajonc, Dirk M., Igor Maricic, Douglass Wu, Ramesh Halder, Keshab Roy, Chi-Huey Wong, Vipin Kumar, et Ian A. Wilson. « Structural Basis for CD1d Presentation of a Sulfatide Derived from Myelin and Its Implications for Autoimmunity ». *The Journal of Experimental Medicine* 202, n° 11 (5 décembre 2005): 1517-26. doi:10.1084/jem.20051625.
- Zelenay, Santiago, Anna M. Keller, Paul G. Whitney, Barbara U. Schraml, Safia Deddouche, Neil C. Rogers, Oliver Schulz, David Sancho, et Caetano Reis e Sousa. « The Dendritic Cell Receptor DNGR-1 Controls Endocytic Handling of Necrotic Cell Antigens to Favor Cross-Priming of CTLs in Virus-Infected Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 122, n° 5 (mai 2012): 1615-27. doi:10.1172/JCI60644.
- Zenke, Martin, et Thomas Hieronymus. « Towards an Understanding of the Transcription Factor Network of Dendritic Cell Development ». *Trends in Immunology* 27, n° 3 (mars 2006): 140-45. doi:10.1016/j.it.2005.12.007.
- Zhang, Guqin, Hanxiang Nie, Jiong Yang, Xuhong Ding, Yi Huang, Hongying Yu, Ruyou Li, Zhuqing Yuan, et Suping Hu. « Sulfatide-Activated Type II NKT Cells Prevent Allergic Airway Inflammation by Inhibiting Type I NKT Cell Function in a Mouse Model of Asthma ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 301, n° 6 (décembre 2011): L975-984. doi:10.1152/ajplung.00114.2011.
- Zhang, Lianjun, Benjamin O. Tschumi, Stéphanie Corgnac, Markus A. Rüegg, Michael N. Hall, Jean-Pierre Mach, Pedro Romero, et Alena Donda. « Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Orchestrates Invariant NKT Cell Differentiation and Effector Function ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193, n° 4 (15 août 2014): 1759-65. doi:10.4049/jimmunol.1400769.
- Zhang, Shuye, Karen Kodys, Kui Li, et Gyongyi Szabo. « Human Type 2 Myeloid Dendritic Cells Produce Interferon- λ and Amplify Interferon- α in Response to Hepatitis C Virus Infection ». *Gastroenterology* 144, n° 2 (février 2013): 414-425.e7. doi:10.1053/j.gastro.2012.10.034.
- Zhang, W., C. L. Sommers, D. N. Burshtyn, C. C. Stebbins, J. B. DeJarnette, R. P. Tribble, A. Grinberg, et al. « Essential Role of LAT in T Cell Development ». *Immunity* 10, n° 3 (mars 1999): 323-32.
- Zhao, Jie, Xiufang Weng, Sreya Bagchi, et Chyung-Ru Wang. « Polyclonal Type II Natural Killer T Cells Require PLZF and SAP for Their Development and Contribute to CpG-Mediated Antitumor Response ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, n° 7 (18 février 2014): 2674-79. doi:10.1073/pnas.1323845111.
- Zhou, Dapeng, Jochen Mattner, Carlos Cantu, Nicolas Schrantz, Ning Yin, Ying Gao, Yuval Sagiv, et al. « Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells ».

Science (New York, N.Y.) 306, n° 5702 (3 décembre 2004): 1786-89.
doi:10.1126/science.1103440.

Ziegler-Heitbrock, Loems, Petronela Ancuta, Suzanne Crowe, Marc Dalod, Veronika Grau, Derek N. Hart, Pieter J. M. Leenen, et al. « Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood ». *Blood* 116, n° 16 (21 octobre 2010): e74-80.
doi:10.1182/blood-2010-02-258558.

Zolnik, Banu S., et Diane J. Burgess. « Effect of Acidic pH on PLGA Microsphere Degradation and Release ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 122, n° 3 (8 octobre 2007): 338-44.
doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.034.

ANNEXE

ANNEXE

Articles Scientifiques:

J Immunol. 2014 Jul 15;193(2):961-9. doi: 10.4049/jimmunol.1303029. Epub 2014 Jun 9.

Article 1: Targeted delivery of α -galactosylceramide to CD8 α + dendritic cells optimizes type I NKT cell-based antitumor responses.

Macho-Fernandez E, Cruz LJ, **Ghinnagow R**, Fontaine J, Bialecki E, Frisch B, Trottein F, Faveeuw C.

Article 2: Tolerance to tumor self-antigens can be abrogated by manipulating the helper function of invariant natural killer T lymphocytes

Reem Ghinnagow, Julie De Meester, Luis Javier Cruz, Caroline Aspod, Stéphanie Corgnac, Elodie Macho-Fernandez, Daphnée Soulard, Josette Fontaine, Laurence Chaperot, Julie Charles, Fabrice Soncin, Fathia Mami-Chouaib, Joel Pluma, Christelle Faveeuw and François Trottein.

Communications scientifiques (Posters)

- Journée scientifique hors-site CIIL-LIRIC (SF3i) (26 mai 2015)

“Optimization of immune stimulatory activities of invariant Natural Killer T Lymphocytes”

Ghinnagow Reem, De Meester Julie, Cruz Luis, Fontaine Josette, Faveeuw Christelle, Trottein François

- 15ème Journée André Verbet-Colloque annuel des Doctorants de Lille (14 septembre 2015)

“Optimization of immune stimulatory activities of invariant Natural Killer T Lymphocytes”

Ghinnagow Reem, De Meester Julie, Cruz Luis, Fontaine Josette, Faveeuw Christelle, Trottein François

- CRCL 2nd International Symposium of the Cancer Research Center of Lyon (du 21 jusq'au 23 septembre 2015)

“Optimization of immune stimulatory activities of invariant Natural Killer T Lymphocytes”

Ghinnagow Reem, De Meester Julie, Cruz Luis, Fontaine Josette, Faveeuw Christelle, Trottein François

Article: Tolerance to tumor self-antigens can be abrogated by manipulating the helper function of invariant natural killer T lymphocytes

Reem Ghinnagow¹⁻⁵, Julie De Meester¹⁻⁵, Luis Javier Cruz⁶, Caroline Aspod⁷,
Stéphanie Corgnac⁸, Elodie Macho-Fernandez¹⁻⁵, Daphnée Soulard¹⁻⁵, Josette
Fontaine¹⁻⁵, Laurence Chaperot⁷, Julie Charles^{7,9}, Fabrice Soncin^{4,5,10}, Fathia Mami-
Chouaib⁸,
Joel Pluma⁷, Christelle Faveeuw¹⁻⁵ and François Trottein¹⁻⁵

¹Univ. Lille, U1019 - UMR 8204 - CIIL - Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59000 Lille, France,

²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8204, F-59000 Lille, France,

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1019, F-59000 Lille, France,

⁴Centre Hospitalier Universitaire de Lille, F-59000 Lille, France,

⁵Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France,

⁶Translational Nanobiomaterials and Imaging, Department of Radiology, Leiden University Medical Center, 2333 ZA Leiden, The Netherlands,

⁷Institute for Advanced Biosciences (IAB), Team Immunobiology and Immunotherapy in Chronic Diseases, INSERM U1209, CNRS UMR5309, Université Grenoble Alpes, Etablissement Français du Sang-Rhone-Alpes, F-38700 Grenoble, France,

⁸INSERM UMR 1186, Integrative Tumor Immunology and Genetic Oncology, Gustave Roussy, Fac. de médecine - Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 94805, Villejuif, France,

⁹Dermatology department, Grenoble Alpes University Hospital, F-38700 Grenoble, France

¹⁰Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8161, F-59000 Lille, France.

The authors declare no potential conflicts of interest.

Running title: Optimal NKT cell responses with vectorized α -GalCer

Keywords: Cancer, Self antigens, Natural killer T cells; Dendritic cells; Targeting; vaccine

Corresponding author: François Trottein, Center for Infection and Immunity of Lille, Inserm U1019-CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France. Phone: 33 320 877 885. Fax: 33 320 877 888. E-mail: francois.trottein@pasteur-lille.fr.

Financial support: This work was supported by Institut National du Cancer (INCa) grant INCA_6699.

Abstract

Vaccines designed to abrogate the tolerance of tumor self-antigens and amplify cytotoxic CD8⁺ T cells (CTLs) have promise for the treatment of cancer. Type I natural killer (NKT) cells have attracted considerable interest in the cancer therapy field. In the current study, we have exploited the unique ability of NKT cells to serve as T-helper cells to license dendritic cells (DCs) for cross priming with the aim to generate efficient CTL antitumor responses. Our results showed for the first time that simultaneous co-delivery of the NKT agonist α -galactosylceramide and tumor self-antigens (Trp2 and gp100) to cross-priming DCs promotes strong antitumor responses in prophylactic and therapeutic settings (advanced solid tumor model in the mouse). We attributed the vaccine's therapeutic effects to NKT cells (but not to T-helper lymphocytes) and CD8⁺ T cells. Efficacy was correlated with an elevated ratio between tumor antigen-specific CD8⁺ T cells and regulatory CD4⁺ T lymphocytes within the tumor. The nanoparticle-based vaccine actively targeted human CLEC9A-expressing BDCA3⁺ DCs - the equivalent of murine cross-priming CD8 α ⁺ DCs - and induced a strong expansion of effector memory tumor self-antigen (Melan -A)-specific CD8⁺ T cells from peripheral blood mononuclear cells sourced from healthy donors and melanoma patients. In general, tolerance to self-antigens can be abrogated by manipulating the NKT cells' helper functions. Our result shed light on novel therapeutic approaches for controlling tumor development.

Introduction

Although vaccines designed to promote the development of tumor-specific cytotoxic CD8⁺ T cells (CTLs) have promise for cancer treatment, optimization (to abrogate the tolerance of tumor self-antigens) is urgently needed (for reviews, Klebanoff et al., 2011; Chen and Mellman, 2013; Palucka and Banchereau, 2013). The development of effective CTLs implies the adequate stimulation of naive CD8⁺ T cells by dendritic cells (DCs). A variety of factors influence the strength and quality of the CTL response, including the nature of the DC subset, the duration of antigen presentation, and the type of costimulatory signals received by the naive CD8⁺ T cells (Klebanoff et al., 2011; Palucka and Banchereau, 2013). The BDCA3⁺ DC subset (in humans) and the CD8^α⁺ DC subset (in the mouse) excel in antigen cross-presentation and the priming of CD8⁺ T cells (Croizat et al., 2010; Jongbloed et al., 2010; Pooley et al., 2001; Shortman and Heath, 2010; Poulin et al., 2010). Many research groups have reported that tumor antigen presentation by cross-priming DCs is essential for an effective antitumor CTL response (Klebanoff et al., 2011; Palucka and Banchereau, 2013). This unique property is currently used to enhance the efficacy of tumor vaccines whose delivery systems target cross-priming DCs (Sancho et al., 2008; Paulis et al., 2013; Macho-Fernandez et al., 2014; Picco et al., 2014); this approach is now in clinical development (Dhodapkar et al., 2014). Activating/licensing signals are required for the effective induction of CTL responses, and co-stimulatory signals delivered by DC-expressed pattern recognition receptors and/or T-helper cells are critical in this respect (Palucka and Banchereau, 2013; Vega-Ramos and Villadangos, 2013; Wiesel and Oxenius, 2012). Many attempts have been made to optimize the CTL response in tumor settings by using various classes of Toll-like receptor (TLR) agonist (Silva et al., 2013; Temizoz et al., 2016). Other studies have demonstrated the value of delivering both CTL and T-helper epitopes to the same DC and thus favoring DC/T-helper cell/naive CD8⁺ T cell encounters - the so called “*ménage à trois*” (Aarntzen et al., 2012; Neumann et al., 2015). In the present study, we chose an alternative strategy based on the recruitment of another type of helper cell for cross-priming DCs - namely type I natural killer T (NKT) cells.

Type I NKT cells belong to the “innate-like” T lymphocyte family. Through a semi-invariant T cell receptor, these non-conventional T cells recognize lipid antigens presented by the monomorphic CD1d molecule on antigen-presenting cells, including DCs (Bendelac et al., 2007; Cerundolo et al., 2009; Brennan et al., 2013). In

response to the superagonist α -galactosylceramide (α -GalCer), NKT cells swiftly produce immunostimulatory cytokines (including large amounts of IFN- γ) and up-regulate several costimulatory molecules (e.g. CD40); this leads to DC maturation and the downstream activation of critical effectors of antitumor immunity, including NK cells and T lymphocytes (Hermans et al., 2003; Fujii et al., 2003; Stober et al., 2003). Importantly, Semmling et al. elegantly demonstrated that NKT cells can license DCs for cross-priming through a mechanism other than that used by T-helper cells (Semmling et al., 2010). This alternative cross-priming may lead to a CTL response that differs from classical cross-priming. We noted that Semmling et al. studied the model antigen ovalbumin (OVA), rather than a self-antigen. This observation prompted us to try to co-deliver tumor self-antigens and an NKT cell agonist to CD8 α^+ DCs by using a nanoparticle (NP)-based technology. We hypothesized that this strategy might enhance DC/NKT cell/naive CD8 $^+$ T cell interactions, abrogate self-tolerance and thus promote effective antitumor CTL responses. To this end, we targeted the C-type lectin Clec9a (also known as DNGR1); this marker is almost exclusively expressed by cross-priming DCs, and is known to confer potent CTL responses (Sancho et al., 2008; Picco et al., 2014; Tullett et al., 2014). By using NPs decorated with antibodies (Abs), we showed that simultaneous, targeted delivery of α -GalCer and tumor self-antigens (Trp2 and gp100) to mouse CD8 α^+ DCs via the Clec9a endocytic pathway is instrumental in inducing a potent CTL response that protects in prophylactic and therapeutic settings against the development of aggressive tumors (melanoma). In the human setting (with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors and melanoma patients), co-delivery of α -GalCer and a tumor antigen (Melan A) to BDCA3 $^+$ DCs strongly induced the expansion of tumor-antigen-specific CD8 $^+$ T cells *in vitro*. Our present findings may have important implications for tumor immunotherapy and vaccine development.

Results

Primary and secondary stimulation of NKT cells is enhanced by targeting α -GalCer via NP/Clec9a

We first tested the ability of PLGA NPs containing α -GalCer and OVA and decorated with anti-Clec9a Abs (see Table I for information on the NPs' physicochemical characteristics) to activate NKT cells *in vitro*. NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a induced greater cytokine production (including the production of IFN- γ a critical antitumor

cytokine) by spleen cells than the control NP/ α -GalCer/OVA/IgG and (albeit to a lesser extent) soluble, non-targeted (free) α -GalCer (Fig. 1A, *left panel* and Supplementary Fig. S1A). Cytokine production was dependent on the antigen-presenting molecule CD1d and on NKT cells (Supplementary Fig. S1B). Furthermore, cytokine production in response to NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a was dependent on CD8 α^+ DCs because spleen cells from *Baft3^{-/-}* mice were much less able to produce IFN- γ (Fig. 1A, *right panel*). When pulsed *in vitro* with α -GalCer targeted via NP/Clec9a, bone marrow-derived DCs induced higher levels of IL-2 production by the NKT hybridoma DN32.D3 (Fig. 1B and Supplementary Fig. S1C for the phenotypic analysis of the DCs), relative to either non-targeted α -GalCer (NP/IgG) or free α -GalCer. Hence, targeted delivery of α -GalCer via NP/Clec9a effectively activated NKT cells *in vitro*.

We next evaluated the targeted α -GalCer's ability to activate NKT cells *in vivo*. Whatever the dose used for inoculation, NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a induced a higher frequency of IFN- γ expressing NKT cells than NP/ α -GalCer/OVA/IgG or non-targeted α -GalCer plus OVA did (Fig. 1C, *left panel* and Supplementary Fig. S2A). It is noteworthy that the inoculation of 5 ng of α -GalCer incorporated into NP/Clec9a or 100 ng of non-targeted α -GalCer resulted in similar proportions of IFN- γ positive NKT cells. These two groups of animals did not differ in terms of the serum IFN- γ concentration and the extent of NK cell transactivation (Supplementary Fig. S2B, and data not shown). Repeated stimulation with non-targeted α -GalCer leads to NKT cell hyporesponsiveness as a result of uncontrolled NKT cell activation (Parekh et al., 2009). This hyporesponsiveness might have a profound impact on the development of NKT cell-based vaccine therapies in cancer because it would limit the prime-boost strategy.

Figure.1

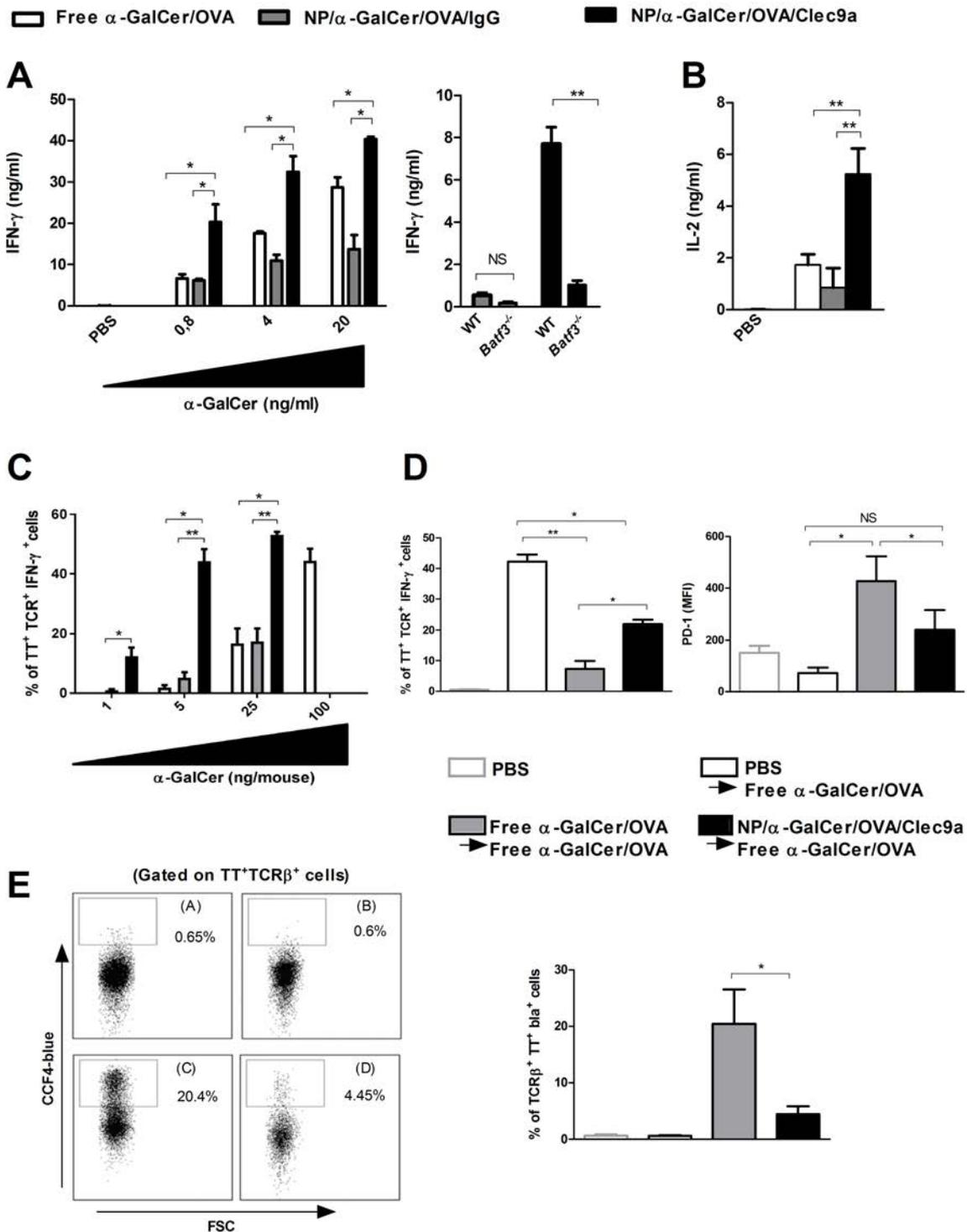


Figure 1. Primary and secondary stimulation of NKT cells is ameliorated by means of α -GalCer vectorization into NP/Clec9a. *A, Left panel,* Spleen cells from WT animals were exposed to grading doses of free α -GalCer plus OVA or with α -GalCer plus OVA encapsulated into PLGA-based NPs armed with anti-Clec9a Abs (NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a) or isotype control Abs (NP/ α -GalCer/OVA/IgG). *Right panel,* Spleen cells from WT or *Baft3*^{-/-} were incubated with NP/ α -

GalCer/OVA/Clec9a or NP/ α -GalCer/OVA/IgG (4ng α -GalCer/ml). Of note, Baft3 deficiency did not reduce the number of splenic NKT cells (not shown). **B**, BM-DCs were exposed for 2 hours a free or encapsulated α -GalCer and, after washing, DCs were cultured with the NKT cell hybridoma DN32.D3. **A-B**, IL-2 and IFN- γ production was quantified 24 hours or 48 hours later by ELISA. Data represent a pool of three independent experiments. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (a Mann–Whitney U test (**A**, *Right panel*) or a Kruskal–Wallis ANOVA (**A**, *Left panel*, **B** and **C**). **C**, *Left panel*, Mice were i.v. injected with PBS alone or graded doses of α -GalCer either in a free soluble form or encapsulated into NP/Clec9a or NP/IgG. After 3 hours, splenic NKT cells were screened for intracellular IFN- γ production. The average percentages of NKT cells positive for IFN- γ are represented. *Right panel*, Intracellular IFN- γ production was quantified in NK cells (100 ng of free α -GalCer/mouse *versus* 5ng of encapsulated α -GalCer/mouse). **D**, Mice were i.v. injected with free α -GalCer (100ng/mouse) or with α -GalCer encapsulated into NP/clec9a (5ng/mouse). Seven days later, mice received a second injection of free α -GalCer (100ng/ml) and spleen NKT cells were screened for intracellular IFN- γ production (*left panel*) and cell surface PD1 expression (*right panel*) 3 hours later. **E**, *Left panel*, Representative dot plots of NKT cells expressing CCF4-blue fluorescence (corresponding to IL-10- β -lactamase⁺ cells). *Right panel*, the percentage of IL-10- β -lactamase⁺ NKT cells among total NKT cells is represented ($n=5$). **C-E**, Shown is a representative experiment of at least three performed ($n=5$). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (a Kruskal–Wallis ANOVA).

We therefore sought to determine whether our delivery system could counter this negative effect. To this end, mice were injected with 100 ng of non-targeted α -GalCer or 5 ng of α -GalCer incorporated into NP/Clec9a, which trigger similar levels of primary NKT cell activation (Fig. 1C). As expected, serial inoculations of non-targeted α -GalCer led to a much lower frequency of IFN- γ expressing NKT cells than in singly inoculated mice (Fig. 1D, *left panel*). Interestingly, primary activation of NKT cells following administration of NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a resulted in a lower degree of NKT cell hyporesponsiveness upon the second challenge. Furthermore, this effect was associated with lower cell surface expression of the hyporesponsiveness marker programmed cell death protein-1 (PD-1) on NKT cells (Parekh et al., 2009) (Fig. 1D, *right panel*). Hence, primary activation of NKT cells via NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a improves the functionality (as measured by IFN- γ production) of NKT cells upon

secondary restimulation. Inoculation of non-targeted α -GalCer has also been shown to induce the expansion of immunosuppressive, IL-10-producing NKT cells (NKT10 cells) (Sag et al., 2014), which might also pose considerable problems for vaccine-based cancer therapies. Our present study confirmed that the administration of non-targeted α -GalCer led to the expansion of NKT10 cells (Fig. 1E). Remarkably, primary activation of NKT cells with NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a dramatically reduced the proportion of NKT10 cells. Together, primary and secondary stimulation of NKT cells is enhanced by targeting α -GalCer via NP/Clec9a.

Co-delivery of particulate protein antigen and α -GalCer via NP/Clec9a induces potent CTL and anti-tumor responses.

We next tested our synthetic delivery system's efficacy with regard to the *in vivo* expansion of CD8⁺ T cells. To this end, mice reconstituted with CFSE-labeled OVA_{257–264}-specific CD8⁺ T cells from Rag/OT-I mice were subcutaneously inoculated with NP/Clec9a containing both α -GalCer and OVA. Relative to controls, NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a induced greater expansion of OVA_{257–264}-specific CD8⁺ T cells in the draining lymph nodes and in the spleen (Fig. 2A, *right panel* and Supplementary Fig. S3A). Importantly, expansion of OVA-specific CD8⁺ T cells was seen to require the CD1d mode of antigen presentation because only baseline levels of proliferation were found in *Cd1d*^{-/-} mice (Fig 2A, *left panel* and supplementary Fig. S3B). This finding suggests that help from NKT cells was critical for antigen cross presentation in our setting. Six days after immunization, the level of OVA-specific T cell cytotoxicity was measured in an *in vivo* assay (Fig. 2B). Inoculation of NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a elicited a higher CTL response (as assessed by target cell lysis) than in control animals. To investigate the effects of targeted antigen and α -GalCer on the control of tumor development, mice were subcutaneously immunized with NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a seven days before the engraftment of EL4 lymphoma cells expressing OVA (EG7). As shown in Figure 2C, inoculation of NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a delayed the growth of EG7 lymphoma cells, relative to NP/ α -GalCer/OVA/IgG and non-targeted OVA plus α -GalCer. Moreover, NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a vaccination of mice bearing pre-established EG7 tumors resulted in a significant delay in tumor overgrowth (Fig. 2D). Taken as a whole, our results show that OVA and α -GalCer targeted via NP/Clec9a have prophylactic and therapeutic effects on solid tumor development.

Figure.2

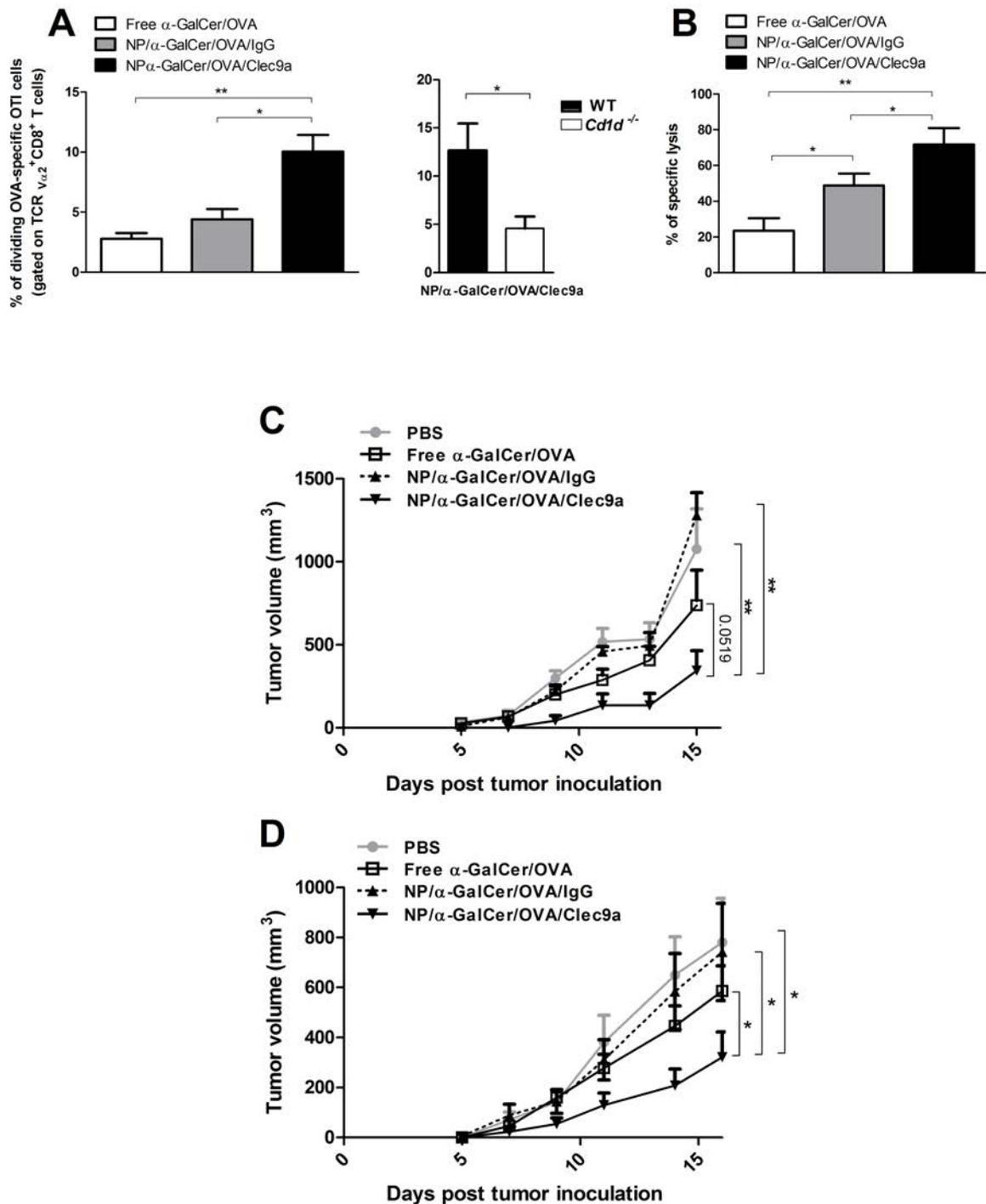


Figure 2. Co-encapsulation of α -GalCer and OVA in NP/Clec9a induces potent CTL and anti-tumour responses. **A** (*right panel*), WT Mice, previously injected with CFSE-labelled Rag2/OT-I cells, were s.c. inoculated with OVA (210ng/mouse) and α -GalCer (5ng/mouse) either free or co-encapsulated in NP/IgG or NP/Clec9a. Three days later, the proliferation of CFSE-labelled $V_{\alpha 2}$ TCR $^+$ CD8 α^+ in popliteal LNs was determined by flow cytometry ($n=5-7$). **A** (*left panel*), The same procedure was

repeated but this time WT and *Cd1d*^{-/-} mice were injected with NP/ α -GalCer/OVA/Clec9a (*n*=5). **B**, Six days after immunization, mice were transferred with CFSE-labelled SIINFEKL-primed (syngeneic target cells) and PKH-26-labelled unprimed (syngeneic control cells) splenocytes. Data represent the percentage of specific lysis (*n*=5). **C**, Free or vectorized OVA (1.26 μ g) and α -GalCer (30ng) were injected s.c. in mice. Seven days later, mice were inoculated s.c. with OVA-expressing EG7 cells (2×10^5 cells/mouse). **D**, Mice previously reconstituted with Rag2/OT-I cells (5×10^6 splenocytes/mouse) were inoculated with OVA-expressing EG7 cells. One and five days later, mice were injected with free or vectorized OVA (210ng/mouse) plus α -GalCer (5ng/mouse). **C** and **D**, Tumor size was measured every two days (*n*=8). **A-D**, One representative experiment out of at least two is shown. ** *P* < 0.01, * *P* < 0.05 (a Kruskal–Wallis ANOVA (**A**, *left panel* and **B**) and a Mann–Whitney U test ((**B**, *right panel*, **C- D**, area under curve for **C** and **D**)).

NPs incorporating α -GalCer and self-tumor antigens protect against tumor development

We next looked at whether our delivery system could abrogate the tolerance of self-tumor antigens. To this end, two tumor peptides (corresponding to dominant CD8⁺ T-cell epitopes from the highly malignant B16 melanoma antigens Trp2 and gp100, respectively) were incorporated into NP/ α -GalCer/Clec9a (Table I). Relative to control groups, the subcutaneous immunization of mice with NP/ α -GalCer/tumor peptides/Clec9a resulted in greater IFN- γ production by draining lymph nodes and spleen cells upon peptide restimulation (Fig. 3A and Supplementary Fig. S4A). The growth of B16F10 cells was considerably delayed (relative to control groups) in mice having been prophylactically vaccinated with NP/ α -GalCer/tumor peptides/Clec9a (Fig. 3B). We next investigated the constructs' potential therapeutic effects on previously implanted tumors. Inoculation of NP/ α -GalCer/tumor peptides/Clec9a in tumor-bearing mice was found to strongly delay tumor progression (Fig. 3C). Experiments with *J α 18*^{-/-} mice were then used to establish whether the protective effect of the NP-based vaccine required help from NKT cells. Indeed, the delay in tumor outgrowth clearly required the presence of NKT cells (Fig. 3D, *left panel*). On the other hand, depletion of CD4⁺ T cells had no effect on vaccine efficacy (Fig. 3D, *right panel*). Of note, the anti-CD4 Ab also depleted CD4⁺ NKT cells (Supplementary Fig. S4B) indicating that, in our setting, the help from CD4⁻ NKT cells is sufficient to delay the tumor growth. To prove that the protective effects of the vaccine depended

on CTLs, the mice's CD8⁺ T cells were depleted by treatment with an anti-CD8 β Ab (Supplementary Fig. S4C). This procedure indeed abrogated the vaccine's antitumor effect (Fig. 3E). Hence, the therapeutic effect triggered by the vaccine depended on NKT cells (but not T-helper cells) and CD8⁺ T cells. We next studied the intratumor ratio of tumor-antigen-specific CD8⁺ T cells to regulatory T cells, since this index is usually closely correlated with tumor regression (Preston et al., 2013). The ratio of Trp2-specific CD8⁺ T cells to CD25⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ T cells was higher in vaccinated, protected animals than in control groups (Fig. 3F, *left panel*, Supplementary Fig. S4D, and data not shown). Furthermore, the intratumor ratio of perforin-expressing CD8⁺ T cells to regulatory T cells was also higher in animals vaccinated with NP/ α -GalCer/tumor peptides/Clec9a (Fig. 3F, *right panel*). Taken as a whole, our results show that the incorporation of tumor self-antigens and α -GalCer into an NP/Clec9a vector promotes a potent, melanoma-self-antigen-specific CD8⁺ T cell response and has prophylactic and therapeutic effects on the growth of tumor cells.

Figure.3

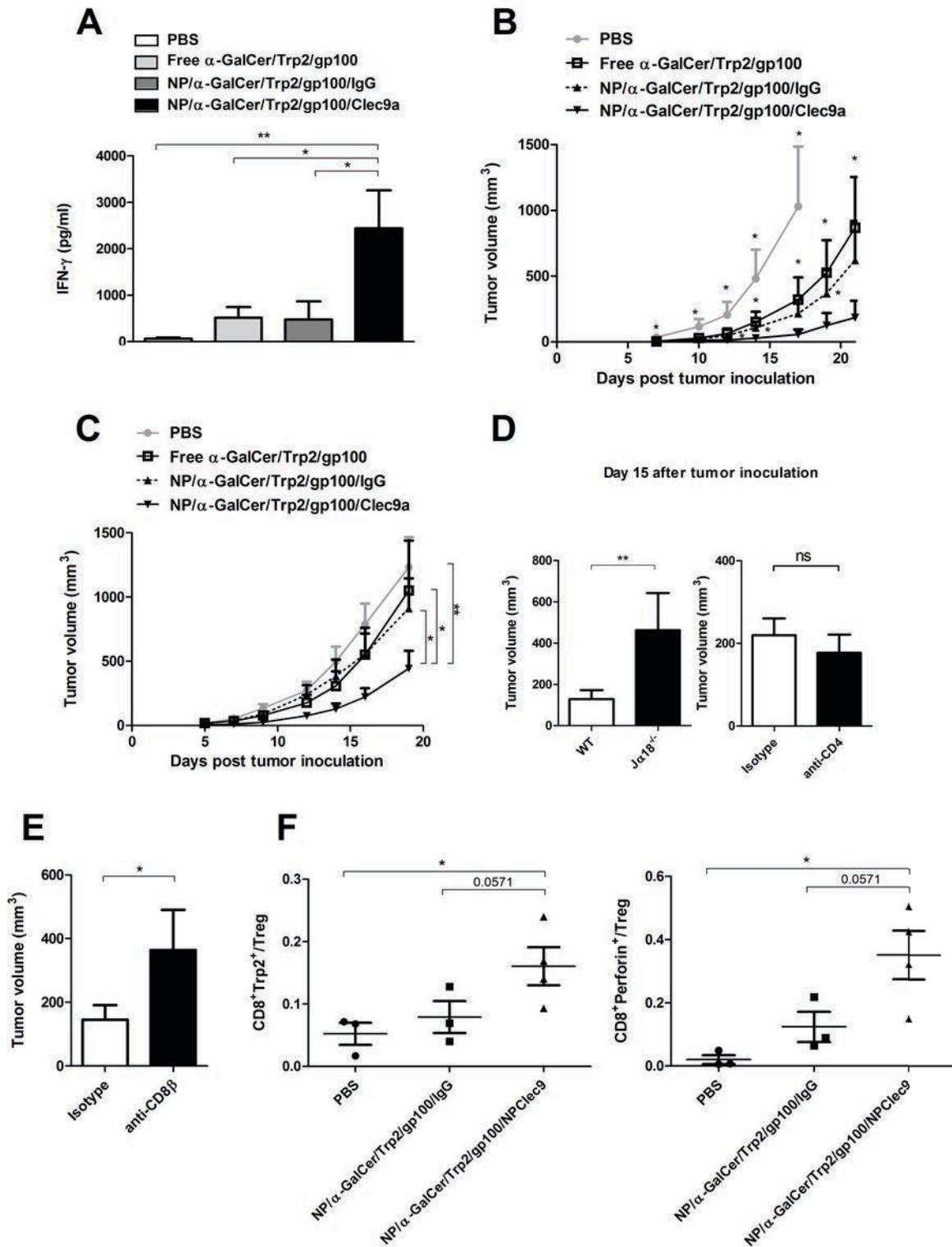


Figure 3. Co-encapsulation of α -GalCer and tumor peptides in NP/Clec9a induces potent CTL and anti-tumour responses. **A**, Mice were s.c. inoculated at day 0, 7 and 14 with Trp2 and gp100 peptides (~2.4. μ g each/mouse) and α -GalCer (30ng/mouse) either free or co-encapsulated in NP/IgG or NP/Clec9a. Three days

later, skin-draining LN cells were restimulated with a cocktail of Trp2 and gp100 (10mg/ml). IFN- γ was measured 48 hours later. Shown is a representative experiment of two performed ($n=5$). **B**, Mice were injected at day 0 and day 7 with peptides (.2.4. μ g each/mouse) and α -GalCer (30ng/mouse) either free or co-encapsulated in NP/IgG or NP/Clec9a. Seven days later, mice were inoculated with B16F10 (5×10^5 cells/mouse). **C**, Mice were s.c. implanted with B16F10. Five (tumor volume: 25-50 mm³) and 12 days later, mice were injected with free or vectorized peptides (.2.4. μ g each/mouse) and α -GalCer (30ng/mouse). **B** and **C**, Tumor volume was measured every two days ($n=16$, two pooled experiments). **D**, The same therapeutic protocol (as that described in panel **C**) was performed. *Left panel*, To investigate the role of NKT cells in protection, $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ mice were vaccinated with NP/ α -GalCer/tumor peptides/Clec9a. *Right panel*, Vaccinated wild type (NKT cell-competent) mice were treated with an anti-CD4 depleting Ab or an isotype control (days 3 and 10). **E**, Vaccinated mice were treated with an anti-CD8 β depleting Ab or an isotype control (days 7, 10, 13 and 16). **D** and **E**, Tumor volumes are indicated at day 15 post-B16 implantation ($n=8$). **F**, On day 14, the tumor mass of each mouse was excised and the number of Trp2-specific CD8⁺ T cells, perforin-expressing CD8⁺ T cells and CD25⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ T cells were determined by flow cytometry. Data (cellular ratio) are shown for each individual mouse. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (a Kruskal–Wallis ANOVA (**A** and **F**) and a Mann–Whitney U test (**B-E**) (area under curve for panels **C**)).

NP/ α -GalCer/CLEC9A targets BDCA3⁺ DCs and optimizes human NKT cell activation

We next investigated NP/CLEC9A's ability to effectively target human BDCA3⁺ (CD141⁺) DCs. In functional terms, this subset resembles murine CD8 α ⁺ cross-presenting DCs and thus constitutes a very interesting target for cancer immunotherapy (Croizat et al., 2010; Poulin et al., 2010; Bachem et al., 2010; Jongbloed et al., 2010). To this end, human DCs were differentiated and expanded *in vitro* from cord blood hematopoietic progenitor cells. Several subpopulations of DCs (including CD11c^{low} BDCA3⁺, accounting for around 35% of total DCs, CD11c^{med} BDCA3⁻ and CD11c^{hi} BDCA3⁻ subpopulations) were obtained at the end of the differentiation procedure (Fig. 4A). Flow cytometry analysis indicated that the CD11c^{low} BDCA3⁺ DC subpopulations was the only one to express CLEC9A (Fig. 4B). To further establish whether or not the NP formulation (Table I) targets BDCA3⁺

DCs, the DCs were incubated with AF647-labeled NPs. As shown in Figure 4C, incubation of human DCs with NP/CLEC9A revealed that BDCA3⁺ DCs were specifically targeted. In contrast, DCs incorporated low levels of NP/IgG. In co-culture experiments, *in vitro*-generated DCs pulsed with graded doses of NP/ α -GalCer/CLEC9A induced a higher level of cytokine production by NKT cells than control preparations did. Indeed, the mouse NKT cell hybridoma 55 $\alpha\beta$ (which expresses a human invariant V α 24/V β 11 T cell receptor that binds to the α -GalCer presented by human CD1d) produced a greater amount of IL-2 (Figure 4D). Similarly, primary NKT cells released greater amounts of IFN- γ when incubated with DCs exposed to NP/ α -GalCer/CLEC9A (Figure 4E). In contrast, human primary NKT cells produced very little IL-4 and no IL-17A (not shown). In summary, targeting α -GalCer to human BDCA3⁺ CLEC9A⁺ DCs results in a strong NKT cell response.

Figure.4

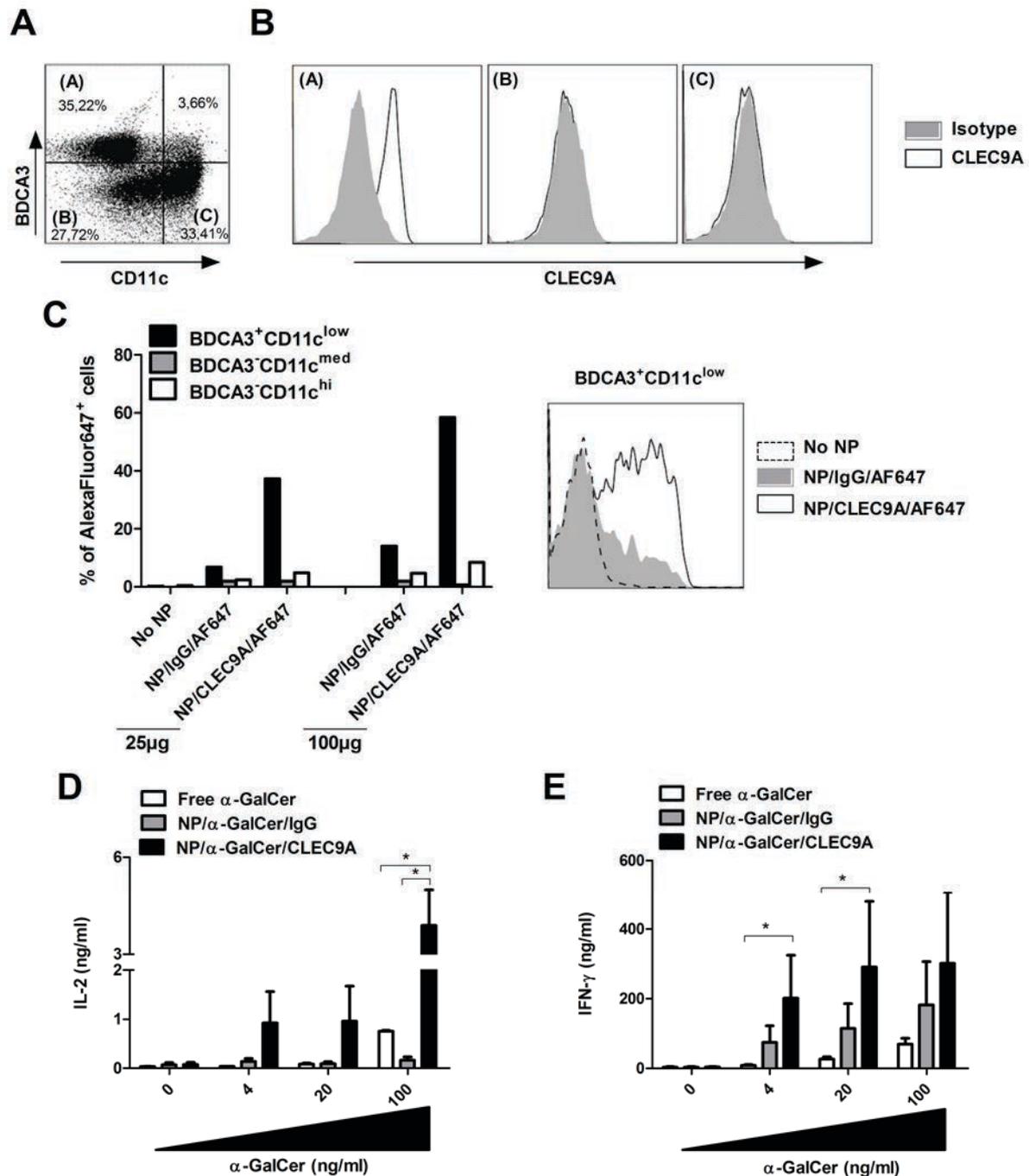


Figure 4. NP/CLEC9A target BDCA3⁺ DCs to activate human NKT cells. **A**, Live HLA-DR⁺ cells were analyzed to determine the percentage of DC subsets, including BDCA3⁺ DCs. **B**, BDCA3⁺CD11c^{low} (population A) BDCA3⁺CD11c^{med} (population B) and BDCA3⁺CD11c^{hi} (population C) were analyzed for the expression of CLEC9A. **C**, 1x10⁵ DCs were incubated with 25 or 100 μg of NP/IgG/AF647 or NP/CLEC9A/AF647 for 15 min. The percentage of AlexaFluor647-positive cells were analyzed by flow cytometry (*left panel*). Specificity of the targeting in BDCA3⁺CD11c^{low} DCs is shown (*right panel*). The experiment shown is

representative of 3 donors. **D** and **E**, 1×10^4 DCs were pulsed with graded doses of free or vectorised α -GalCer and were then co-cultured with 5×10^4 NKT hybridoma 55 $\alpha\beta$ (**D**) or with primary NKT cells (**E**). Mouse IL-2 and human IFN- γ were measured in the supernatant by ELISA after 24 hours and 48 hours respectively (pool of 3 donors). * $P < 0.05$ (a Kruskal–Wallis ANOVA).

NP/ α -GalCer/CLEC9A containing the tumor antigen Melan A strongly promotes the expansion of Melan-A-specific CD8⁺ T lymphocytes

Ex vivo or *in vivo* expansion of tumor-antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes is an important objective in cancer immunotherapy. In order to probe the potential impact of targeting BDCA3⁺ DCs on the *in vitro* priming of CD8⁺ T cells, PBMCs from healthy HLA-A2⁺ donors were cultured with α -GalCer and an antigenic peptide from Melan A (a major target for anti-melanoma therapies). HLA-A2⁺ donors were chosen because they have naïve precursors that are specific for the HLA-A2-restricted Melan A epitope ELAGIGILTV₂₆₋₃₅. For some donors, α -GalCer and Melan A₁₈₋₃₅ encapsulated in NP/CLEC9A strongly promoted the expansion of Melan A-specific CD8⁺ T cells, relative to other groups (Fig. 5A and Supplementary Fig. S5A). Although the level of response varied from one donor to another, the relative overall increase in expansion was statistically significant (Figure 5B and data not shown). At day 14 post-priming, most Melan-A-specific CD8⁺ T cells displayed an effector memory phenotype (CD45RA⁻ CCR7⁻) (Supplementary Fig. S5B). The effect of CLEC9A Ab-armed NPs on the expansion of Melan A-specific CD8⁺ T cells was next tested using PBMCs from melanoma patients. Since the abnormally low frequency of circulating NKT cells in cancer patients is a major hurdle in NKT-cell-based anti-tumor therapy (Tahir et al., 2001; Molling et al., 2005), we considered that it was important to test NP/ α -GalCer/Melan A/CLEC9A's effect on NKT cell expansion. In agreement with the literature data, the melanoma patients had a lower NKT cell count than healthy donors on day 0 (Fig. 5C). However, after 14 days of culture, NKT cells from melanoma patients expanded strongly in response to NP/ α -GalCer/Melan A/CLEC9A. It is noteworthy that the fold increase in the frequency of NKT cells from melanoma patients was greater than for healthy donors; however, the difference was not statistically significant. We next investigated NP/ α -GalCer/Melan A/CLEC9A's ability to expand CD8⁺ T lymphocytes from melanoma patients. The formulation strongly induced the expansion of Melan A-specific CD8⁺ T cells (Fig. 5D). The

proportion of Melan A-specific CD8⁺ T cells was higher in melanoma patients than in healthy donors (~19.5% and ~6.3%, respectively) (Fig. 5B). Importantly, expanded Melan A-specific CD8⁺ T cells produced IFN- γ and CD107 (a degranulation marker) in response to restimulation with Melan A peptide but not with an irrelevant peptide (Fig. 5E and Supplementary Fig. S5C). In summary, NPs decorated with anti-CLEC9A Abs strongly induced the expansion of NKT cells and tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in healthy donors and in melanoma patients; this augurs well for the potential use of our vaccine formulation in cancer patients.

Figure.5

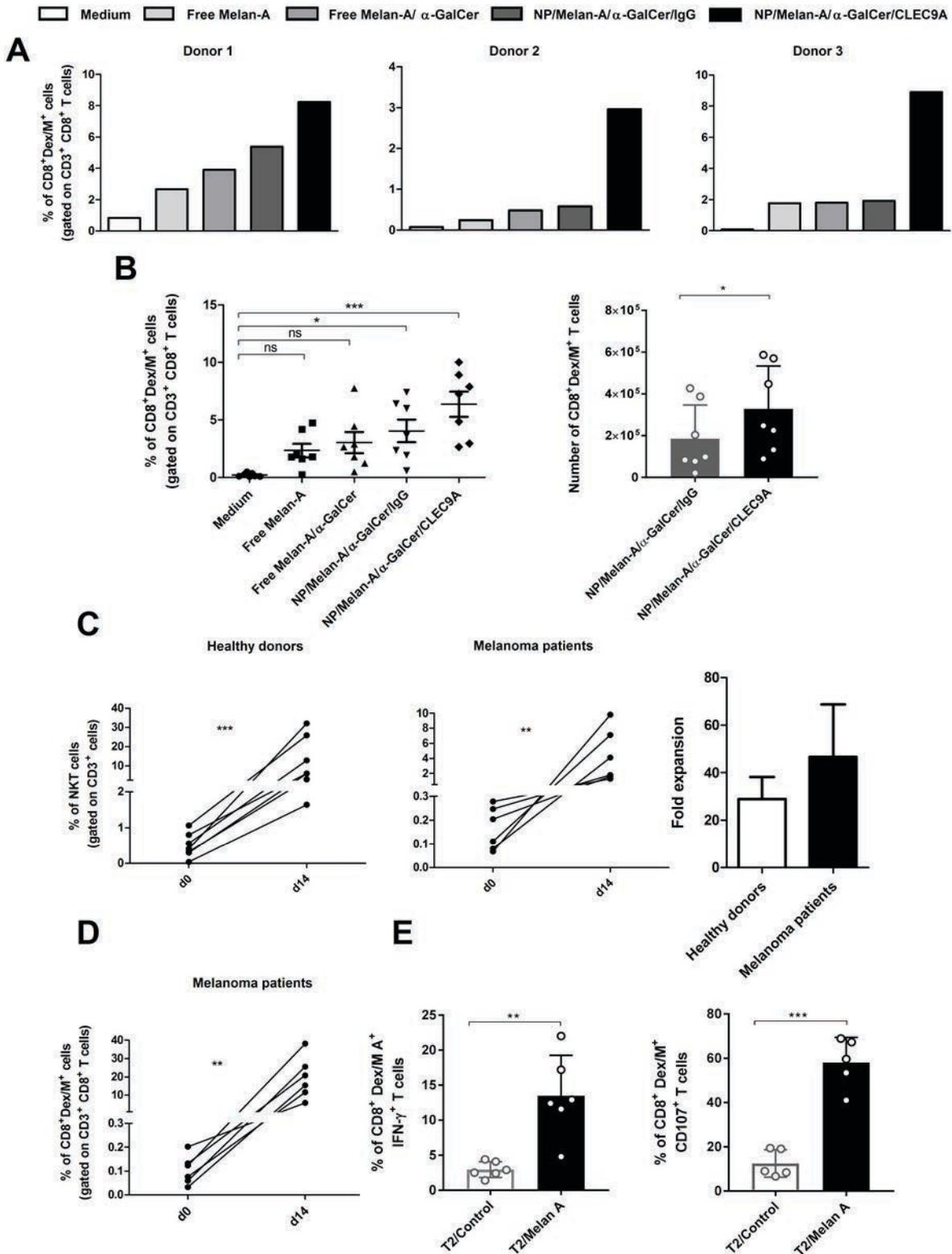


Figure 5. Co-encapsulation of α -GalCer and Melan A in NP/CLEC9A augments the proliferation of Melan A-specific CD8⁺ T cells *in vitro*. A, PBMCs from HLA-A2⁺ donors were cultured with Melan A peptide alone (0.9 μ g/ml) or supplemented with α -GalCer (10ng/ml), either free or encapsulated in NP/Clec9a or NP/IgG. Fourteen days later, the proportion of Melan A-specific (dextramer A2/Melan A₂₆₋₃₅-

specific cells, Dex/M⁺) CD8⁺ T cells were determined by flow cytometry. Data from three donors are shown. **B**, The magnitude (frequency and cell number/well) of the Melan A-specific CD8⁺ T cell populations from a pool of seven healthy donors is shown. Horizontal bars indicate mean values. **C**, At the end of the culture, gated CD3⁺ expanded cells were analyzed for 6B11 labelling. The frequency of human NKT cells (CD3⁺ 6B11⁺) from healthy donors and from melanoma patients is shown at day 0 and day 14. The fold expansion of NKT cells is presented in the *right panel*. **D** and **E**, PBMCs from melanoma donors were cultured with NP/ α -GalCer/Melan A/Clec9a. **D**, Proportions of Melan A-specific CD8⁺ T cells are shown at day 0 and day 14. **E**, The proportion of Melan A-specific CD8⁺ T cells (day 14) expressing IFN- γ or CD107 upon activation with T2 cells pulsed with the Melan A peptide or with an irrelevant peptide is shown. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (a Wilcoxon test (**B**, *right panel*), a Mann–Whitney U test (**C**, **D** and **E**) or a Kruskal–Wallis ANOVA (**B**, *left panel*)).

Discussion

Results from preclinical and clinical studies have highlighted the value of using the NKT cell agonist α -GalCer in cancer treatments (for reviews, see [Dhodapkar and Richter, 2011](#); [Exley and Nakayama, 2011](#)). In the clinic, α -GalCer has been inoculated alone as a soluble agent or loaded onto PBMCs or DCs ([Motohashi et al., 2009](#); [Schneiders et al., 2011](#)). Although animal studies have clearly revealed that the adjuvant functions of NKT cells can be exploited by the co-administration of soluble α -GalCer and antigens ([Cerundolo et al., 2009](#); [Fujii et al., 2003](#); [Hunn and Hermans, 2013](#)), the NKT cells' helper functions have yet to be tested in a human setting. In the mouse system, there is evidence to suggest that NKT cells can license DCs for cross-priming; the resulting CTL response may differ from that generated by DCs licensed by TLR activation or by T-helper lymphocytes (Fujii et al., 2003; Hermans et al., 2003; Stober et al., 2003; Semmling et al., 2010; Dölen et al., 2015). Importantly, Semmling and al. demonstrated that the CD1d-restricted lipid and protein antigens (free α -GalCer and OVA) must be presented by the same DC ([Semmling et al., 2010](#)). In order to generate an effective CTL and antitumor response, we exploited the NKT cells' unique ability to license cross-priming DCs. To this end, we developed a targeted strategy based on the use of PLGA NPs decorated with anti-clec9a Abs. This formulation was designed to simultaneously deliver tumor antigens and α -GalCer to the same cross-priming DCs, giving a cognate interaction.

The biodegradable polymer PLGA has been widely used for drug delivery in general and in cancer therapy in particular. PLGA NP systems have a number of advantages, including (i) a high Ag density, (ii) the ability to incorporate various classes of molecules (including proteins and lipids), (iii) the ability to reach MHC I pathway after uptake by DCs, and (iv) slow release kinetics (Silva et al., 2016). By using PLGA NPs armed with anti-clec9a Abs, we clearly demonstrated that active co-delivery of tumor antigens and α -GalCer to cross-priming DCs promotes better CTL and antitumor responses than free antigen and α -GalCer do. These data extend our previous findings in experiments with DEC205 (a marker that is not exclusively expressed by cross-priming DCs) and the non-self-antigen OVA (Macho-Fernandez et al., 2014). After checking that our NP-based anti-Clec9a formulation also triggered cross-priming of OVA and protected against the growth of aggressive, OVA-expressing EG7 tumors, we then showed that it can abrogate the immune tolerance of tumor self-antigens (Trp2, gp100). The resulting potent antitumor CTL response was able to prophylactically and therapeutically control solid tumor outgrowth in a model of aggressive melanoma. We showed that antigen cross-presentation *in vivo* has an absolutely requirement for help from NKT cells, but not conventional T-helper cells. With the abrogation of tolerance, our data extend Semmling et al.'s pioneering work and shed light on novel therapeutic approaches for controlling tumor development.

With a view to optimizing immune responses (especially in the context of cancer), vaccination usually involves several prime-boost immunizations. Our NP formulation's ability to promote strong CTL and antitumor responses (relative to free tumor antigens and α -GalCer) may be rooted in the priming and boost steps. Firstly, the NKT cells' primary activation threshold (i.e. the IFN- γ production) is higher following direct activation by cross-priming DCs. As a result, the enhancement of the NKT cells' helper function is likely to prime naïve CTLs to a greater extent. Secondly, the cross-talk between DCs, NKT cells and naïve CD8⁺ T cells elicited by our co-delivery system is likely to lead to a CTL response that differs both quantitatively and qualitatively from that induced by more classical activation pathways (e.g. DCs matured with TLR agonists or licensed by T-helper cells). Interestingly, Dölen and colleagues observed that the co-encapsulation of antigen (OVA) and α -GalCer in NPs triggers stronger CTL and antitumor responses than co-encapsulation of antigen and a TLR agonist does (Dölen et al., 2015). Although the latter researchers did not specifically target DCs, their results suggested that cognate licensing of DCs by NKT

cells is more effective than conventional, TLR-based adjuvants. Several lines of research indicates that α -GalCer and TLR agonists can act cooperatively to promote DC maturation and T cell priming (Cerundolo et al., 2009; Hermans et al., 2007; Dong et al., 2016; Coelho-Dos-Reis et al., 2016). In the future, we intend to look at whether or not the incorporation of α -GalCer and a TLR ligand in our NP-based formulation will cooperatively enhance the licensing of DCs and improve the outcome of antitumor vaccination. Thirdly, our data clearly show that the use of our NP formulation was associated with stronger secondary stimulation of NKT cells (IFN- γ production) and a greater ability to boost CTLs. The [cross-priming] DCs' unique ability to limit the appearance of unresponsive (PD1-expressing) NKT cells has positive implications for the development of NKT cell-based cancer therapies. Fourthly, our formulation strongly limited the expansion of IL-10-expressing NKT cells. A recent study showed that mice pretreated with α -GalCer are less able to reject tumors (due to the role of NKT10 cells) (Sag et al., 2014). Therefore, the reduced expansion of NKT10 seen in mice vaccinated with anti-Clec9a Ab-bearing NPs might contribute to the observed antitumor effects. Overall, there are many reasons for co-delivering protein antigen and α -GalCer to cross-priming DCs. In view of the promising proof-of-concept results, we considered that it was important to analyze the co-delivery strategy's potential added value in a human setting.

Given that the NKT/CD1d axis is conserved in humans (with no HLA restriction), NKT cell therapy has attracted interest. Adoptive transfer of *in-vitro*-expanded, tumor-specific CD8⁺ T cells is an interesting immunotherapeutic option. Hence, the NKT cells' licensing function might be worth exploiting (either alone or in combination with vaccine strategies) in cell-based allogeneic immunotherapy. Targeting antigens to human BDCA3⁺ DCs via the CLEC9A endocytic pathway favors antigen cross-presentation and the priming of CD8⁺ T cell responses (Tullett et al., 2014). To assess the targeting properties of anti-CLEC9A Ab-armed NPs, we studied DCs expanded from cord blood hematopoietic progenitor cells. Under our experimental conditions, the *ex vivo* generated DCs resembled blood DCs (Balan et al., 2014). The NP formulation (i) specifically targets cross-priming, CLEC9A-expressing DCs, and (ii) triggers a strong NKT cell response. Targeted α -GalCer not only improves the *in vitro* expansion of human NKT cells (data not shown) but also enhances their cytokine response relative to experiments with free α -GalCer or control NPs. Finally, using the clinically relevant tumor antigen Melan A, we show that NKT cell-licensed

human DCs trigger the expansion of functional Melan A-specific CD8⁺ T cells both in healthy donors and - more importantly - in melanoma patients. To the best of our knowledge, our study is the first to have implemented Semmling et al.'s concept in a human system. An *in vivo* demonstration will require the use of humanized mice. Relative to cancer-free individuals, melanoma patients have lower NKT cell counts and/or impaired NKT cell functions (Tahir et al., 2001; Molling et al., 2005). We showed that targeted α -GalCer strongly expands NKT cells from melanoma patients. Taken as a whole, our results suggest that this NP-based formulation may have promise in the treatment of cancer. One concern with the clinical implementing of this type of vaccine is the relatively low NKT cell count in humans (relative to mice). Various means of circumventing this potential drawback are being developed, and the transfer of autologous, *ex-vivo*-expanded NKT cells appears to be a reliable strategy for enhancing anticancer strategies based on NKT cells (Yamasaki et al., 2011). Moreover, the reprogramming of NKT cells to induced, pluripotent stem cells and their subsequent re-differentiation into more functional NKT cells (compared with the parental cells) is opening up new avenues in this field (Kitayama et al., 2016; Yamada et al., 2016).

In conclusion, we have developed an experimental strategy that emulates NKT cell help and analyze the corresponding formulation's effect on the expansion of tumor antigen CD8⁺ T cells (in mouse and human systems) and the control of tumor development. With regard to improving vaccine-based cancer treatments, our data highlight the potential benefits of delivering tumor antigens and α -GalCer into cross-presenting DCs. The present preclinical results constitute the first proof of concept for the clinical use of this NP delivery system in cancer immunotherapy.

Materials and methods

Mice

Male C57BL/6 mice (8-week old) were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Rag2/OT-I transgenic mice (enriched in OVA₂₅₇₋₂₆₄-specific CD8⁺ T cells) were from Jackson Laboratory (St. Germain sur l'Arbresle, France). The generation of *Cd1d*^{-/-}, *Ja18*^{-/-} (which lacks NKT cells) and *Baft3*^{-/-} (which have a strongly reduced proportion of CD8a⁺ DCs) mice was described in (Mendiratta et al., 1997; Cui et al., 1997; Hildner et al., 2008). The IL-10- β -lactamase reporter mouse (the ITIB mouse) was described in (Bouabe et al., 2011). All animal work conformed with the Lille

Pasteur Institute's regulations on animal care and use guidelines and was approved by the local Animal Care Committee (CEAA75 and 00357.03).

Reagents and peptides

Alpha-GalCer was synthesized as described ([Macho-Fernandez et al., 2014](#)). OVA was purchased from InvoGen (Toulouse, France), vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit from Invitrogen (Courtaboeuf Cedex, France) and the PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). All cytokines for expansion and differentiation assays were from Peprotech (Neuilly-Sur-Seine, France). The following peptides were synthesized to a purity >95-99% by high-performance liquid chromatography (GL Biochem, Shanghai, China): SIINFEEKL, spanning amino acids 257-264 of the mouse OVA; SVYDFVWL, spanning amino acids 180-188 of the mouse melanoma antigen tyrosinase related protein-2 (Trp2); KVPRNQDWL, spanning amino acids 25–33 of the human melanoma glycoprotein 100 (gp100) and HSYTTAEELAGIGILTV, spanning amino acids 18-35 of the human Melan A.

Description of Abs, tetramers and dextramers.

Allophycocyanin-conjugated mAbs against mouse Siglec H, PE-Cy7 conjugated CD11c, anti-NK1.1, anti-PD1, anti V α 2-TCR, FITC-conjugated anti-TCR β , anti-CD8 α , CD172 α , PerCp-CY5.5-conjugated CD24, Alexa Fluor647-conjugated IFN- γ and isotype control, Pacific blue-conjugated I-A/I-E, PE-conjugated anti-CD8 α , anti-Clec9a (also termed DNGR-1) were all purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix Cedex, France) or Ozyme/Biolegend (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Antibodies used to analyze CD45⁺-enriched tumor cells were as follows: CD3-APCCy7, CD8-Alexa Fluor 700, CD4-Pacific blue, CD25-FITC, FoxP3-PeCy7, perforin-APC (Biolegend or eBiosciences). Mouse anti-human Abs were as follows: APCCy7-conjugated HLA-DR, AF700-conjugated CD11c and PercpCy5.5 anti-NKT (clone 6B11), FITC anti-human Lineage Cocktail were from Biolegend. V500-conjugated CD8, AF700-conjugated CD3, AF647-conjugated CCR7, FITC-conjugated CD3, V450-conjugated (CD3, CD14, CD19, CD20, CD56), FITC-conjugated IFN- γ , APC-H7-conjugated CD3, V421-conjugated HLA-DR, PECy7-conjugated CD45RA and FITC-conjugated CCR7 were all purchased from BD Biosciences. APC-conjugated BDCA1, PE-conjugated CLEC9A, FITC-conjugated BDCA3 and PE-conjugated anti-NKT (clone 6B11), APC-conjugated BDCA3 were

from Miltenyi Biotec (Paris, France). PE-conjugated dextramer H-2K^b /Trp₂₁₈₀₋₁₈₈ and dextramer A2/Melan A₂₆₋₃₅ were from Immudex (Copenhagen, Denmark). PE-conjugated α -GalCer-loaded CD1d tetramer was from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Facility. Flow cytometric analyses were performed with a Fortessa cytometer (BD Biosciences) and the acquired data were processed using FlowJo software (Tree Star Inc.). Pure anti-mouse Clec9a (clone 7H11), anti-human CLEC9A (clone 8F9) and isotype rat IgG1 (clone HRPN) and mouse IgG2a (clone C1.18.4) used for the NP formulation were from Miltenyi Biotec (Paris, France) and from Bio X Cell (West Lebanon, NH), respectively. The neutralizing rat anti-mouse CD8b Ab (YTS-156.7, IgG2b) was described in (Kyaw et al., 2013) and the anti-mouse CD4 Ab (GK1.5, IgG2b) was from Dr L. Fend (Transgene, Strasbourg). The isotype controls were from Bio X Cell (West Lebanon, NH).

Preparation and characterization of PLGA-based NPs

Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based NPs coated with lipid-polyethylene glycol and carrying Abs were generated using the copolymer PLGA essentially as described (Macho-Fernandez et al., 2014; Cruz et al., 2010, 2011; Kitayama et al., 2016). In brief, endotoxin-free full OVA (5 mg) or tumor peptides (20 mg) and α -GalCer (50 μ g) were co-encapsulated to 100 mg of PLGA. Mouse or human anti-Clec9A/CLEC9A Abs or their isotype controls were attached to the lipid-polyethylene glycol layer (Macho-Fernandez et al., 2014; Cruz et al., 2010, 2011). PLGA-based NPs were characterized by dynamic light scattering and zeta potential (see details in Table 1) (Macho-Fernandez et al., 2014; Cruz et al., 2010). Incorporation of OVA or peptides in NPs was quantified by Coomassie dye protein assay (Thermo Fischer scientific, Waltham, MA) or by reversed-phase high-performance liquid chromatography (Tel et al., 2013). The presence of Abs on the particle surface was quantified by Coomassie dye protein assay.

Cell lines and mouse hybridomas

EG7 and B16F10 cells were obtained from the American type culture collection. The V α 14/V β 8.2⁺ NKT cell hybridoma DN32.D3 was from A. Bendelac (Chicago, USA). The mouse T cells hybridoma 58 α / β cells transfected with a human invariant V α 24/V β 11 TCR (which recognizes α -GalCer presented by human CD1d) was described by Thedrez and colleagues (Thedrez et al., 2007).

***In vitro* validation of the NPs**

Spleen cells from WT, knock-out (*Cd1d*^{-/-}, *Ja18*^{-/-}, *Baft3*^{-/-}) mice were incubated with grading doses of free or encapsulated α -GalCer plus OVA for 48 hours. Bone marrow-derived DCs (BM-DCs) generated in the presence of fms-like tyrosine kinase 3 ligand were incubated during 2 hours with grading doses of free or vectorized α -GalCer (1×10^5 /well). After washes, NKT hybridoma (DN32.D3, 1×10^5 cells/well) were added to pulsed BM-DCs for 24 hours. Mouse cytokines were measured in culture supernatants by ELISA.

Assessment of primary and secondary NKT cell activation *in vivo*

Mice were administrated intravenously (i.v.) with different doses of free or vectorized α -GalCer. Three hours later, sera were collected for IFN- γ quantification and spleen cells were assessed for IFN- γ intracellular staining by flow cytometry. To study NKT cell hyporesponsiveness, mice received a second challenge of free α -GalCer 7 days after the primo-activation. To quantify the frequency of IL-10-producing NKT cells, ITIB (IL-10-reporter) mice were i.v administrated with free or vectorized α -GalCer and one month later the expression of β -lactamase (IL-10) by NKT cells was assessed by flow cytometry (Bouabe et al., 2011). Briefly, spleen cells were resuspended in PBS containing CCF4-AM substrate (1 μ M) supplemented with probenecid (2.5 mM), and then incubated in the dark for 45 min at room temperature. The cells were then washed, labeled with appropriate Abs, α -GalCer-loaded CD1d tetramer and propidium iodide and analyzed by flow cytometry.

Analysis of the CD8⁺ T cell and anti-tumor response to OVA or OVA-expressing tumor cells

To assess the *in vivo* OVA-specific CD8⁺ T cell response, CFSE-labeled Rag2/OT-I spleen cells (2×10^7) were adoptively transferred (i.v.) to naïve C57BL/6 mice at day 0. One day later, mice were immunized into the footpads with free or vectorized OVA plus α -GalCer (200 ng OVA and 5ng α -GalCer/mouse). The frequency of CFSE-labeled OVA-specific CD8⁺ T cells were analyzed in popliteal lymph nodes (LNs) and spleen cells at day 4 by flow cytometry. To this end, cells were stained with anti-CD8-PE and anti-TCRV α 2-PECy7 Abs. For the *in vivo* CTL assay, 6 days after immunization with NPs, mice were i.v injected with both CFSE-labeled SIINFEKL-pulsed splenocytes and PKH-26-labeled non pulsed splenocytes (2×10^7 cells/mouse). Two days later, spleen cells were harvested and the number of CFSE-

labeled and PKH-26-labeled cells were determined by flow cytometry. The percentage of specific lysis was calculated as follows: $(1 - \{\text{ratio non pulsed} / \text{ratio pulsed}\}) \times 100$, where the ratio is equal to number of PKH-26-labeled cells/CFSE-labeled cells. Mice were s.c. injected with free or vectorized OVA and α -GalCer. Seven days later, mice received s.c. OVA-expressing EL-4 lymphoma cells (EG7 cells, 2×10^5 cells/mouse). In the therapeutic context, mice were first reconstituted (i.v.) with Rag2/OT-I cells (5×10^6 spleen cells/mouse) and then inoculated with EG7 cells. Mice were immunized with free or vectorized OVA and α -GalCer 1 day and 5 days after the inoculation of EG7 cells. Tumor volume (mm^3) was calculated using the formula: $\text{length (mm)} \times (\text{width}^2 (\text{mm}^2)) \times 3.14/6$. For ethical reasons, mice were sacrificed before tumor size reached 1500 mm^3 .

Analysis of CD8⁺ T cell and anti-tumor responses

Analysis of the anti-OVA CTL response and anti-tumor response to OVA-expressing tumor cells can be found in Supplementary Materials and Methods section. To analyze the immune response to tumor self-antigens, the formulations were injected subcutaneously (s.c.) in the back of the mouse twice with an interval of 7 days. Seven days after the last injection, cytokine production by skin-draining lymph node (LN) cells and/or splenocytes was quantified after restimulation with Trp2 and gp100 peptides ($10 \mu\text{g/ml}$). To study the effect of the vaccine on the anti-tumor response, mice were injected twice (day 0 and day 7) and were implanted with 5×10^5 B16F10 cells at day 14. For the therapeutic setting, mice were injected with 5×10^5 B16F10 cells (day 0) before the two immunizations (day 5 and day 12). Tumor size was measured using a caliper every 2 days. Infiltration of T cells in tumors was analyzed at day 14 (therapeutic protocol). Briefly, single cell suspensions from tumors were enriched for CD45⁺ cells using the multiMACS separation system (Miltenyi Biotec, Germany). Cells were stained with the PE-conjugated dextramer H-2K^b /Trp2₁₈₀₋₁₈₈ at RT for 30 min and then surface stained for CD3 and CD8. For regulatory CD4⁺ T cell labelling, tumor cells were surface stained for CD3, CD4 and CD25 and fixed, permeabilized and labeled with anti-Foxp3 Ab.

Generation of BDCA-3⁺ CLEC9A⁺ DCs and NKT cells

Cord blood hematopoietic progenitor CD34⁺ cells were from ABCell-Bio (Paris, France) or from the EFS Grenoble. To amplify hematopoietic progenitor cells, cells

were cultured in the stemspan medium in the presence of fms-like tyrosine kinase 3 ligand (100ng/ml), stem cell factor (100ng/ml), IL-3 (20ng/ml) and thrombopoietin (50ng/ml) for one week. To induce differentiation of the expanded cells into DCs, cells were cultured in complete RPMI 1640 medium (round-bottom 96 well plate, $1-2 \times 10^4$ cells/well) containing stem cell factor (20ng/ml), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (20ng/ml), IL-4 (20ng/ml) and FLT3 ligand (100ng/ml). To optimize the differentiation step and to increase the yield of DCs, 1mM stemregenin-1 (Calbiochem, Fontenay-sous-Bois France) was added (Ballan et al., 2014). The milieu plus differentiation factors were renewed after 5 days. Dendritic cells were harvested between day 10 and day 14. NKT cells were expanded from human PBMCs. Briefly, free or vectorized α -GalCer (10ng/ml) was added at day 0 and IL-2 (50ng/ml) at day 1. At day 7, the percentage of NKT cells ($CD3^+ 6B11^+$ cells) was determined by flow cytometry. To enrich NKT cells, cells positive for 6B11 (a mAb that recognizes a unique determinant in the CDR3 region of the invariant ($V\alpha 24$ -JaQ) TCR chain of NKT cells) were selected with immune-magnetic beads according to the manufacturer's instructions (MACS separator, Miltenyi Biotec).

Targeting of BDCA-3⁺ CLEC9A⁺ DCs and co-cultures with NKT cells

Generation of human $CD34^+$ -derived $BDCA3^+ CLEC9A^+$ DCs and PBMC-derived NKT cells can be found in Supplementary Materials and Methods section. To study the specificity of the targeting, total DCs (1×10^5 cells/well) were incubated with Alexa Fluor647-labeled NPs. After 15 minutes, the frequency of Alexa Fluor647 positive cells was analyzed within the different DC subpopulations by flow cytometry. To study NKT cell activation, total DCs were pulsed with free or vectorized α -GalCer and co-cultured for 24 or 48 hours with the NKT hybridoma or with primary NKT cells (purity >95%) (ratio 1:5).

Expansion of Melan A₂₆₋₃₅-specific CD8⁺ T cells

To expand Melan A₂₆₋₃₅-specific CD8⁺ T cells, PBMCs (2×10^6 cells/well) from HLA-A2⁺ individuals were cultured with free or vectorized Melan A₁₈₋₃₅ peptide (0.9mg/ml) plus α -GalCer (10ng/ml) in the presence of IL-2 (50ng/ml) for 14 days. Dextramer A2/Melan A₂₆₋₃₅-specific cells were analyzed by flow cytometry. To analyze IFN- γ and CD107 expression, cells were first labelled with PE-conjugated dextramer A2/Melan A₂₆₋₃₅ washed and restimulated with Melan A peptide-pulsed TAP-deficient T2 cells (10:1 ratio) for 5 hours. Cells were then surface-labelled with anti-CD3 and anti-CD8

Abs and submitted to IFN- γ intracellular staining. For CD107 detection, anti-CD107a+b Abs were added in the medium at the beginning of the restimulation in the presence of Golgi-STOP for 4 hours. Cells were then labeled with anti-CD3 and anti-CD8 Abs.

Origin of PBMCs

Blood samples from healthy donors and from melanoma patients (stage I to IV) were obtained from the EFS Grenoble. Approval to conduct the study was given by the local ethics committee of Grenoble University Hospital. The Declaration of Helsinki Principles was followed and all participants gave their written consent. PBMC samples were obtained via standard protocols.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. A Mann-Whitney U test was used to compare two groups, unless otherwise specified. Comparisons of more than two groups with each other were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) Kruskal-Wallis test (nonparametric), followed by Dunn's post-test (PRISM v6 software; Graphpad). For tumor size, means of "area under the curve" of each individual were compared using a Mann-Whitney U test unless otherwise specified. A *P* value <0.05 was considered significant.

Acknowledgements

Drs A. Bendelac (University of Chicago, IL) and M. Casorati and M. Dellabona (San Raffaele scientific institute, Milan, Italy) are acknowledged for the gift of the NKT cell hybridoma DN32.D3 and 55 $\alpha\beta$, respectively. We are grateful to Drs H. Bouabe (Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom) and T. Torrès (ULB, Brussels, Belgium) for the gift of ITIB and *Baft3*^{-/-} mice. Dr L. Fend (Transgene, Strasbourg) and Drs S. Cobbold and A. Kok (Oxford, United Kingdom) are acknowledged for the gift of the neutralizing anti-mouse CD4 and CD8 β Ab, respectively. We gratefully acknowledge the generous support from the NIAID Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA) in supplying α -GalCer-loaded CD1d tetramer. Dr L. Poulin (CIIL, Institut Pasteur de Lille, France) is acknowledged for its advices on the expansion of human DCs.

References

- Aarntzen, E.H.J.G., Bol, K., Schreibelt, G., Jacobs, J.F.M., Lesterhuis, W.J., Van Rossum, M.M., Adema, G.J., Figdor, C.G., Punt, C.J.A., and De Vries, I.J.M. (2012). Skin-test infiltrating lymphocytes early predict clinical outcome of dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma. *Cancer Res.* *72*, 6102–6110.
- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., 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.
- Balan, S., Ollion, V., Colletti, N., Chelbi, R., Montanana-Sanchis, F., Liu, H., Vu Manh, T.-P., Sanchez, C., Savoret, J., Perrot, I., et al. (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.
- Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L. (2007). The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 297–336.
- Bouabe, H., Liu, Y., Moser, M., Bösl, M.R., and Heesemann, J. (2011). Novel highly sensitive IL-10-beta-lactamase reporter mouse reveals cells of the innate immune system as a substantial source of IL-10 in vivo. *J. Immunol.* *187*, 3165–3176.
- Brennan, P.J., Brigl, M., and Brenner, M.B. (2013). Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* *13*, 101–117.
- Cerundolo, V., Silk, J.D., Masri, S.H., and Salio, M. (2009). Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 28–38.
- Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* *39*, 1–10.
- Coelho-Dos-Reis, J.G., Huang, J., Tsao, T., Pereira, F.V., Funakoshi, R., Nakajima, H., Sugiyama, H., and Tsuji, M. (2016). Co-administration of α -GalCer analog and TLR4 agonist induces robust CD8(+) T-cell responses to PyCS protein and WT-1 antigen and activates memory-like effector NKT cells. *Clin. Immunol.* *168*, 6–15.
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Vu Manh, T.-P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., et al. (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.
- Cruz, L.J., Tacke, P.J., Fokkink, R., Joosten, B., Stuart, M.C., Albericio, F., Torensma, R., and Figdor, C.G. (2010). Targeted PLGA nano- but not microparticles specifically deliver antigen to human dendritic cells via DC-SIGN in vitro. *J Control Release* *144*, 118–126.
- Cruz, L.J., Tacke, P.J., Bonetto, F., Buschow, S.I., Croes, H.J., Wijers, M., de Vries, I.J., and Figdor, C.G. (2011). Multimodal imaging of nanovaccine carriers targeted to human dendritic cells. *Mol. Pharm.* *8*, 520–531.

Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M. (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623–1626.

Dhodapkar, M.V., and Richter, J. (2011). Harnessing natural killer T (NKT) cells in human myeloma: progress and challenges. *Clin. Immunol.* 140, 160–166.

Dhodapkar, M.V., Sznol, M., Zhao, B., Wang, D., Carvajal, R.D., Keohan, M.L., Chuang, E., Sanborn, R.E., Lutzky, J., Powderly, J., et al. (2014). Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci Transl Med* 6, 232ra51.

Dölen, Y., Kreutz, M., Gileadi, U., Tel, J., Vasaturo, A., van Dinther, E.A.W., van Hout-Kuijjer, M.A., Cerundolo, V., and Figdor, C.G. (2015). Co-delivery of PLGA encapsulated invariant NKT cell agonist with antigenic protein induce strong T cell-mediated antitumor immune responses. *Oncoimmunology* 5.

Dong, T., Yi, T., Yang, M., Lin, S., Li, W., Xu, X., Hu, J., Jia, L., Hong, X., and Niu, W. (2016). Co-operation of α -galactosylceramide-loaded tumour cells and TLR9 agonists induce potent anti-tumour responses in a murine colon cancer model. *Biochem. J.* 473, 7–19.

Exley, M.A., and Nakayama, T. (2011). NKT-cell-based immunotherapies in clinical trials. *Clin. Immunol.* 140, 117–118.

Fujii, S.-I., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L., and Steinman, R.M. (2003). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J. Exp. Med.* 198, 267–279.

Hermans, I.F., Silk, J.D., Gileadi, U., Salio, M., Mathew, B., Ritter, G., Schmidt, R., Harris, A.L., Old, L., and Cerundolo, V. (2003). NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J. Immunol.* 171, 5140–5147.

Hermans, I.F., Silk, J.D., Gileadi, U., Masri, S.H., Shepherd, D., Farrand, K.J., Salio, M., and Cerundolo, V. (2007). Dendritic cell function can be modulated through cooperative actions of TLR ligands and invariant NKT cells. *J. Immunol.* 178, 2721–2729.

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., et al. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097–1100.

Hunn, M.K., and Hermans, I.F. (2013). Exploiting invariant NKT cells to promote T-cell responses to cancer vaccines. *Oncoimmunology* 2, e23789.

Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *Journal of Experimental Medicine* 207, 1247–1260.

Kitayama, S., Zhang, R., Liu, T.-Y., Ueda, N., Iriguchi, S., Yasui, Y., Kawai, Y., Tatsumi, M., Hirai, N., Mizoro, Y., et al. (2016). Cellular Adjuvant Properties, Direct Cytotoxicity of Re-differentiated V α 24 Invariant NKT-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 6, 213–227.

Klebanoff, C.A., Acquavella, N., Yu, Z., and Restifo, N.P. (2011). Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunol. Rev.* 239, 27–44.

Kyaw, T., Winship, A., Tay, C., Kanellakis, P., Hosseini, H., Cao, A., Li, P., Tipping, P., Bobik, A., and Toh, B.-H. (2013). Cytotoxic and Proinflammatory CD8⁺ T Lymphocytes Promote Development of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in ApoE-Deficient Mice. *Circulation* 127, 1028–1039.

Macho-Fernandez, E., Cruz, L.J., Ghinnagow, R., Fontaine, J., Bialecki, E., Frisch, B., Trottein, F., and Faveeuw, C. (2014). Targeted delivery of α -galactosylceramide to CD8 α ⁺ dendritic cells optimizes type I NKT cell-based antitumor responses. *J. Immunol.* 193, 961–969.

Mendiratta, S.K., Martin, W.D., Hong, S., Boesteanu, A., Joyce, S., and Van Kaer, L. (1997). CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 6, 469–477.

Molling, J.W., Kölgen, W., van der Vliet, H.J.J., Boomsma, M.F., Kruijenga, H., Smorenburg, C.H., Molenkamp, B.G., Langendijk, J.A., Leemans, C.R., von Blomberg, B.M.E., et al. (2005). Peripheral blood IFN- γ -secreting V α 24⁺V β 11⁺ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int. J. Cancer* 116, 87–93.

Motohashi, S., Nagato, K., Kunii, N., Yamamoto, H., Yamasaki, K., Okita, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Suzuki, M., Yoshino, I., et al. (2009). A phase I-II study of α -galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J. Immunol.* 182, 2492–2501.

Neumann, S., Young, K., Compton, B., Anderson, R., Painter, G., and Hook, S. (2015). Synthetic TRP2 long-peptide and α -galactosylceramide formulated into cationic liposomes elicit CD8⁺ T-cell responses and prevent tumour progression. *Vaccine* 33, 5838–5844.

Palucka, K., and Banchereau, J. (2013). Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 39, 38–48.

Parekh, V.V., Lalani, S., Kim, S., Halder, R., Azuma, M., Yagita, H., Kumar, V., Wu, L., and Kaer, L.V. (2009). PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *J. Immunol.* 182, 2816–2826.

Paulis, L.E., Mandal, S., Kreutz, M., and Figdor, C.G. (2013). Dendritic cell-based nanovaccines for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 389–395.

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.

- Pooley, J.L., Heath, W.R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8⁻ dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* *166*, 5327–5330.
- Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.-L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., et al. (2010). Characterization of human DNNGR-1⁺ BDCA3⁺ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1261–1271.
- Preston, C.C., Maurer, M.J., Oberg, A.L., Visscher, D.W., Kalli, K.R., Hartmann, L.C., Goode, E.L., and Knutson, K.L. (2013). The ratios of CD8⁺ T cells to CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ and FOXP3⁻ T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer. *PLoS ONE* *8*, e80063.
- Sag, D., Krause, P., Hedrick, C.C., Kronenberg, M., and Wingender, G. (2014). IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. *Journal of Clinical Investigation* *124*, 3725–3740.
- Sancho, D., Mourão-Sá, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R., and Reis e Sousa, C. (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J. Clin. Invest.* *118*, 2098–2110.
- Schneiders, F.L., Scheper, R.J., von Blomberg, B.M.E., Woltman, A.M., Janssen, H.L.A., van den Eertwegh, A.J.M., Verheul, H.M.W., de Gruijl, T.D., and van der Vliet, H.J. (2011). Clinical experience with α -galactosylceramide (KRN7000) in patients with advanced cancer and chronic hepatitis B/C infection. *Clin. Immunol.* *140*, 130–141.
- Semmling, V., Lukacs-Kornek, V., Thaiss, C.A., Quast, T., Hochheiser, K., Panzer, U., Rossjohn, J., Perlmutter, P., Cao, J., Godfrey, D.I., et al. (2010). Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nat. Immunol.* *11*, 313–320.
- Shortman, K., and Heath, W.R. (2010). The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* *234*, 18–31.
- Silva, A.L., Soema, P.C., Slütter, B., Ossendorp, F., and Jiskoot, W. (2016). PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother* *12*, 1056–1069.
- Silva, J.M., Videira, M., Gaspar, R., Pr eat, V., and Florindo, H.F. (2013). Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines. *J Control Release* *168*, 179–199.
- Stober, D., Jomantaite, I., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (2003). NKT cells provide help for dendritic cell-dependent priming of MHC class I-restricted CD8⁺ T cells in vivo. *J. Immunol.* *170*, 2540–2548.
- Tahir, S.M., Cheng, O., Shaulov, A., Koezuka, Y., Bublely, G.J., Wilson, S.B., Balk, S.P., and Exley, M.A. (2001). Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J. Immunol.* *167*, 4046–4050.
- Tel, J., Sittig, S.P., Blom, R.A.M., Cruz, L.J., Schreibelt, G., Figdor, C.G., and de Vries, I.J.M. (2013). Targeting uptake receptors on human plasmacytoid dendritic

cells triggers antigen cross-presentation and robust type I IFN secretion. *J. Immunol.* *191*, 5005–5012.

Temizoz, B., Kuroda, E., and Ishii, K.J. (2016). Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int. Immunol.* *28*, 329–338.

Thedreuz, A., de Lalla, C., Allain, S., Zaccagnino, L., Sidobre, S., Garavaglia, C., Borsellino, G., Dellabona, P., Bonneville, M., Scotet, E., et al. (2007). CD4 engagement by CD1d potentiates activation of CD4⁺ invariant NKT cells. *Blood* *110*, 251–258.

Tullett, K.M., Lahoud, M.H., and Radford, K.J. (2014). Harnessing Human Cross-Presenting CLEC9A(+)XCR1(+) Dendritic Cells for Immunotherapy. *Front Immunol* *5*, 239.

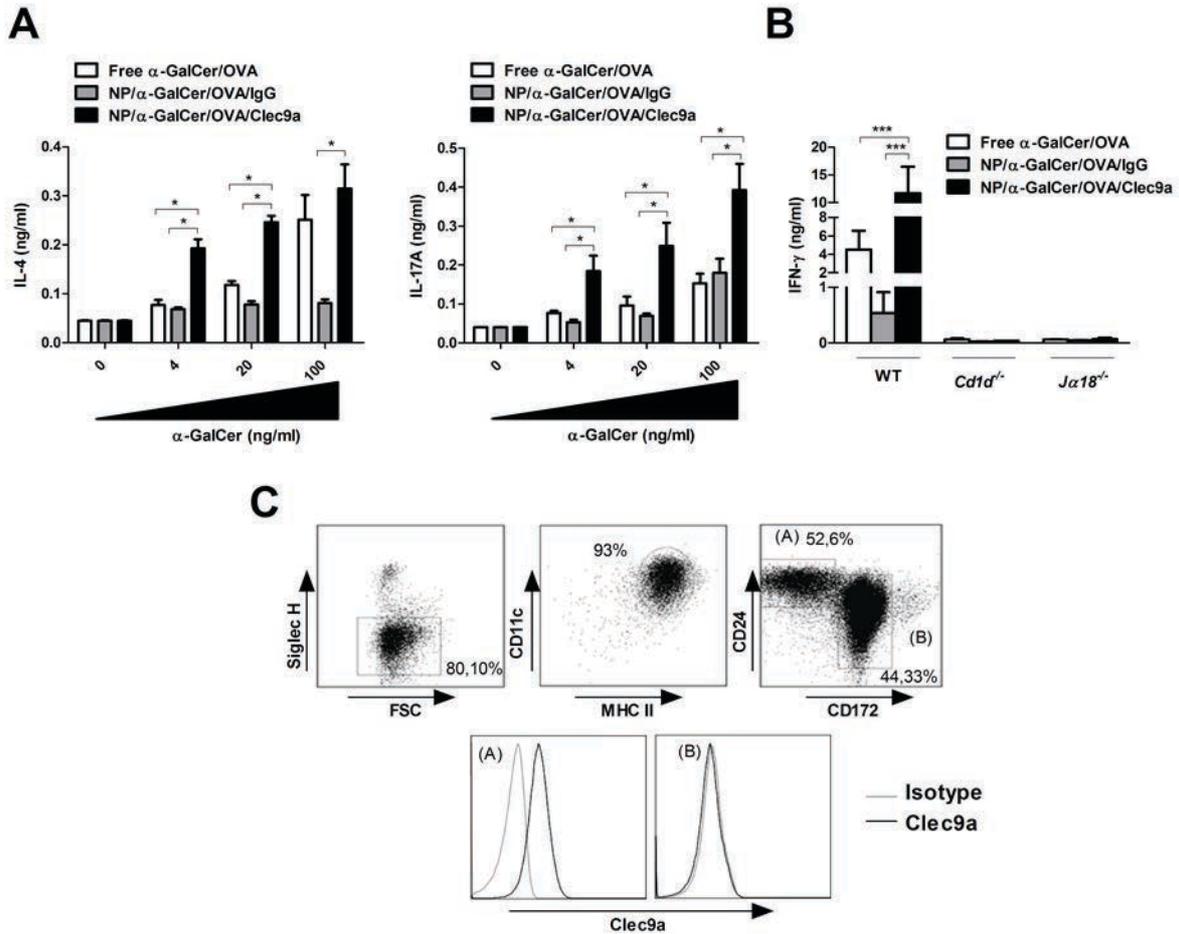
Vega-Ramos, J., and Villadangos, J.A. (2013). Consequences of direct and indirect activation of dendritic cells on antigen presentation: functional implications and clinical considerations. *Mol. Immunol.* *55*, 175–178.

Wiesel, M., and Oxenius, A. (2012). From crucial to negligible: functional CD8⁺ T-cell responses and their dependence on CD4⁺ T-cell help. *Eur. J. Immunol.* *42*, 1080–1088.

Yamada, D., Iyoda, T., Vizcardo, R., Shimizu, K., Sato, Y., Endo, T.A., Kitahara, G., Okoshi, M., Kobayashi, M., Sakurai, M., et al. (2016). Efficient Regeneration of Human V α 24(+) Invariant Natural Killer T Cells and Their Anti-Tumor Activity In Vivo. *Stem Cells* *34*, 2852–2860.

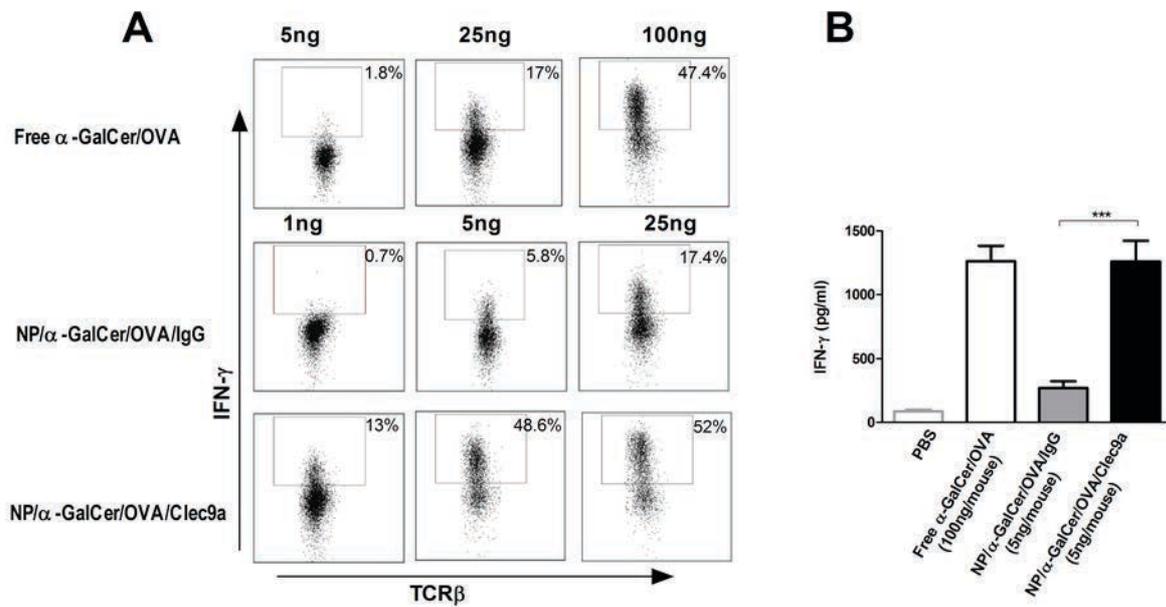
Yamasaki, K., Horiguchi, S., Kurosaki, M., Kunii, N., Nagato, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Ueno, N., Yamamoto, S., Taniguchi, M., et al. (2011). Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. *Clin. Immunol.* *138*, 255–265.

Supplementary Figure.1



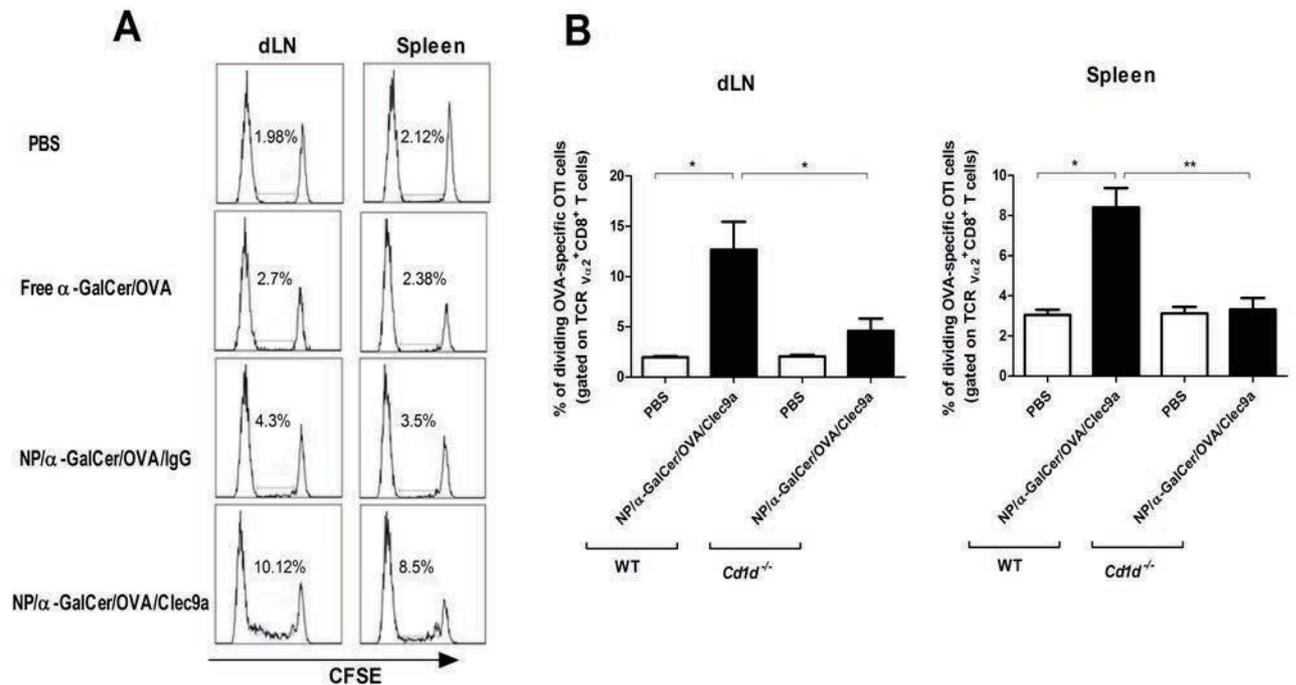
Sup Figure 1. A, Spleen cells from WT animals were exposed to grading doses of free or encapsulated α -GalCer for 48 hours afterwards IL-4 and IL-17A were quantified in the supernatant. **B**, Spleen cells from WT, $Cd1d^{-/-}$ or $Ja18^{-/-}$ were incubated with free or encapsulated α -GalCer (4ng/ml). **C**, Gating strategies for detection of BM-DCs. The Siglec H⁻ CD11c⁺ MHC class II⁺ population was gated and cells in this gate were identified as CD172^{low} CD24⁺ (CD8 α ⁺) and CD24^{low} CD172⁺ (CD11b⁺) subsets. Representative flow cytometry plots are shown. The expression of Clec9a by CD24⁺ and CD172⁺ DCs is depicted. **A-C**, Data represent a pool of three independent experiments (**A**) or are representative of one experiment out of two or three (**B** and **C**). *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ (a Kruskal–Wallis ANOVA).

Supplementary Figure.2



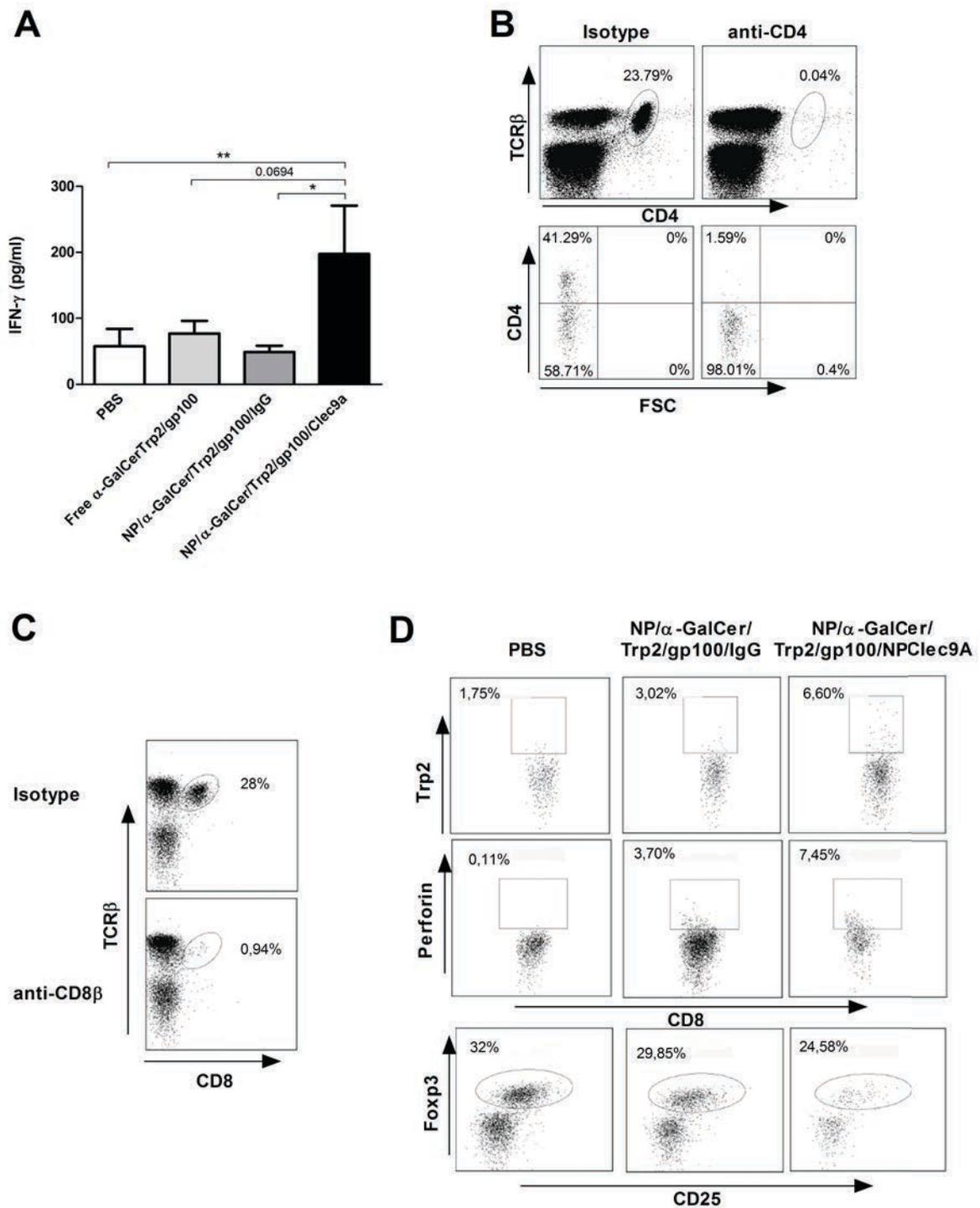
Sup Figure 2. A, The TCR- α^+ PBS57-loaded CD1d tetramer $^+$ cells were analyzed for intracellular IFN- γ 3 hours after α -GalCer (free or vectorised) inoculation. Representative dot plots are shown. **B**, Concentration of IFN- γ in the blood is shown. A representative experiment out of two is shown ($n=5$). *** $P < 0.001$ (a Kruskal–Wallis ANOVA).

Supplementary Figure.3



Sup Figure 3. A, Animals were immunized as described in the legend of Figure 2A. $V_{\alpha 2} TCR^+ CD8\alpha^+$ in popliteal LNs and spleen were analyzed by flow cytometry. Representative flow cytometry plots show gating on TCR $V_{\alpha 2}^+ CD8\alpha^+ CFSE^+$ cells. **B**, The same procedure was repeated but this time in WT or *Cd1d*^{-/-} mice. The expansion of OVA-specific $CD8^+$ T cells is compared between CD1d-competent and CD1d-deficient animals ($n=5$). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (a Kruskal–Wallis ANOVA).

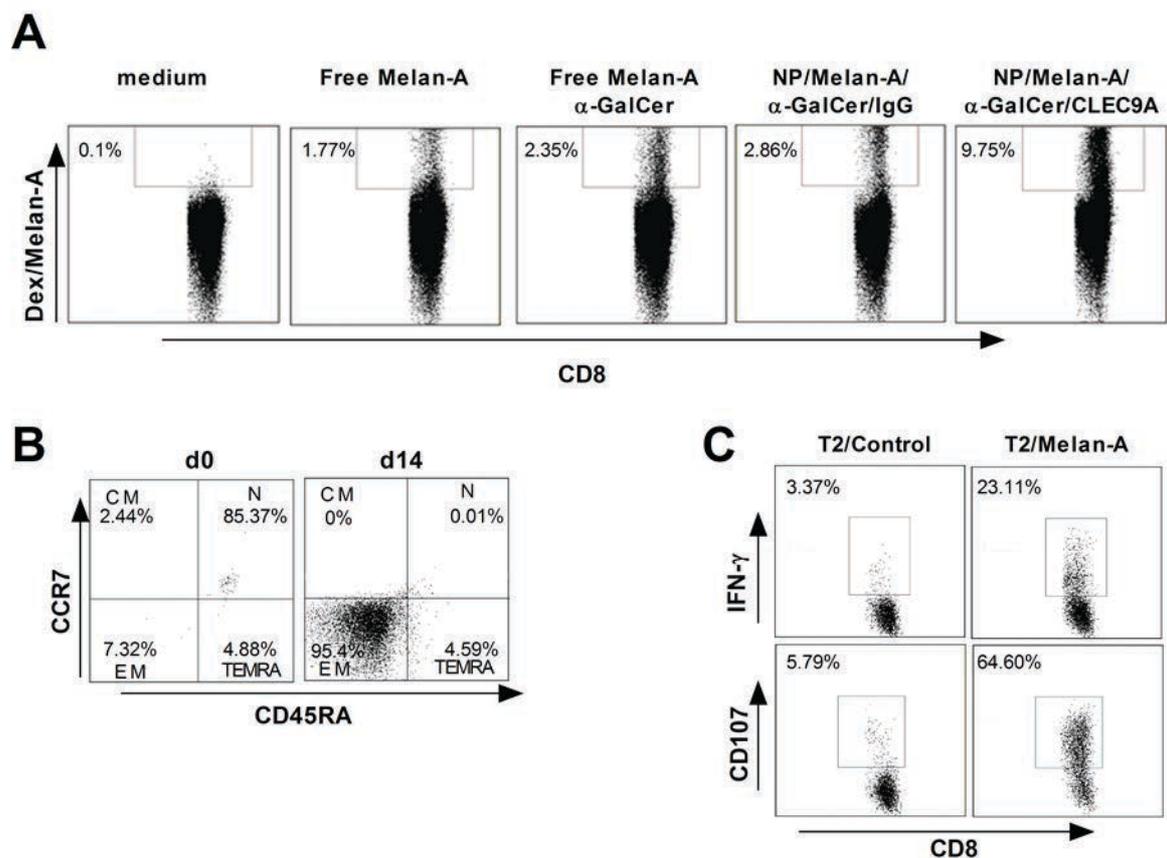
Supplementary Figure.4



Sup Figure 4. **A**, Animals were s.c immunized as described in the legend of Figure 3A. IFN- γ production by spleen cells after restimulation with peptides is depicted. Shown is a representative experiment of two performed ($n=5$). **B**, Flow cytometry profiles showing the depletion of CD4⁺ T cells (*upper panel*) and CD4⁺ NKT cells (*lower panel*) in the draining LNs two days after the inoculation of the anti-CD4 Ab. **C**,

Flow cytometry profiles showing the depletion of CD8⁺ T cells three days after the inoculation of the anti-CD8 β Ab. **D**, Flow cytometry profiles showing intra-tumoral (14 days post tumor inoculation) Trp2-specific CD8⁺ T cells, perforin-expressing CD8⁺ T cells (gated on CD3⁺ CD8⁺ cells) and Foxp3-expressing CD25⁺ (gated on CD3⁺ CD4⁺ cells) in non-vaccinated (PBS) mice and in mice injected twice (day 5 and day 12) with NP/ α -GalCer/tumor peptides/IgG or NP/ α -GalCer/tumor peptides/Clec9a.

Supplementary Figure.5



Sup Figure 5. A, The percentages of dextramer A2/Melan A₂₆₋₃₅⁺ cells within the total CD3⁺ CD8⁺ T cell population on day 14 post-priming are indicated. The magnitude of the Melan A-specific CD8⁺ T cell populations primed under different conditions is shown. **B**, CCR7 and CD45RA expression on Melan A-specific CD8⁺ T cells at day 0 and day 14 post-priming. CM, central memory; EM, effector memory, N, naïve, TEMRA, terminally differentiated effector memory. At day 0, the majority of Melan A-specific CD8⁺ T cell populations are naïve (CCR7⁺ CD45RA⁺) while at day 14 the majority express an effector memory phenotype (CCR7⁻ CD45RA⁻). **C**, IFN- γ and CD107 expression by Melan A-specific CD8⁺ T cells after restimulation with T2 cells pulsed with the Melan A peptide or with an irrelevant peptide.