



HAL
open science

Les cellules dendritiques inflammatoires humaines utilisent une voie non-cytosolique pour la présentation croisée

Tsing-Lee Tang-Huau

► **To cite this version:**

Tsing-Lee Tang-Huau. Les cellules dendritiques inflammatoires humaines utilisent une voie non-cytosolique pour la présentation croisée. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB001 . tel-02468363

HAL Id: tel-02468363

<https://theses.hal.science/tel-02468363v1>

Submitted on 5 Feb 2020

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 Paris Descartes

Ecole doctorale BioSPC ED562

Unité INSERM 932 / Equipe Immunité et Cancer

Thèse de doctorat en sciences

Discipline : IMMUNOLOGIE

Les cellules dendritiques inflammatoires humaines utilisent une voie non-cytosolique pour la présentation croisée

Par Tsing-Lee Tang-Huau

Thèse dirigée par Dr. Elodie SEGURA

Présentée et soutenue publiquement devant un jury composé de :

Dr. Jenny VALLADEAU

Dr. Jean-François FONTENEAU

Dr. Marc DALOD

Dr. Anne HOSMALIN

Prof. Régis JOSIEN

Dr. Benoit PASQUIER

Dr. Elodie SEGURA

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Examineur

Membre invité

Directrice de thèse

« Fais de ta vie un rêve, et d'un rêve une réalité »
Citation de Antoine de Saint-Exupéry ; Cahiers de Saint-Exupéry (1900-1944)

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury, Jenny Valladeau, Jean-François Fonteneau, Marc Dalod, Anne Hosmalin, Régis Josien et Benoit Pasquier pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, Elodie Segura qui m'a donné les moyens de réussir ma thèse. Je te suis très reconnaissante pour toutes les choses que tu m'as enseignées, pour tes conseils, ta patience, ton soutien et tes encouragements durant cette thèse. Merci pour tout ! Ça a été un réel plaisir de travailler avec toi.

Je tiens également à remercier mon encadrant de Sanofi, Benoit Pasquier pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir fait découvrir le monde de l'entreprise. Tu as toujours été présent et d'un grand soutien durant cette thèse. J'ai été honoré d'avoir pu travailler avec toi.

Je remercie chaleureusement Sebastian Amigorena, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Merci pour ton soutien et tes conseils tout au long de cette thèse.

Un grand merci à Coline, Sarantis, Michael, Nina, Bakhos et Nicolas du POC Office. Nous avons passé de bons moments ensemble, à discuter, à rire etc. Vous êtes de belles personnes, surtout ne changez pas.

Une spéciale dédicace à Mathilde qui est une amie formidable. Merci pour les fous rires, les soirées d'impro, les recettes de cuisine et les sorties.

À Laurence, je tiens à te remercier pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton soutien et tes conseils durant cette thèse.

Je remercie également toutes les personnes de l'Unité U932 pour les discussions, vos conseils et votre joie de vivre. Merci à tous les chefs d'équipes pour votre soutien et pour

nous pousser à donner le meilleur de nous-mêmes. Surtout à Nicolas Manel et Eliane Piaggio d'avoir accepté d'être mes référents pour mon comité de thèse et qui m'ont beaucoup appris.

Merci à toute l'équipe de Sanofi, Dorothée, Eve, Ellen, Sandrine, Charlotte, Solana, Erwan et Fanny. J'ai passé 3 belles années avec vous.

Je tiens à remercier toute ma famille, mes chers neveux et nièces ainsi que mes amis, Charlotte, Alice, Astrid et toute la bande de Melay. Vous m'avez toujours soutenue et encouragé et ce, dès le début de mes études.

Un grand merci à mon cher mari, Alexis, pour sa patience et ses encouragements tout au long de mes études et durant la thèse !

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	10
RÉSUMÉ	12
ABSTRACT	13
INTRODUCTION	14
Partie I : Les différentes voies de présentation de l'antigène.....	15
A. Présentation sur CMH de classe II.....	16
B. Présentation classique sur CMH de classe I.....	16
C. La cross-présentation	16
Partie II : La cross-présentation.....	18
A. Découverte.....	18
B. La voie cytosolique versus vacuolaire	18
C. Mécanismes intracellulaires.....	23
1. Régulation du pH et de la dégradation dans le compartiment endosomal.....	23
2. L'export des antigènes vers le cytosol	26
3. Dégradation des antigènes	32
3.1. Dans la voie cytosolique	32
3.2. Dans la voie vacuolaire.....	32
4. Chargement aux molécules du CMH de classe I.....	33
4.1. Mécanisme général de chargement aux CMH I (présentation directe).....	33
4.2. Transport des peptides pour la cross-présentation : réticulum endoplasmique versus phagosomes	35
4.3. Trafic des molécules CMH-I vers les endosomes pour la cross-présentation.....	37

D.	Régulation de la cross-présentation.....	39
1.	Régulation positive de la cross-présentation	39
2.	Régulation négative de la cross-présentation	41
Partie III : Cellules myéloïdes mononucléaires humaines.....		43
A.	Monocytes.....	43
B.	Macrophages	46
1.	Les macrophages dérivés des précurseurs embryonnaires	46
2.	Impact des facteurs environnementaux sur la différenciation des macrophages	47
3.	Les macrophages dérivés des monocytes (mo-Mac)	48
4.	Fonctions des macrophages dans la présentation d'antigène	48
C.	Les cellules dendritiques.....	49
1.	Définition des cellules dendritiques.....	49
2.	Diversité des cellules dendritiques.....	49
3.	Ontogénie	54
4.	Spécialisation fonctionnelle pour la cross-présentation	56
4.1.	Les DC conventionnelles et la cross-présentation	56
4.2.	Les pDC et la cross-présentation	58
4.3.	Les mo-DC et la cross-présentation	59
Partie IV : Les cellules dendritiques dérivées des monocytes chez l'homme .		61
A.	Définition des mo-DC	61
B.	Identification des mo-DC inflammatoires humaines	61
C.	Caractéristiques des mo-DC humaines.....	62
D.	Ontogénie des mo-DC	64
E.	Slan-DC	66
F.	Distribution des mo-DC humaines.....	66
1.	Les mo-DC dans les muqueuses	66
2.	Les mo-DC humaines et l'environnement tumoral	67
3.	Les mo-DC humaines dans le sang.....	68
4.	Propriétés fonctionnelles des mo-DC humaines.....	69

OBJECTIFS	71
RÉSULTATS	72
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	107
A. Test d'inhibition du protéasome.....	108
1. Objectifs	108
2. Méthode.....	108
3. Résultat.....	108
4. Conclusion.....	109
B. Test d'inhibition des cathepsines	110
1. Objectifs	110
2. Méthodes	110
3. Résultat.....	110
4. Conclusion.....	112
C. Capacité des mo-DC et des mo-Mac à présenter sur molécules du CMH II.	112
1. Objectif	112
2. Matériel et méthode.....	112
3. Résultat.....	113
4. Conclusion.....	115
D. Induction de Treg	115
1. Objectif	115
2. Matériel et méthode.....	115
3. Résultats.....	115
4. Conclusion.....	116
DISCUSSION.....	118
A. Les limites expérimentales.....	118
1. Variabilité des échantillons humains.....	118
2. Rareté et fragilité des APC humaines	119
B. Discussion et perspectives	119
1. La cross-présentation par la voie vacuolaire	119
2. Mécanismes moléculaires de la voie vacuolaire.....	121
3. La cross-présentation par les macrophages	122

4. Induction de la réponse T CD8 cytotoxique par les mo-DC	123
C. La cross-présentation et le cancer.....	125
D. Immunothérapie contre le cancer	128
BIBLIOGRAPHIE	131
ANNEXES	172

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATP : Adénosine triphosphate

BMDC : Bone-marrow derived DC

CMH : Complexe majeur
d'histocompatibilité

CDP : Précurseur commun des DC

CL : corps lipidique

CPA : Cellules présentatrices

CMP : Précurseur myéloïde commun

CTL : Cellules T CD8 cytotoxique
d'antigène

cDC : DC conventionnelles

DC : Cellule dendritique

ERAD : Endoplasmic-reticulum-associated
protein degradation

ERAP : Endoplasmic reticulum
aminopeptidase

Flt3 : FMS-like tyrosine kinase 3

FT : Facteur de transcription

FRET : Fluorescence resonance energy
transfer

GM-CSF : Granulocyte-macrophage
colony-stimulating factor

GILT : Gamma-Interferon-inducible
Lysosomal Thiolreductase

HSP90 : Protéine de choc thermique 90

HSC : Cellules souches hématopoïétiques

IC : Complexe immun

IFN : Interféron

IGTP : (IFN-inducible ER-resident GTPase

IL : Interleukine

LC : Cellule de Langerhans

LT : Lymphocytes T

LB : Lymphocyte B

mo-DC : DC dérivées des monocytes

mo-Mac : Macrophages dérivées des
monocytes

MPS : Cellules myéloïdes mononuclées
phagocytaires

MLP : Précurseur lymphoïde multipotent

MR : Mannose Récepteur

NOX2 : NADPH oxydase 2

OVA : Ovalbumine

pDC : DC plasmacytoïde

RA : Acide rétinoïque

RE : Réticulum endoplasmique

ROS : reactive oxygen species

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-
sensitive-factor Attachment protein
Receptor

STIM1 : Stromal interacting protein 1

TAP : Transporter associated with antigen
processing

Treg : Lymphocytes T régulateurs

Tfh : Lymphocyte T folliculaire helper

TLR : Toll Like Receptor

Th : Lymphocytes T helper ou auxiliaire

UNC93B1 : Uncoordinated 93 homolog B1

YS : Sac vitellin

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Les différentes voies de présentation antigénique

Figure 2 : la voie cytosolique pour la cross-présentation

Figure 3 : La voie vacuolaire pour la cross-présentation.

Figure 4 : NOX2 est efficacement recrutée et assemblée à la membrane phagosomale au cours de la maturation des phagosomes dans les DC.

Figure 5 : Test d'export au cytosol.

Figure 6 : Les composants de la machinerie ERAD impliqués dans la dégradation des protéines

Figure 7 : Rupture de la membrane du phagosome par ROS.

Figure 8 : Chargement des peptides antigéniques aux CMH de classe I.

Figure 9 : Recrutement des composants du RE aux phagosomes par Sec22.

Figure 10 : Ontogénie des monocytes

Figure 11 : Différenciation des monocytes CD14⁺.

Figure 12 : Ontogénie des cDC, pDC, monocytes, macrophages et mo-DC/Mac humaines

Figure 13 : La cross-présentation par les DC chez la souris et chez l'homme

Figure 14 : Morphologie des DC humaines versus les macrophages.

Figure 15 : Ontogénie des cellules dérivées des monocytes

Figure 16 : Fonctionnalité des mo-DC.

Tableau 1 : Marqueurs phénotypiques des DC murines

Tableau 2 : Marqueurs phénotypiques des DC humaines

Tableau 3: Marqueurs phénotypiques des DC classiques, mo-DC, monocytes et macrophages. (cf annexe 1)

Tableau 4 : Distribution des mo-DC dans les tissus humains

RÉSULTATS

Figure 1. Ascites DC and macrophages are distinct populations.

Figure 2 Ascites DC are monocyte-derived cells

Figure 3. Human mo-DC and mo-Mac both cross-present efficiently.

Figure 4. Human mo-DC and mo-Mac do not transfer exogenous proteins into their cytosol.

Figure 5. Human mo-DC use the vacuolar pathway for cross-presentation.

Figure 6. Human mo-DC, but not mo-Mac, are efficient inducers of effector cytotoxic CD8⁺ T cells.

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Figure S1 : Activité du protéasome en présence de lactacystine

Figure S2 : Inhibition de la dégradation de l'OVA par l'inhibiteur de cathepsines

Figure S3 : Présentation de l'anatoxine tétanique aux lymphocytes T CD4⁺ mémoires par les mo-DC et mo-Mac

Figure S4 : Expression de CD15s et Foxp3 par les lymphocytes T

Les cellules dendritiques inflammatoires humaines utilisent une voie non-cytosolique pour la présentation croisée

RÉSUMÉ

La présentation d'antigènes exogènes sur les molécules du CMH de classe I, appelée cross-présentation, est essentielle pour l'induction des réponses T CD8 cytotoxiques. La manipulation de la cross-présentation est une stratégie thérapeutique attrayante, mais une meilleure compréhension des mécanismes impliqués est essentielle. Dans les cellules dendritiques (DC) de souris, la cross-présentation se fait par la voie «cytosolique» ou «vacuolaire», en fonction de la localisation intracellulaire de la dégradation de l'antigène. Nous avons déjà montré que la DC résidentes dans les organes lymphoïdes humains présentait par la voie cytosolique. L'importance physiologique de la voie vacuolaire dans la DC humaine qui sont trouvés in vivo reste peu claire. Pour répondre à cette question, nous avons analysé la capacité de la DC dérivées de monocytes générée in vivo à cross-présenter. En utilisant le Single Cell RNA-seq, nous avons d'abord confirmé l'identification des ascites tumorales DC comme des cellules dérivées de monocytes. Nous avons trouvé que les ascites DC et les macrophages cross-présentent efficacement, mais sont incapables de transférer des protéines exogènes dans leur cytosol. De plus, l'inhibition du protéasome n'a pas affecté la cross-présentation. Ces propriétés n'étaient pas dues au microenvironnement tumoral, car les homologues in vitro des ascites DC et des macrophages présentaient les mêmes propriétés. Nous concluons que les cellules humaines dérivées de monocytes cross-présentent exclusivement par la voie vacuolaire. Enfin, nous avons trouvé que les DC dans l'ascite étaient aussi efficaces que les DC des amygdales pour l'induction des cellules T CD8 cytotoxiques effectrices, alors que les macrophages dans l'ascite étaient de mauvais stimulateurs des cellules T CD8. Ces résultats auront des implications importantes pour les stratégies thérapeutiques visant à moduler la cross-présentation.

Mots clés : Cellules dendritiques humaines, cross-présentation, mo-DC, Lymphocytes T CD8 cytotoxiques, voie vacuolaire

Human inflammatory dendritic cells use a non-cytosolic pathway for cross-presentation

ABSTRACT

The presentation of exogenous antigens on MHC class I molecules, termed cross-presentation, is essential for the induction of cytotoxic CD8⁺ T cells. In mouse, dendritic cells (DC) that arise from monocytes (mo-DC) during inflammation play a key role in cytotoxic T cell responses by cross-presenting antigens directly in peripheral tissues. Whether human naturally-occurring mo-DC can cross-present is unknown. To address this question, we have used human mo-DC directly purified from peritoneal tumor ascites. Using single-cell RNA-seq, we first confirm that ascites DC contain exclusively monocyte-derived cells. Both ascites mo-DC and macrophages cross-present efficiently, but are unable to transfer exogenous proteins into their cytosol. Inhibition of cysteine proteases, but not of proteasome, abolishes cross-presentation by mo-DC. We conclude that human monocyte-derived cells cross-present exclusively using a vacuolar pathway. Finally, we demonstrate that only ascites mo-DC, but not macrophages, efficiently induce effector cytotoxic CD8⁺ T cells. These results will have important implications for harnessing cross-presentation for therapeutic purposes.

Key words: Human dendritic cells, cross-presentation, mo-DC, cytotoxic CD8⁺ T cells, vacuolar pathway

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Partie I : Les différentes voies de présentation de l'antigène

A ce jour, trois voies principales de présentation antigénique ont été mises en évidence : présentation des molécules endogènes associées aux CMH-I, présentation aux molécules de CMH-II et la présentation croisée.

Les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) exprimés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) jouent un rôle essentiel dans la mise en place de l'immunité adaptative. Il en existe deux types : CMH de classe I (CMH-I) et CMH de classe II (CMH-II). Ces deux molécules ont une fonction similaire, celle de présenter des peptides à la surface des cellules et d'interagir soit avec les lymphocytes T (LT) $CD8^+$ pour le CMH de classe I et les LT $CD4^+$ pour le CMH de classe II.

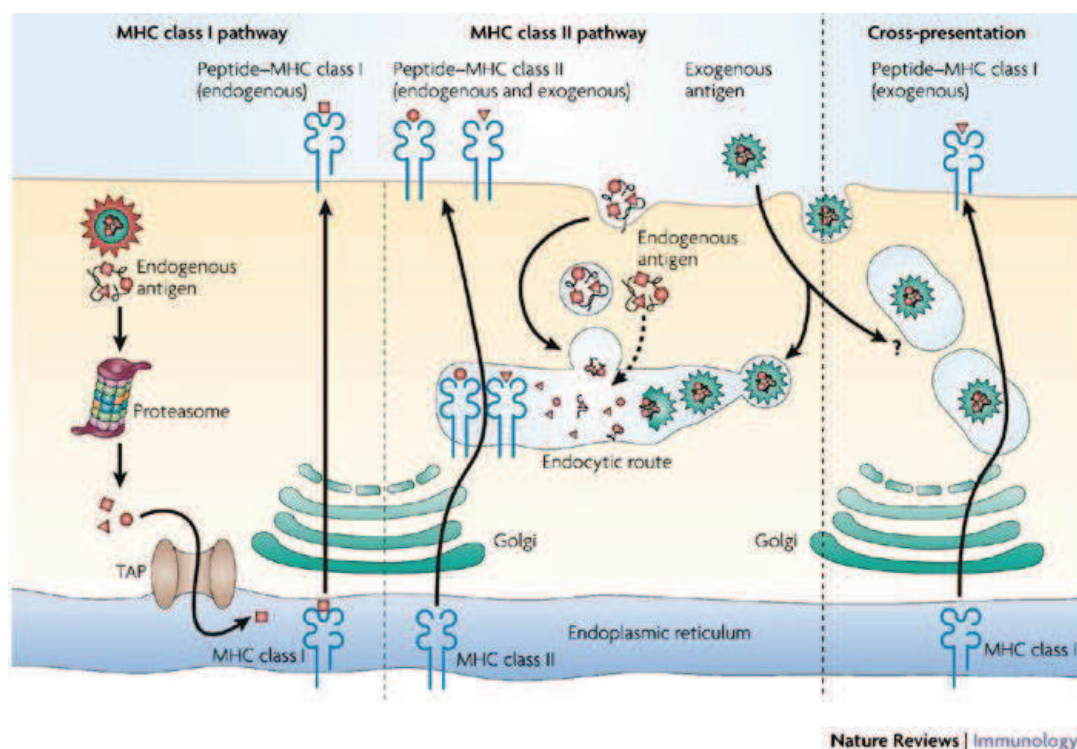


Figure 1 : Les différentes voies de présentation antigénique

(Villadangos and Schnorrer, 2007)

A. Présentation sur CMH de classe II

Les molécules du CMH-II sont exprimées par les cellules présentatrices d'antigène professionnelles. Elles présentent aussi bien des peptides issus de protéines exogènes que de protéines endogènes. Après internalisation, les antigènes sont dégradés dans le compartiment endosomal en fragments peptidiques entre 12 et 26 acides aminés puis chargés aux molécules du CMH-II. Ces complexes CMH-II/peptide sont ensuite exportés à la surface cellulaire où ils seront reconnus par les lymphocytes T CD4 naïfs et se différencier en LT CD4 auxiliaires (Th1, Th2 etc..). Les LT CD4 auxiliaires peuvent ensuite interagir avec des lymphocytes B pour induire des réponses de types humorales ou avec les LT CD8, pour une réponse cytotoxique (Chicz et al., 1993; Hunt et al., 1992; Rudensky AYu et al., 1991; Suri et al., 2006) (**Figure 1**).

B. Présentation classique sur CMH de classe I

Les molécules du CMH-I sont exprimées par toutes les cellules nucléées. Les peptides présentés sur CMH-I sont généralement des antigènes intracellulaires (ou endogènes). L'antigène endogène, dans le cytosol sera dégradé en fragment peptidique de 8-9 acides aminés (Neefjes et al., 2011) par le protéasome (Blum et al., 2013). Ces peptides générés sont ensuite transportés via le transporteur TAP (*Transporter associated with antigen processing*) dans le réticulum endoplasmique (RE) où ils subissent une dernière étape de dégradation par des aminopeptidases : ERAP1/2 (*endoplasmic reticulum aminopeptidase 1/2*)(Rock et al., 2004) pour générer des peptides qui pourront être chargés aux complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Ces complexes CMH-I/peptide nouvellement formés seront alors transportés à la surface cellulaire et présentés aux lymphocytes T CD8⁺ pour induire une réponse T cytotoxique (**Figure 1**).

C. La cross-présentation

Les peptides présentés par les molécules de classe I sont généralement issus de la dégradation des protéines endogènes, mais des peptides exogènes peuvent également être

présenté aux molécules du CMH-I, il s'agit du phénomène de présentation croisée, ou *cross-presentation* (Bevan, 2010) (**Figure 1**).

A ce jour, deux voies de présentation croisée ont été mises en évidence, il y a la voie classique (cytosolique) et la voie vacuolaire, dont nous parlerons plus en détail dans la 2nd partie.

Partie II : La cross-présentation

A. Découverte

Le phénomène de cross-présentation a été décrit pour la première fois par M. Bevan en 1976. (Bevan, 1976).

La cross-présentation est un mécanisme permettant à une cellule présentatrice d'antigène à présenter un antigène exogène aux lymphocytes T CD8 via les molécules du CMH de classe I. Les cellules responsables de ce phénomène sont principalement les cellules dendritiques (DC) dont nous parlerons plus en détails dans la 3^{ème} partie. Ces cellules vont permettre l'activation de lymphocytes T CD8 naïfs en lymphocytes T effecteurs, appelé le « cross-priming » qui est essentielle pour établir une réponse T cytotoxique (CTL) anti-infectieuse ou anti-tumorale mais aussi pour l'activation des T CD8 mémoires.

En plus de cette réponse cytotoxique, la cross-présentation est également impliqué dans la tolérance du soi.

A ce jour, deux voies de cross-présentation ont été mises en évidence : il y a la voie classique (cytosolique) et la voie vacuolaire, qui diffèrent selon le lieu de dégradation de l'antigène. Dans cette partie, je vais commencer par décrire les deux voies de cross-présentation possibles et leur différence. Ensuite je développerai les mécanismes moléculaires impliqués.

B. La voie cytosolique versus vacuolaire

La voie cytosolique est la voie principale utilisée par les cellules pour la cross-présentation. La cross-présentation par la voie cytosolique, est dépendante du protéasome et du transporteur TAP. En effet, il a été montré que la cross-présentation de l'ovalbumine (OVA) couplé à des billes, est altérée en présence d'inhibiteurs du protéasome et du transporteur TAP (Kovacs-Bankowski and Rock, 1995; Palmowski et al., 2006; Song and Harding, 1996). Le protéasome étant localisé dans le cytosol, ces résultats indiquent que les antigènes internalisés sont transférés des compartiments endocytaires au cytosol où ils seront dégradés par le protéasome (Kovacs-Bankowski and Rock, 1995; Touret et al., 2005). Les peptides générés sont ensuite transportés dans le réticulum endoplasmique (RE)

ou les endosomes/phagosomes par le transporteur TAP pour être chargés sur des molécules du CMH de classe I (**Figure 2**).

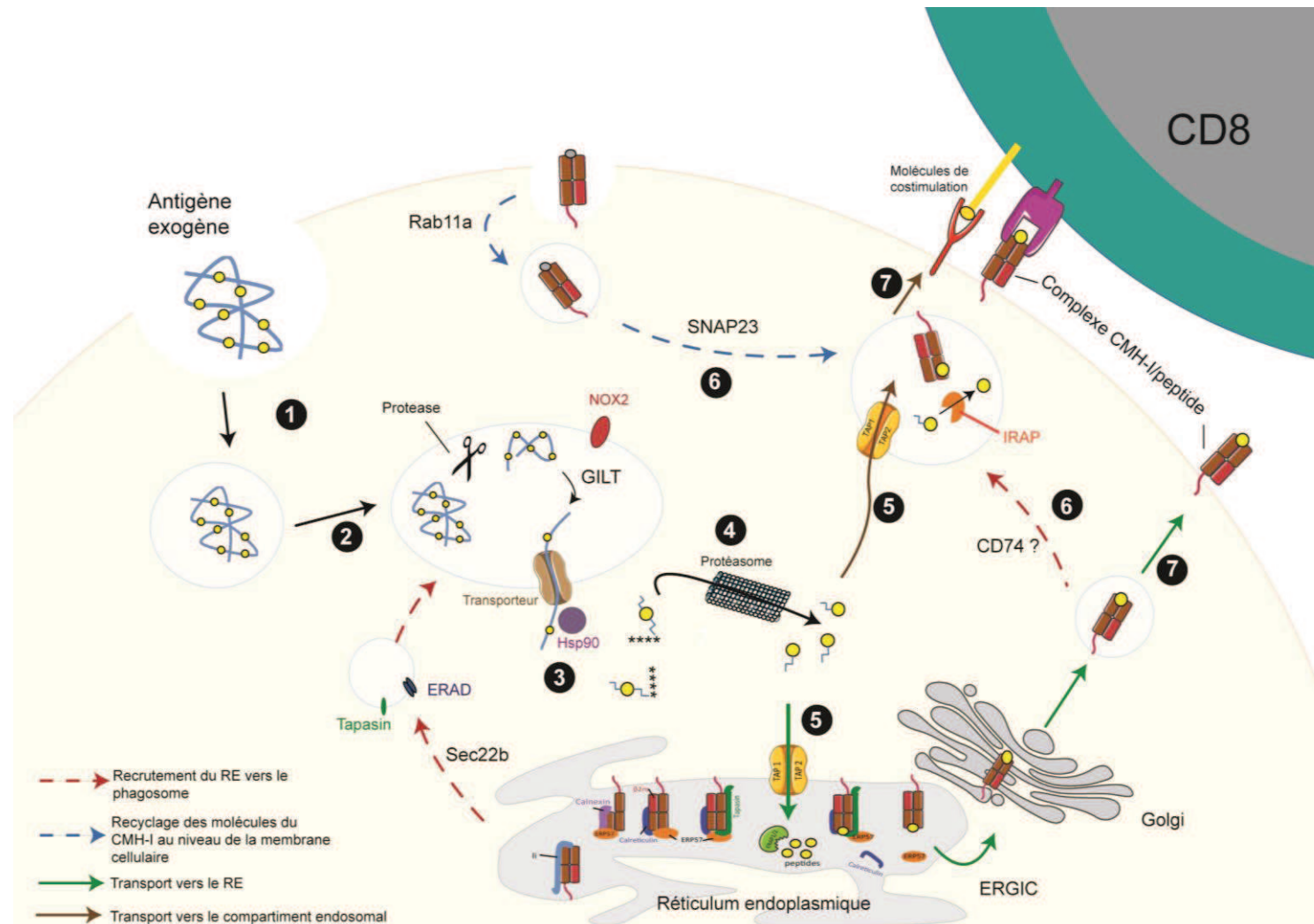


Figure 2 : la voie cytosolique pour la cross-présentation

1. Internalisation de l'antigène exogène via l'endocytose, la pinocytose ou la phagocytose. 2. Dégradation de l'antigène par les protéases phagosomales et recrutement des protéines du RE vers le phagosome via Sec22b (pointillés). 3. Export de l'antigène vers le cytosol via un transporteur ou par rupture de la membrane du phagosome. 4. Ubiquitylation des antigène et dégradation par le protéasome. 5. Les fragments peptidiques sont transportés par TAP vers le RE (ligne verte) ou dans le compartiment endocyttaire (ligne marron), où ERAP ou IRAP vont générer des peptides de taille optimale pour être chargé sur les molécules du CMH-I. 6. CMH-I provenant de la membrane plasmique via Rab11a/SNAP23 (bleu) ou du RE via CD74 (bordeaux). 7. Le complexe CMH-I/peptide est transporté à la membrane plasmique pour être présenté aux lymphocytes T CD8. Les lignes en pointillé indiquent les étapes qui ne sont pas bien connues. Abréviations : RE ou ER, réticulum endoplasmique ; ERGIC, compartiment intermédiaire ER-Golgi ; IRAP, insulin-regulated aminopeptidase ; ERAD, ER-associated degradation ; ERAP, ER aminopeptidase ; NOX2, NADPH oxidase 2 ; TAP, transporter associated with antigen processing ; GILT γ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase.

En plus de la voie cytosolique, une seconde voie de cross-présentation a été rapportée. Les travaux réalisés par *Rock et al.* et *Norbury et al.* ont montré que chez les souris TAP knock-out, les CPA sont capables de présenter les antigènes exogènes sur les molécules du CMH-I et d'activer la réponse T CD8⁺, mettant en évidence une voie alternative pour la cross-présentation (Norbury et al., 2001; Rock, 1996).

Cette voie est indépendante du protéasome et de la protéine TAP mais elle est sensible aux inhibiteurs des cystéines protéases présentes dans les compartiments endosomaux et qui ont pour rôle de dégrader les antigènes internalisés (Bertholet et al., 2006; Norbury et al., 2001; Shen et al., 2004; Song and Harding, 1996; Tiwari et al., 2007). Dans cette voie, les protéines exogènes internalisées restent dans les compartiments endocytaires où elles sont dégradées puis chargées aux CMH-I. En conséquence, cette voie est appelée « la voie vacuolaire ».

La voie de présentation par la voie vacuolaire a principalement été décrite chez les DC murines où les deux voies de présentation étaient possibles.

Les travaux menés par *Di Pucchio et al* et *Ma et al* ont montré que la voie vacuolaire existe également chez l'homme (Di Pucchio et al., 2008; Ma et al., 2016) (**Figure 3**).

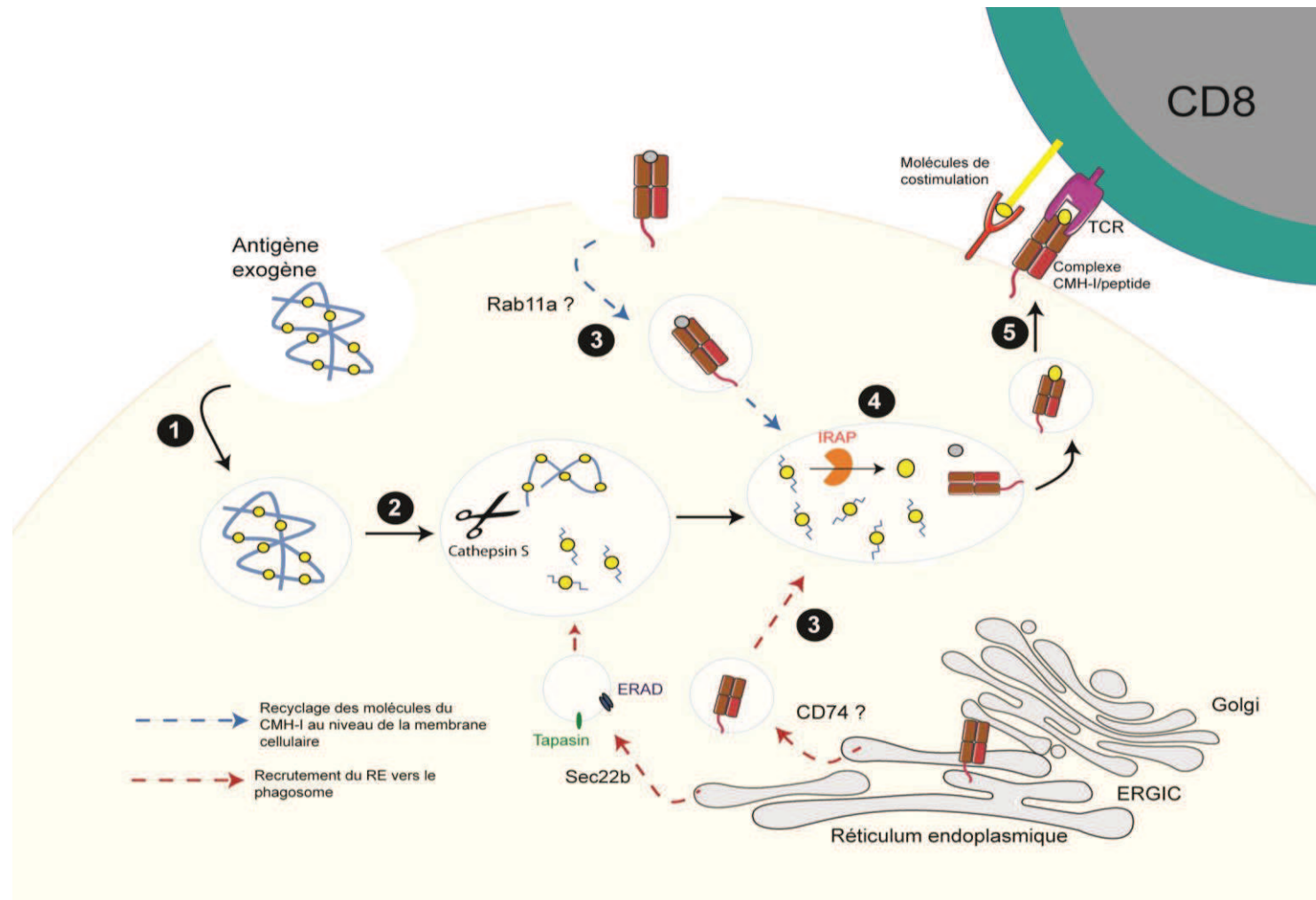


Figure 3 : La voie vacuolaire pour la cross-présentation.

1. Internalisation de l'antigène exogène via l'endocytose, la pinocytose ou la phagocytose. 2. Dégradation de l'antigène par des protéases et la cathepsine 5 dans le phagosome. Recrutement de la machinerie ERAD vers le phagosome via Sec22b. 3. Recyclage des molécules du CMH-I de la membrane plasmique via Rab11a (bleu) ou du RE via CD74 (bordeaux) vers le phagosome. 4. IRAP va générer des peptides de tailles optimales pour être chargé sur les molécules du CMH-I. Chargement du peptide aux CMH-I. 5. Le complexe CMH-I/peptide est transporté à la membrane plasmique pour être présenté aux lymphocytes T CD8. Les lignes en pointillé indiquent les étapes qui ne sont pas bien connues. Abréviations : RE, réticulum endoplasmique ; ERGIC, compartiment intermédiaire ER-Golgi ; IRAP, insulin-regulated aminopeptidase.

C. Mécanismes intracellulaires

A ce jour, les mécanismes intracellulaires impliqués dans ces deux voies de cross-présentation ne sont pas totalement élucidés.

Au cours de ces dix dernières années, plusieurs groupes ont analysés les fonctions phagosomales et endosomales à partir d'une lignée de DC murines (BMDC) ou de DC dérivées de monocytes (GMCSF/IL-4) chez l'homme, afin de comprendre les voies de transport intracellulaires et les compartiments impliqués dans la cross-présentation.

1. Régulation du pH et de la dégradation dans le compartiment endosomal

La régulation du pH dans les phagosomes et les endosomes est essentielle pour la cross-présentation et l'activation des lymphocytes T CD8⁺. En effet, une dégradation limitée des protéines internalisées dans les phagosomes est essentielle pour la cross-présentation.

La dégradation antigénique dépend de l'activité protéolytique des enzymes dans les phagosomes, et cette activation est dépendante du pH. Dans les macrophages, l'antigène est rapidement dégradé dans le compartiment phagosomal et endosomes tardifs. Cette forte activité protéolytique est due à un pH acide dans les phagosomes, qui active les protéases lysosomales et favorise la dégradation des protéines internalisées (Belizaire and Unanue, 2009; Delamarre et al., 2005; Savina et al., 2006; Yates and Russell, 2005). En revanche, les cellules dendritiques présentent une faible activité protéolytique. Cette faible activité s'explique par un faible taux de protéases lysosomales et d'un pH alcalin (environ pH 7,5) dans les endosomes (Delamarre et al., 2005).

Cette activité réduite dans les endosomes est également due à la faible activité de la pompe V-ATPase et d'un haut niveau d'activité de NADPH oxydase 2 (NOX2), qui va empêcher l'acidification dans les phagosomes par la production de ROS (*reactive oxygen species*) (**Figure 4**). La production de ROS va limiter la dégradation antigénique et favoriser la cross-présentation (Jancic et al., 2007; Savina et al., 2006; Trombetta et al., 2003).

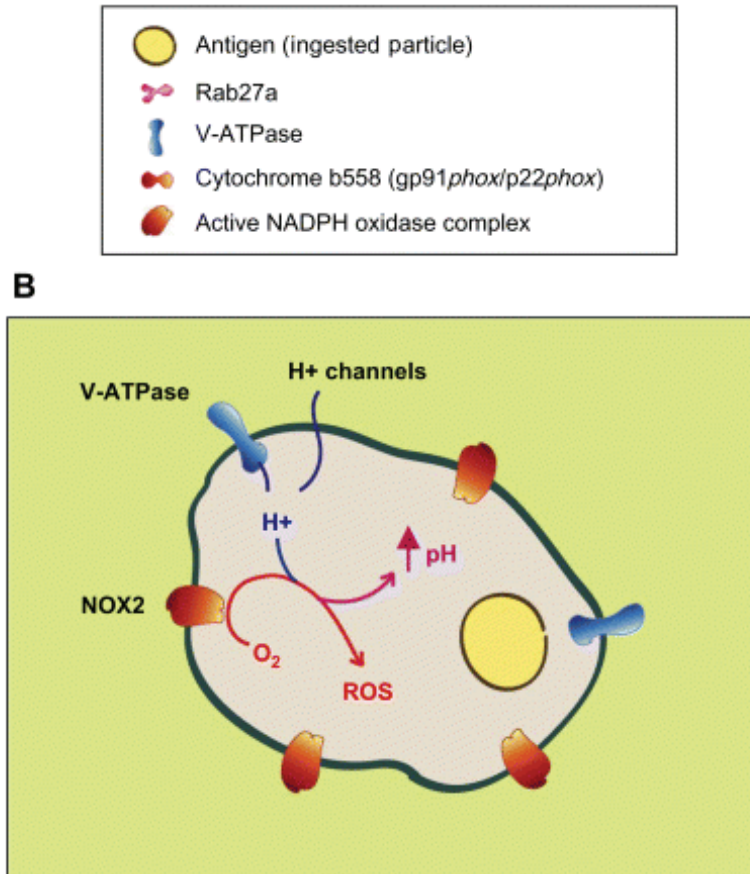


Figure 4 : NOX2 est efficacement recrutée et assemblée à la membrane phagosomale au cours de la maturation des phagosomes dans les DC.

NOX2 est recrutée au niveau de la membrane des phagosomes. Lors de l'activation, NOX2 consomme de l'oxygène (O_2) et H^+ (via la pompe V-ATPase et probablement par d'autres canaux) pour produire ROS dans la lumière du phagosome. La production de ROS va augmenter le pH dans le phagosome et limiter la dégradation de l'antigène. Adapté de (Savina and Amigorena, 2007).

Chez la souris, un déficit d'expression de Rab27a (qui permet le recrutement de NOX2 dans les phagosomes) ou de NOX2 par les DC entraîne une augmentation du pH dans les phagosomes, qui conduit à une forte dégradation des antigènes, altérant ainsi l'efficacité de la cross-présentation par ces DC (Jancic et al., 2007; Savina et al., 2006, 2009). De plus, il a été montré que la cross-présentation est altérée chez les DC dérivées des monocytes (mo-DC) provenant de patients atteints de granulomatose chronique, qui possèdent une forme mutée de la protéine NOX2 (Mantegazza et al., 2008). En accord avec ces résultats, il a été observé chez les mo-DC humaines traitées avec de la chloroquine (qui diminue le pH dans les

phagosomes) une augmentation de la quantité de protéines transférées dans le cytosol et une meilleure cross-présentation (Accapezzato et al., 2005).

D'autres protéines importantes pour la régulation du pH sont également impliquées dans la cross-présentation. Il a été observé qu'un déficit en Vav (qui est un facteur d'échange nucléotidique) dans les BMDC (*bone-marrow derived DC* chez la souris) entraîne une diminution de la production de ROS et altère la cross-présentation d'antigènes particuliers (Graham et al., 2007). Une altération de la capacité à cross présenter a également été observée chez les BMDC déficientes pour la protéine SNARE « VAMP8 » qui est essentielle pour le recrutement de NOX2 au niveau des phagosomes et pour l'oxydation phagosomale dans les BMDC (Matheoud et al., 2013). Enfin, dans les DC, le canal cationique Tmem176b régule le pH dans les phagosomes favorisant ainsi la cross-présentation (Segovia et al., 2014).

Dans les DC, STIM1 (*stromal interacting protein 1*), une protéine résidente du RE qui détecte les variations du calcium dans le RE, favorise les sites de contact entre la membrane du RE et des phagosomes (Nunes et al., 2012). Récemment, il a été démontré que UNC93B1 (*uncoordinated 93 homolog B1*), qui est une protéine résidente du RE, est recrutée au niveau des phagosomes où elle va interagir avec STIM1 et activer les canaux membranaires Ca^{2+} favorisant la cross-présentation par les DC. La déficience en UNC93B1 dans les DC entraîne une augmentation du pH dans les phagosomes en altérant le recrutement de NOX2 et la production de ROS dans les phagosomes, et diminue l'activité protéolytique et l'exportation des antigènes vers le cytosol (Maschalidi et al., 2017). Cette étude suggère que la protéine UNC93B1 via son interaction avec STIM1 joue un rôle dans la cross-présentation.

Enfin, il a été rapporté que l'enzyme GILT (*Gamma-Interferon-inducible Lysosomal Thiolreductase*), qui a pour fonction de réduire les ponts disulfures, est aussi impliquée dans la cross-présentation et dans l'induction d'une réponse T CD8⁺ antivirale (**Figure 2**). Il a été observé qu'un déficit en GILT affecte la capacité des DC à cross-présenter les glycoprotéines riches en liaison disulfure, mais pas les antigènes dépourvus de ponts disulfures (Singh and Cresswell, 2010). Ces résultats suggèrent que les protéines contenant des ponts disulfures doivent être dépliées dans les phagosomes avant le transfert vers le cytosol.

Toutes ces études mettent en évidence que la régulation de la dégradation dans les compartiments endosomaux est primordiale dans le processus de cross-présentation. En effet, une faible dégradation des protéines internalisées permet de préserver les épitopes afin de favoriser l'apprêtement des peptides aux molécules du CMH-I. Cependant, une dégradation préalable des protéines dans les phagosomes est également nécessaire pour digérer les ponts disulfures et générer des fragments de petites tailles, qui puissent être transférés dans le cytosol (Rodriguez et al., 1999; Singh and Cresswell, 2010).

2. L'export des antigènes vers le cytosol

L'export des protéines au cytosol par les cellules dendritiques a été confirmé par microscopie électronique et par imagerie à fluorescence. En effet, les protéines exogènes couplées à un fluorochrome se retrouvent dans le cytosol cellulaire (Rodriguez et al., 1999; Touret et al., 2005). Des travaux ont mis en évidence que les cellules dendritiques sont plus efficaces que les macrophages dans l'export d'antigène vers le cytosol et que les molécules de petites tailles sont exportées plus efficacement que celles plus grandes (Rodriguez et al., 1999).

Durant ces dix dernières années, de nouvelles techniques ont été développées pour mettre en évidence l'export des protéines du compartiment endosomal vers le cytosol. Une première méthode est basée sur le *cytochrome c* comme indicateur de l'export de l'antigène vers le cytosol. Le *cytochrome c* est impliqué dans l'apoptose. Après internalisation du *cytochrome c* par les DC, le *cytochrome c* exporté dans le cytosol active la cascade de signalisation des caspases et induit l'apoptose dans les cellules (Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995; Lin et al., 2008; Schreibelt et al., 2012). Une autre approche est basée sur une sonde cytosolique fluorescente et sensible au FRET (*fluorescence resonance energy transfer* sonde CCF4), clivable par l'enzyme β -lactamase. Si les cellules ont la capacité d'exporter l'enzyme β -lactamase (protéine exogène) vers le cytosol, le β -lactamase clivera la sonde fluorescente entraînant une augmentation de la fluorescence de la sonde qui pourra être quantifiée et mesurée par cytométrie en flux (Cebrian et al., 2011; Segura et al., 2013a; Vivar et al., 2016) (**Figure 5**).

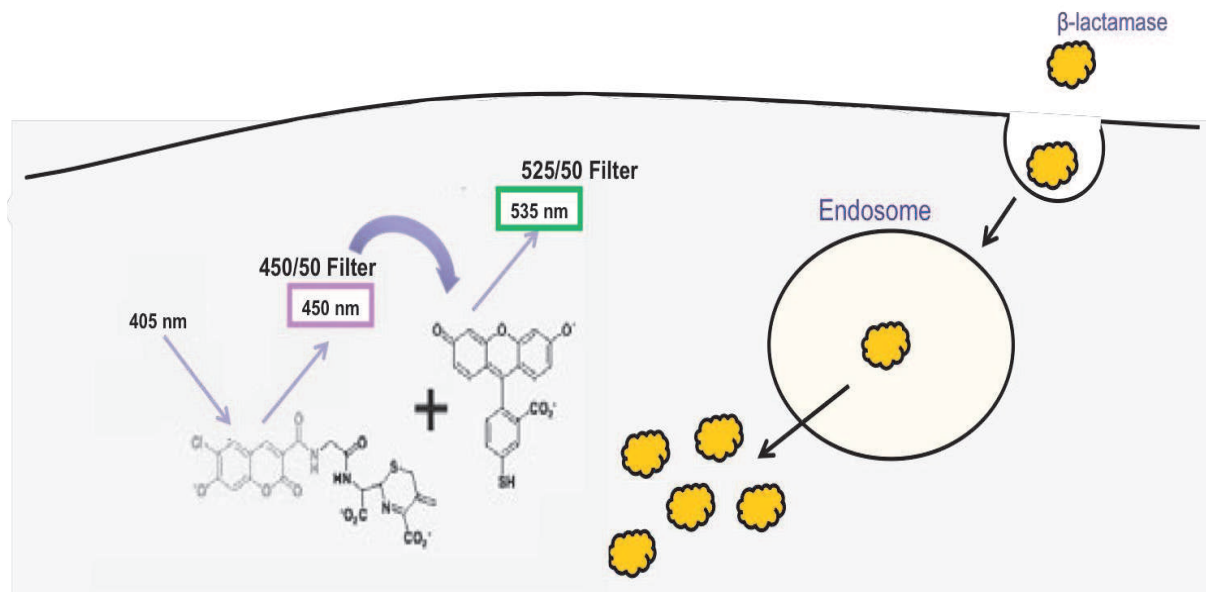


Figure 5 : Test d'export au cytosol. Les cellules sont incubées avec une sonde cytosolique fluorescente et sensible au FRET. Une fois internalisée, la β -lactamase qui est transféré dans le cytosol et clive la sonde fluorescente qui changera de fluorescence 450nm vers 535 nm.

Cependant, les mécanismes moléculaires qui permettent le transfert des protéines vers le cytosol restent mal compris. Il a été proposé, sur la base d'expériences utilisant une lignée cellulaire de DC, que la machinerie ERAD (*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) puisse être impliquée dans la translocation des protéines dans le cytosol (Ackerman et al., 2006; Grotzke and Cresswell, 2015). La machinerie ERAD désigne une voie cellulaire qui cible les protéines mal repliées du réticulum endoplasmique pour l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome. Un autre mécanisme possible est que les protéines puissent se retrouver dans le cytosol, par diffusion passive, suite à une rupture des membranes du phagosome.

Présence de protéines du RE dans les compartiments endocytiques

La présence de protéines résidentes du RE dans les phagosomes a été montrée pour la première fois chez les *Dictyostelium discoideum* et chez les macrophages (Gagnon et al., 2002; Müller-Taubenberger et al., 2001). Grâce à des analyses par microscopie, différents groupes ont mis en évidence la présence de certaines protéines du RE dans les phagosomes telles que Sec22b (Alloatti et al., 2017; Cebrian et al., 2011; Wu et al., 2017), Sec61 (Ackerman et al., 2003, 2006; Grotzke et al., 2017) et HSP90 (Giodini and Cresswell,

2008) indiquant que des protéines du RE sont recrutées au niveau de phagosomes (Houde et al., 2003; Touret et al., 2005).

Une autre étude a montré que, après internalisation de l'antigène, le récepteur aux mannoses (MR/CD206) est ubiquitinylé permettant le recrutement de divers composants du réticulum endoplasmique dans les compartiments endosomaux (Zehner et al., 2011). Un déficit en MR dans les DC n'affecte pas la capacité des DC à capturer l'ovalbumine, mais diminue la présentation antigénique aux lymphocytes T CD8⁺ (Burgdorf et al., 2006, 2007). Cependant, l'implication de MR dans la cross-présentation ne s'applique pas à toutes les sous-populations de DC, car les DC présentes dans les organes lymphoïdes n'expriment pas MR mais sont tout de même efficaces pour effectuer la cross-présentation (Segura et al., 2009).

Implication de la machinerie ERAD

Il a été observé que la translocation des protéines exogènes et la cross-présentation sont inhibées par l'Exotoxine A (issue de *Pseudomonas aeruginosa*), un supposé inhibiteur des composants du réticulum endoplasmique tel que la protéine Sec61 et l'enzyme p97 (ATPase p97) qui font partie de la machinerie ERAD (Ackerman et al., 2003, 2006; Zehner et al., 2011). Cependant, l'Exotoxine A n'est pas un inhibiteur spécifique de Sec61 et peut avoir des effets toxiques, en particulier en inhibant la synthèse des protéines (Yates et al., 2006). L'utilisation de siRNA spécifiques des composants de la machinerie ERAD dans les mo-DC humains a montré que l'enzyme p97, mais pas Sec61 ni Derlin-1, est impliquée dans la cross-présentation par la voie cytosolique (Ménager et al., 2014). Récemment, une étude montre que l'inhibition de la protéine Sec61 par la myolactone (inhibiteur spécifique de Sec61) n'affecte pas la capacité des DC à exporter dans le cytosol, mais inhibe la cross-présentation par les DC. Des analyses protéomiques ont montré que l'expression des molécules de classe I et la β 2 microglobuline étaient sensibles au traitement par la myolactone. Ces résultats suggèrent que Sec61 a un rôle indirect dans la cross-présentation dans les DC (Grotzke et al., 2017) (**Figure 6**).

soutiennent l'idée que des protéines du RE sont impliquées dans le transfert de protéines vers le cytosol, comme que la protéine Sec22b, une protéine SNARE . Dans les DC déficientes pour Sec22b, le transport de protéines du RE aux phagosomes est altéré et le transfert de β -lactamase au cytosol est aussi diminué (Cebrian et al., 2011) (**Figure 2**).

Rupture des membranes des phagosomes/endosomes

D'autres études suggèrent que l'antigène pourrait être transféré dans le cytosol lorsque la membrane du phagosome est fragilisée. Cependant, les mécanismes responsables de la déstabilisation phagosomale ne sont pas encore bien compris.

Il a été montré que l'internalisation de certaines particules, telles que des cristaux de silice et de sels d'aluminium, fragilise la membrane des phagosomes libérant ainsi les particules dans le cytosol (Hornung et al., 2008). De plus, le transfert vers le cytosol est difficile à attribuer à la machinerie ERAD pour les molécules telles que le *cytochrome c* et la β -lactamase dont l'activité est intacte dans le cytosol. En effet, les protéines qui sont transportées à travers les canaux protéiques doivent être dénaturées, ce qui pourrait inactiver leur activité enzymatique (Giodini and Cresswell, 2008).

Une déstabilisation de la membrane a été observée lors d'une forte production de ROS (générée par NOX2) dans les DC, provoquant une peroxydation lipidique (Girotti, 1998), une réaction en chaîne perturbant la membrane des phagosomes, ce qui à son tour entraîne une fuite d'antigène vers le cytosol (Cwiklik and Jungwirth, 2010; Leibowitz and Johnson, 1971; Wong-Ekkabut et al., 2007) (**Figure 7**). La molécule ROS produite par NOX2 est impliquée dans la régulation du pH dans les compartiments phagosomiaux (cf partie régulation du pH), et une inhibition de la production de ROS dans les cellules dendritiques empêche la fuite de l'antigène de l'endosome vers le cytosol mais altère aussi la cross-présentation. Les observations sont les mêmes lorsque les DC sont traitées avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui entraîne une rupture de la membrane des endosomes et conduit à un relargage de lysozymes dans le cytosol (Dingjan et al., 2016).

Chez la souris et chez l'homme, un déficit en NOX2 entraîne une diminution de l'export de l'antigène vers le cytosol et altère la capacité des DC à cross-présenter. Chez les patients atteints de granulomatose chronique, un dysfonctionnement de NOX2 entraîne non

seulement une augmentation du pH comme décrit précédemment mais induit également le relargage des antigènes pour la cross-présentation par oxydation directe des lipides endosomaux (Dingjan et al., 2016). Ceci constitue une nouvelle fonction cellulaire pour les molécules ROS dans la régulation des réponses immunitaires contre les pathogènes et le cancer (Dingjan et al., 2016). La rupture des membranes du phagosome peut être un moyen efficace d'introduire l'antigène dans la voie du CMH de classe I.

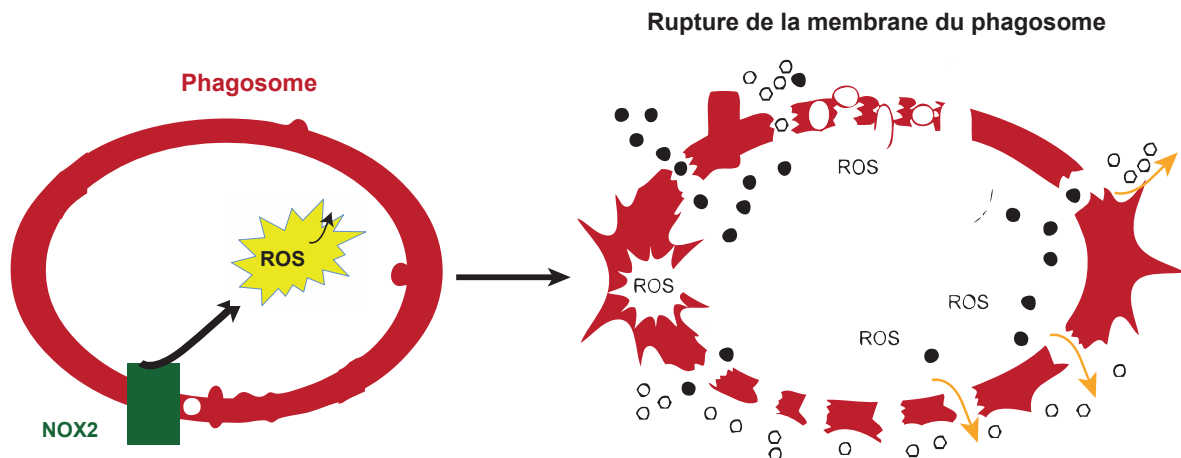


Figure 7 : Rupture de la membrane du phagosome par ROS. Une forte production de ROS par NOX2 provoque la peroxydation des lipides de la membrane phagosomal et la fuite des antigènes ou composants du phagosome vers le cytosol.

Enfin, il a été montré que l'enzyme IGTP (*IFN-inducible ER-resident GTPase*) pourrait être impliquée dans la cross-présentation (Bougnères et al., 2009). IGTP est présente dans les corps lipidiques (ou *lipid body, LB*), et le RE. Elle a pour rôle de réguler l'accumulation des LB dans les DC. Il a été observé qu'un déficit ou une inhibition de IGTP diminue la formation de LB dans les DC et altère leur capacité à cross-présenter. De plus, la fonction des DC à cross-présenter est rétablie lorsque le gène qui code IGTP est réintroduit dans les DC. Ces résultats suggèrent que les corps lipidiques ont un rôle dans la cross-présentation. Cependant, rien n'indique que IGTP favorise la cross-présentation à travers une déstabilisation directe des membranes phagosomales permettant la délivrance d'antigène au cytosol. Dès lors, le rôle des corps lipidiques dans la cross-présentation reste encore à élucider.

3. Dégradation des antigènes

3.1. Dans la voie cytosolique

Dans la voie cytosolique, les protéines transférées dans le cytosol sont dégradées par le protéasome avant d'être transloquées vers le RE ou les endosomes/phagosomes (Fonteneau et al., 2003; Guermonprez et al., 2003).

Le protéasome (ou protéasome 26S) est une protéase multicatalytique qui a une structure cylindrique assemblée par de multiples protéines (da Fonseca et al., 2012). Elle est constituée d'au moins 45 chaînes polypeptidiques, qui dégrade les protéines par un mécanisme nécessitant l'hydrolyse d'ATP (Ciechanover et al., 2012). Elles génèrent des fragments d'une longueur de 4 à 15 résidus qui pourront se fixer dans le sillon peptidique des molécules de CMH-I. (Rock et al., 1994) (**Figure 2**).

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence le rôle du protéasome dans la cross-présentation. En effet, la cross-présentation des DC murines ou humaines est inhibée après traitement avec des inhibiteurs du protéasome tels que la lactacystine ou MG132 (Kovacsovic-Bankowski and Rock, 1995; Kubiczko et al., 2014; Shen et al., 1997) confirmant que le protéasome est nécessaire pour générer les peptides pour la cross-présentation par la voie cytosolique.

3.2. Dans la voie vacuolaire

La cathepsine S a été identifiée comme étant la protéase impliquée dans la cross-présentation (Shen et al., 2004). Elle est sensible aux inhibiteurs de protéases (leupeptine ou la chloroquine) (Chapman et al., 1997; Villadangos et al., 1999). Il a été montré qu'un déficit en cathepsine S dans les macrophages et les DC inhibe la capacité des CPA à présenter l'ovalbumine aux lymphocytes T CD8⁺. En revanche, l'absence des cathepsines B, L ou D n'affecte pas la capacité des CPA à présenter l'antigène que ce soit par la voie cytosolique ou vacuolaire (Chen and Jondal, 2008; Shen et al., 2004).

Cependant, le rôle de la cathepsine S dans la génération de peptides pour être apprêtés aux CMH-I n'est pas très bien compris. L'hypothèse est que la cathepsine S est probablement la seule protéase active dans un environnement à pH alcalin (Chapman et al., 1997; Shi et al.,

1992) alors que les autres cathepsines requièrent un pH acide pour être actives (Villadangos et al., 1999) (**Figure 3**).

Il a été proposé que le choix de la voie cytosolique par rapport à la voie vacuolaire pour la cross-présentation soit dicté par la forme de l'antigène. En effet, il a été démontré chez la souris, que les BMDC cross-présentent les antigènes dérivés de *Toxoplasma gondii* par la voie cytosolique et les antigènes dérivés de la *Leishmania* par la voie vacuolaire (Bertholet et al., 2006). De plus, il a été rapporté que la cross-présentation d'un antigène modèle (dipalmitoylated) par les BMDC est indépendante de TAP. En revanche, la forme non conjuguée de l'antigène modèle est cross-présentée par la voie cytosolique (Shen et al., 2014). En accord avec cela, il a été montré que les pDC humaines cross-présentent les antigènes solubles et associés aux cellules par la voie cytosolique (Hoeffel et al., 2007; Segura et al., 2013a) mais utilisent la voie vacuolaire pour cross-présenter des antigènes viraux (Di Pucchio et al., 2008). De plus, les cDC1 humaines cross-présentent les antigènes solubles en utilisant la voie cytosolique (Chiang et al., 2016; Jongbloed et al., 2010; Segura et al., 2013a) mais la cross-présentation des complexes immuns est inhibée à la fois par les inhibiteurs du protéasome et des protéases lysosomales (Flinsenberg et al., 2012).

Cependant, les mécanismes qui dictent le choix de la voie de cross-présentation restent mal compris.

4. Chargement aux molécules du CMH de classe I

4.1. Mécanisme général de chargement aux CMH I (présentation directe)

La translocation des peptides antigéniques vers le RE est prise en charge par le transporteur TAP associé à un transporteur ATP dépendant (Cresswell et al., 1999). Une fois l'antigène transporté dans le réticulum endoplasmique, les peptides peuvent subir une ultime étape protéolytique par des aminopeptidases ERAP1/2 (*endoplasmic reticulum aminopeptidase 1/2*) (Rock et al., 2004) afin d'obtenir des peptides d'une longueur optimale (entre 8-9 acides aminés) pour se fixer dans le sillon peptidique des molécules CMH-I (Hammer et al., 2006; Saveanu et al., 2005; York et al., 2002).

La formation d'un complexe entre un peptide et une molécule CMH-I implique l'action de quatre protéines chaperonnes différentes dont les lectines (calnexine, calréticuline),

l'enzyme ERp57 et la tapasine. Le complexe de chaînes lourdes et légères des molécules du CMH sont ancrés aux pompes TAP par une interaction non covalente avec la protéine chaperonne, tapasine. L'association des chaînes lourdes HLA avec le β_2 -microglobuline (β_2m) est accompagnée par le remplacement de la calnexine par la calréticuline, et l'enzyme ERp57, qui est une oxydoréductase qui forme des ponts disulfures avec la tapasine (Ackerman et al., 2003; Cresswell et al., 1999). La tapasine est une protéine transmembranaire, elle interagit ensuite avec la protéine TAP et permet l'association des fragments peptidiques aux molécules du CMH-I (Figure 8).

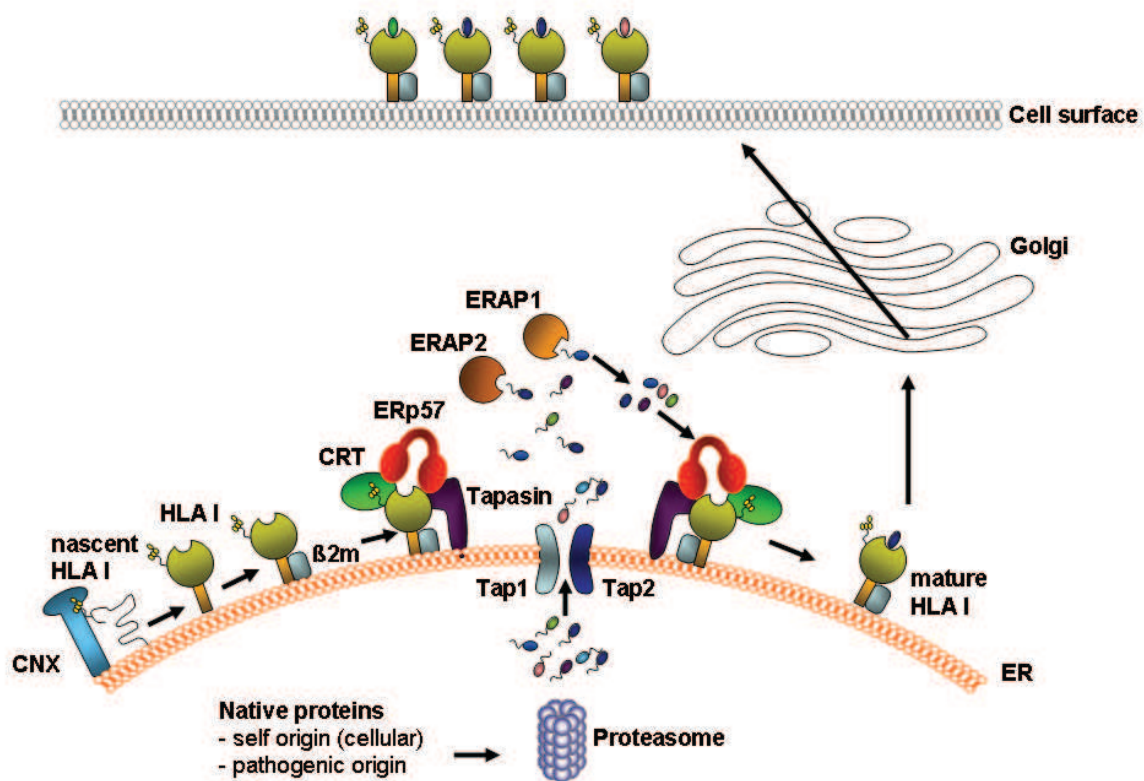


Figure 8 : Chargement des peptides antigéniques aux CMH de classe I. Les peptides sont transloqués dans le RE via les transporteurs TAP. Dans le RE, les peptides sont à nouveau dégradés par des aminopeptidases, ERAP1 et ERAP2 et sont chargés sur les molécules du CMH de classe I avec l'aide du complexe de chargement peptidique (Tapasine, ERp57, β_2m , la calnexine et la calréticuline). Abréviations : CNX, Calnexine ; CRT, (Calréticuline) ; β_2m , β_2 -microglobuline). Adapté de (Badrinath et al., 2014).

4.2. Transport des peptides pour la cross-présentation : réticulum endoplasmique versus phagosomes

Les peptides générés dans le cytosol sont transportés vers le RE grâce au transporteur TAP. Par la suite, toutes les étapes subséquentes sont essentiellement les mêmes que celles pour la présentation aux CMH-I des antigènes endogènes.

Cependant, certains phagosomes contiennent aussi le transporteur TAP (Houde et al., 2003) ce qui suggère que certains antigènes, après dégradation dans le cytosol, puissent retourner dans les phagosomes. Il a également été démontré que cela peut se produire dans des phagosomes isolés (Ackerman et al., 2003). Cependant, il n'est pas exclu que l'importation des peptides dans les phagosomes puisse être indépendante de TAP (Lawand et al., 2016) (**Figure 2**).

De nombreuses études ont démontré que la bréfeldine A, un inhibiteur du trafic de protéines du RE à l'appareil de Golgi, affecte la capacité des DC à cross-présenter (Fonteneau et al., 2003; Haan et al., 2000; Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995; Norbury et al., 1997), indiquant que le chargement des peptides s'opère dans le RE pour la cross-présentation.

Généralement, les peptides transportés par TAP vers le RE présentent souvent une séquence d'acides aminés plus longue que celle optimale pour le chargement du CMH de classe I (Cascio et al., 2001). Dans ce cas, les peptides subissent une ultime étape protéolytique par les aminopeptidases ERAP1/2 afin d'obtenir des peptides d'une longueur optimale pour se fixer dans le sillon peptidique des molécules CMH-I (Hammer et al., 2006; Rock et al., 2010; Saveanu et al., 2005; Serwold et al., 2002; York et al., 2002). Des études montrent chez les souris déficientes en ERAP une altération de la cross-présentation par les DC (Firat et al., 2007; Yan et al., 2006), ce qui suggère que le chargement des peptides aux CMH-I est réalisé dans le RE (**Figure 2**).

Il a été proposé qu'un membre de la famille des aminopeptidases « IRAP » (*insulin-regulated aminopeptidase*) puisse être impliquée dans la cross-présentation. Contrairement à ERAP, IRAP est localisée dans des compartiments endosomaux. Il a été observé qu'une délétion ou une inhibition de IRAP altère la cross-présentation des antigènes solubles et particuliers par les DC (Saveanu et al., 2009, 2013; Weimershaus et al., 2012), ce qui suggère que le chargement des peptides aux molécules du CMH-I a lieu dans les phagosomes. D'autres

résultats soutiennent ce concept. En effet, il a été montré que le complexe CMH-I/peptide (OVA) est présent dans le compartiment phagosomal (Ackerman et al., 2006; Basha et al., 2008; Burgdorf et al., 2008; Guermonprez et al., 2003).

De plus, dans les BMDC et les mo-DC humaines, la machinerie de glycosylation du RE est recrutée dans les phagosomes, ce qui est mis en évidence par la N-glycosylation de peptides internalisés (Ackerman et al., 2006; Cebrian et al., 2011).

Il a également été montré que la maturation des phagosomes est retardée chez les BMDC et les souris déficientes en IGTP (impliquée dans la formation des corps lipidiques), entraînant une diminution de la capacité des DC *in vitro* et *in vivo* à cross-présenter des antigènes particuliers (Bougnères et al., 2009).

Enfin, la protéine SNARE Sec22b joue un rôle dans la cross-présentation. Cette protéine est présente dans le compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique-Golgi (ERGIC) et est impliqué dans les interactions RE-phagosome en se liant avec la syntaxine 4 (Cebrian et al., 2011). Un déficit d'expression de Sec22b par les cellules dendritiques entraîne une dégradation rapide des antigènes dans le compartiment endosomal, conduisant à une inhibition de l'export de l'antigène au cytosol et de l'efficacité à cross-présenter. Récemment, il a été démontré, *in vivo*, qu'un déficit en Sec22b par les cellules dendritiques entraîne une diminution de la capacité des DC à cross-présenter et à induire une réponse T CD8⁺ cytotoxique contre les cellules nécrotiques et des tumeurs (Alloatti et al., 2017). Cependant le rôle de Sec22b dans la cross-présentation reste controversé, car une autre étude récente a montré que l'inhibition de Sec22b dans les DC spléniques et les BMDC n'affecte pas leur capacité à cross-présenter des antigènes solubles et particuliers (Wu et al., 2017).

En résumé, la protéine Sec22b, en plus de son rôle dans l'export des antigènes exogènes au cytosol, est probablement impliquée dans le transport des protéines du RE vers les phagosomes. Néanmoins, le rôle de la protéine Sec22b dans la cross-présentation reste à être confirmé (**Figure 9**).

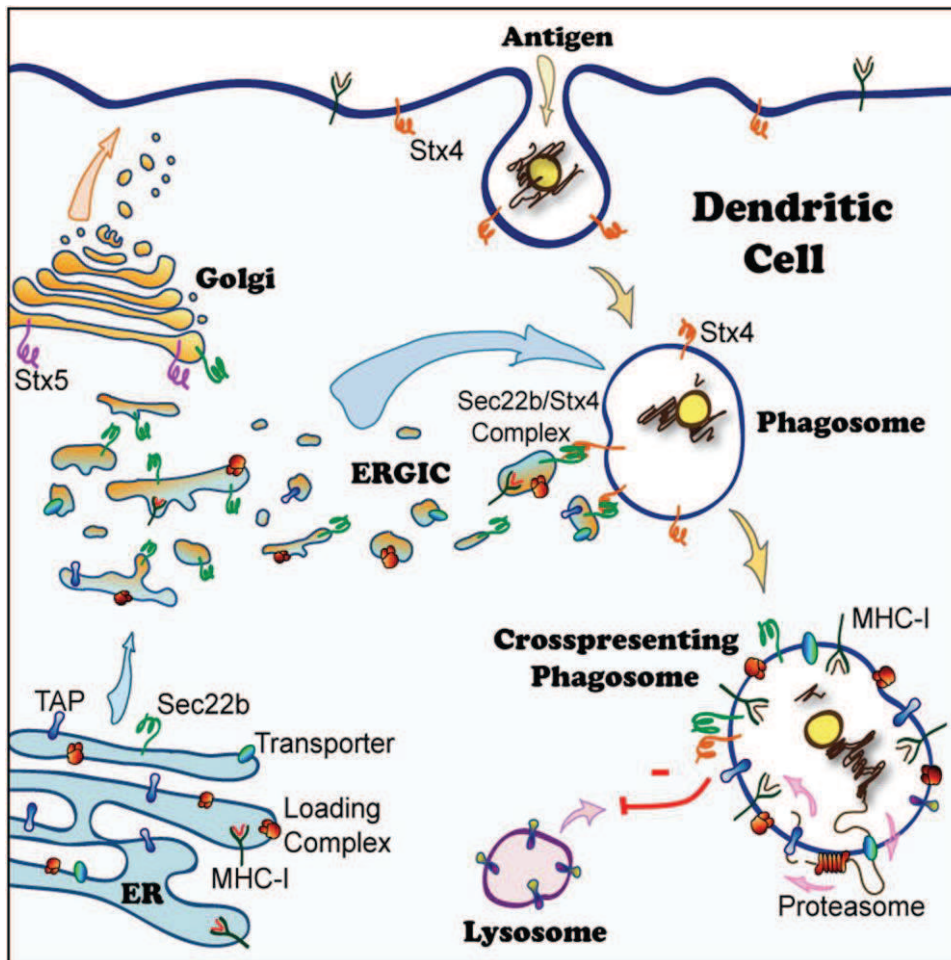


Figure 9 : Recrutement des composants du RE aux phagosomes par Sec22. La protéine SNARE Sec22b est impliquée dans les interactions RE-phagosome en se liant avec la syntaxine 4. Adapté de (Cebrian et al., 2011).

4.3. Trafic des molécules CMH-I vers les endosomes pour la cross-présentation

Pour générer des complexes peptide-CMH de classe I dans le compartiment endocytaire, les molécules du CMH-I doivent être dans le phagosome et / ou les endosomes. L'un des moyens par lesquels les molécules du CMH-I peuvent être recrutées dans les endosomes et les phagosomes est le recyclage à partir de la surface cellulaire (Basha et al., 2008; Lizée et al., 2003; Ramachandra et al., 1998).

La cross-présentation par la voie cytosolique est inhibée lorsque les DC sont traitées avec de la primaquine, un inhibiteur du recyclage des CMH-I dans les endosomes (Burgdorf et al.,

2008), ce qui suggère que le recyclage des molécules CMH-I depuis la surface cellulaire est important pour la cross-présentation. Dans les pDC humaines, la présence des molécules de CMH-I dans les phagosomes a été confirmée par microscopie. Dans cette étude, la cross-présentation des antigènes viraux par les pDC est altérée après traitement à la primaquine (Di Pucchio et al., 2008).

D'autres molécules impliquées dans le recyclage des molécules du CMH-I dans les endosomes sont importantes pour la cross-présentation, telles que les molécules Rab3b, Rab3c et Rab22b, (Cebrian et al., 2016; Weigert et al., 2004; Zou et al., 2009). De plus, il a été observé que les molécules du CMH-I sont présentes dans les endosomes recyclés Rab11a⁺ (**Figure 2 et 3**). La signalisation par les TLR induit le transport de MHC-I par SNAP23 (une protéine de transport vésiculaire) des vésicules de recyclage vers les phagosomes (Nair-Gupta et al., 2014) (**Figure 2**). Une délétion de Myd88 ou Rab11a inhibe le trafic des CMH-I et la cross-présentation des antigènes associés aux TLR.

Un autre mécanisme potentiel est le trafic des molécules du CMH I directement du RE vers les endosomes/phagosomes. Il a été proposé que CD74, la chaîne invariante, est impliquée dans le transport direct de molécules du CMH-I nouvellement synthétisées du RE vers les compartiments endocytaires (**Figure 2**). En effet, la cross-présentation des antigènes solubles et cellulaires est sévèrement diminuée dans les BMDC et les DC spléniques déficientes en CD74, mais une reconstitution de l'expression de CD74 dans ces DC rétablit leur capacité à cross-présenter (Basha et al., 2012). Le rôle de CD74 dans la cross-présentation est controversé, car il a également été montré qu'un déficit d'expression de CD74 n'affecte pas la capacité des mo-DC humaines, différenciés in vitro en présence de GM-CSF/IL4, à cross-présenter (Ma et al., 2016). Ce qui suggère que les mo-DC GMCSF/IL4, contrairement aux BMDC et les DC spléniques, ne chargent pas les peptides aux molécules du CMH-I provenant du RE. De plus, *Ma et al* ont observé que la primaquine, qui bloque le recyclage des molécules du CMH-I, n'impacte pas la capacité des mo-DC humaines à cross-présenter. Dans ce cas, il est donc probable que les molécules du CMH-I présentes dans les phagosomes ne proviennent pas de la surface cellulaire mais de molécules de CMH-I nouvellement formées (Ma et al., 2016). Ces résultats suggèrent que les mo-DC chargent

leur peptide aux molécules du CMH-I nouvellement synthétisées, par échange de peptides dans des vésicules distinctes du RE et du recyclage de la membrane plasmique.

Dans le RE, les molécules MHC-I « vides » sont stabilisées par les protéines chaperonnes jusqu'à ce qu'elles se lient au peptide. Les molécules de CMH-I dans les endosomes sont instables avant l'acquisition de peptides pour la cross-présentation (Ljunggren et al., 1990). Il a été proposé que les molécules du CMH-I transportées vers les phagosomes sont déjà couplées à des peptides (qui stabilisent le CMH-I) (Baleeiro et al., 2015; Burgdorf et al., 2008). Concernant les molécules de classe I recyclées depuis la surface cellulaire, elles sont déjà associées à des peptides, empêchant en théorie l'acquisition de nouveaux peptides (Abdel Motal et al., 1993). Néanmoins, il a été mis en évidence l'échange de peptides dans les compartiments endosomaux à pH bas (Grommé et al., 1999).

En résumé, ces résultats suggèrent que deux voies pourraient coexister dans les DC pour le trafic du CMH de classe I vers les endosomes : livraison des molécules du CMH classe I nouvellement formées à partir du RE et recyclage des molécules du CMH-I de classe I depuis la surface cellulaire.

D. Régulation de la cross-présentation

1. Régulation positive de la cross-présentation

Les DC expriment plusieurs membres de la famille des récepteurs Toll-like (TLR) (Hemmi et al., 2003; Imler and Hoffmann, 2003; Medzhitov and Janeway, 2002; Takeda and Akira, 2001). De nombreux travaux ont montré que les TLR jouent un rôle dans la cross-présentation car ils peuvent reconnaître et interagir avec les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) (Medzhitov and Janeway, 2002) ou des motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (DAMP) (Shi et al., 2003; Woo et al., 2014), induisant la maturation des DC, l'augmentation de l'expression des molécules costimulatrices, de la capture de l'antigène et du chargement des peptides sur les molécules du CMH-I (Maurer et al., 2002; Weck et al., 2007).

Différentes études ont montré que la stimulation des TLR4, TLR7 et TLR9 favorise la cross-présentation d'antigènes solubles (Burgdorf et al., 2008; Crespo et al., 2013; Datta et al., 2003). Chez la souris, la stimulation du TLR-4 entraîne une augmentation du transporteur TAP au niveau des endosomes, qui permet la translocation des peptides générés par le protéasome dans les endosomes où ils sont chargés sur la molécule du CMH-I (Burgdorf et al., 2008). La stimulation du TLR -4 permet également le recrutement de NOX2 dans les phagosomes, ce qui conduit à la production de ROS. La production de ROS va augmenter le pH dans le phagosome et limiter la dégradation de l'antigène qui est essentielle pour la cross-présentation (Ding et al., 2016; Elsen et al., 2004).

Une autre étude suggère que TLR 2 est impliqué dans l'export des antigènes vers le cytosol via le recrutement de Sec61 dans les phagosomes (Ackerman et al., 2006; Zehner et al., 2015). Cependant, ces résultats restent controversés car chez l'homme il a été montré que Sec61 n'affecte pas l'export de l'antigène vers le cytosol mais diminue l'expression des molécules de CMH-I et la β 2-globuline (Grotzke et al., 2017; Ménager et al., 2014).

De plus, la stimulation des TLR 4 et 7 peut également inhiber la fusion des phagosomes avec les lysosomes (Alloatti et al., 2015; Crespo et al., 2013), limitant l'acidification dans les compartiments endosomaux et la dégradation des antigènes exogènes, ce qui favorise le chargement des peptides aux molécules du CMH-I et la cross-présentation par les DC.

Enfin, il a été démontré que la stimulation de TLR4 induit le transport des molécules du CMH-I via SNAP23 (une protéine de transport vésiculaire) des vésicules de recyclage vers les phagosomes pour la cross-présentation (Nair-Gupta et al., 2014).

Ces résultats mettent en évidence que la signalisation par les TLR module l'efficacité de la cross-présentation via la maturation des phagosomes (régulation du pH et de la fusion des phagosomes avec les lysosomes) mais aussi en adaptant le phagosome pour accumuler un nombre suffisant de CMH-I pour une cross-présentation optimale.

En plus des récepteurs TLR, il a été démontré que les cytokines inflammatoires, telles que l'interféron de type I IFN- α/β , sont impliquées dans la cross-présentation.

In vivo, il a été démontré que la capacité des cDC1 murines déficientes en interféron de type I à cross-présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8⁺ est altérée (Diamond et

al., 2011).

Chez la souris, il a été montré que l'interféron de type I augmente la cross-présentation d'antigène exogène par les cDC1. En effet, in vivo, l'IFN-I induit la maturation des DC et la cross-présentation des protéines virales ou d'antigène soluble (OVA) aux lymphocytes T CD8 (Le Bon et al., 2003). Une autre étude a également montré que l'IFN de type I, in vivo et in vitro, induit la cross-présentation par les cDC1 murines de cellules tumorales irradiées (Diamond et al., 2011).

Chez l'homme, la stimulation des cDC du sang avec de l'IFN de type I augmente l'expression des molécules du CMH-I, CD40, CD80, CD86 et CD83 et la capacité des cDC à cross-présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8+ (Ito et al., 2001; Schiavoni et al., 2013). De plus, l'IFN-I soutient la différenciation des monocytes humains en DC. Il a été démontré, en utilisant des DC dérivées de patients atteints de leucémie myéloïde chronique ou infectés par un virus, que l'IFN-I augmente la capacité des mo-DC à cross-présenter les antigènes viraux ou associées aux tumeurs (Gabriele et al., 2004; Lapenta et al., 2006).

Dans les cas de cancer, il a été démontré que l'interféron β joue un rôle clé dans la réponse anti-tumorale. En effet, la réponse T CD8 est affectée uniquement chez les souris avec un déficit en STING (impliqué dans la reconnaissance d'ADN cytosolique), qui est un stimulateur des gènes de l'interféron, (Woo et al., 2014).

Toutes ces études montrent que les récepteurs TLR et l'interféron de type I peuvent augmenter la cross-présentation par les DC et la réponse cytotoxique anti-infectieuse ou anti-tumorale.

2. Régulation négative de la cross-présentation

Toutefois, la temporalité de la stimulation des DC est importante car les DC matures sont moins efficaces pour présenter de nouveaux antigènes.

En effet, il a été montré que la cross-présentation d'antigènes particuliers est altérée uniquement chez DC présentant un phénotype mature, qui ont été stimulées durant 22h avec des agonistes de TLR4 (LPS) et TLR9 (TNF- α , CpG) (Wagner et al., 2013). Ces travaux montrent que la diminution de la capacité à cross-présenter est corrélée avec une

augmentation de pH dans les phagosomes. Néanmoins, la dégradation des antigènes particuliers n'est pas augmentée chez les DC matures, ce qui suggère que la diminution du pH phagosomal régule la cross-présentation par un autre mécanisme que la dégradation de l'antigène.

De plus, une infection systémique ou une stimulation constante des TLR peuvent inhiber la cross-présentation par les DC et la réponse CTL (Wilson et al., 2006). Cependant, il a récemment été suggéré que la faible capacité des DC à cross-présenter dans ces circonstances est due au microenvironnement immunosuppresseur établi lors de la primo-infection. En effet, les DC sécrètent du TGF- β ce qui favorise l'accumulation des lymphocytes T régulateurs (Askenase et al., 2015; Roquilly et al., 2017).

Cependant, les mécanismes impliqués dans la régulation de la cross-présentation par les ligands de TLR ne sont pas encore bien connus. Plusieurs hypothèses ont été émises telles que :

- 1) Dans les DC matures, l'internalisation des antigènes exogènes est diminuée (Gil-Torregrosa et al., 2004; Weck et al., 2007; Wilson et al., 2006). Cependant, d'autres études montrent que la capacité des DC à cross-présenter est indépendante de la capture antigénique (Datta et al., 2003; Wagner and Cresswell, 2012).
- 2) Une diminution du pH dans les phagosomes des DC matures (Wilson et al., 2006).
- 3) Inhibition de l'export de l'antigène vers le cytosol (Gil-Torregrosa et al., 2004).

Partie III : Cellules myéloïdes mononucléaires humaines

La cross-présentation et l'activation des lymphocytes T pour induire une réponse immunitaire adaptative, sont effectuées par des CPA. Les CPA sont des cellules myéloïdes mononucléées phagocytaires (MPS : *mononuclear phagocyte system*). Dans cette 3^{ème} partie, je vous présenterai les différentes populations de MPS et leurs fonctions.

Il existe trois grands types de MPS : les monocytes, les macrophages et les DC (van Furth et al., 1972; Yona and Gordon, 2015).

Les phagocytes mononucléés jouent un rôle clé durant le développement, dans le maintien de l'homéostasie tissulaire ainsi que dans la réparation tissulaire après un traumatisme. De plus, les cellules myéloïdes mononucléées, en particulier les cellules dendritiques, ont la capacité de présenter des antigènes aux lymphocytes T permettant l'initiation de la réponse immunitaire adaptative (Davies et al., 2013; Ginhoux and Jung, 2014; Wynn et al., 2013).

Distinguer les MPS les unes des autres, à savoir les DC classiques, les macrophages résidents des tissus, les monocytes et les cellules dérivées des monocytes, s'est révélé difficile car ces populations cellulaires partagent certains marqueurs de surface dont l'expression peut changer en fonction du tissu de résidence et des stimuli inflammatoires. Des analyses récentes ont apporté de nouvelles perspectives sur l'ontogenèse et le développement de différentes cellules myéloïdes mononucléaires (Becher et al., 2014; Ginhoux and Jung, 2014). Par conséquent, la nomenclature actuelle est principalement basée sur l'ontogenèse (Guilliams et al., 2014; Reynolds and Haniffa, 2015; See et al., 2017).

A. Monocytes

Les monocytes sont principalement présents dans la moelle osseuse, le sang périphérique et la rate (Geissmann et al., 2003; Lee et al., 2015a; Swirski et al., 2009; Yona et al., 2013). Les monocytes constituent une population hétérogène et diffèrent par leur phénotype, leur taille, leur morphologie et leur profil transcriptionnel (Cros et al., 2010; Geissmann et al., 2003; Ingersoll et al., 2010; Wong et al., 2011). Chez la souris, deux populations de monocytes ont été décrites: Ly6C^{hi} CCR2⁺ CX3CR1^{int} et Ly6C^{lo} CCR2⁻ CX3CR1^{hi},

représentant respectivement des monocytes classiques et non classiques (Geissmann et al., 2003). Chez l'homme, trois principales populations de monocytes ont été décrites : les CD14⁺CD16⁻ (monocytes classiques) qui représente environ 85% des monocytes circulants, les CD14⁺CD16⁺ (monocytes intermédiaires) et les CD14⁻CD16⁺ (monocytes non classiques) (Passlick et al., 1989; Patel et al., 2017a; Wong et al., 2011).

Les monocytes proviennent d'un précurseur hématopoïétique présent dans la moelle osseuse, appelé progéniteur commun des monocytes (cMoP ; *common monocytes progenitor*) et identifié chez la souris et l'homme (Hettinger et al., 2013; Kawamura et al., 2017). Leur différenciation dépend du récepteur au M-CSF (*Monocyte-Colony Stimulating Factor*) (Rongvaux et al., 2014) (**Figure 10**).

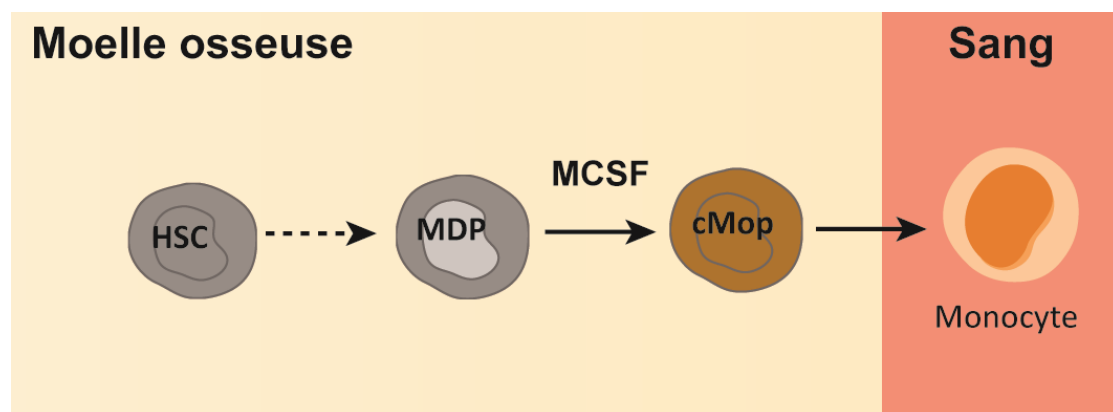


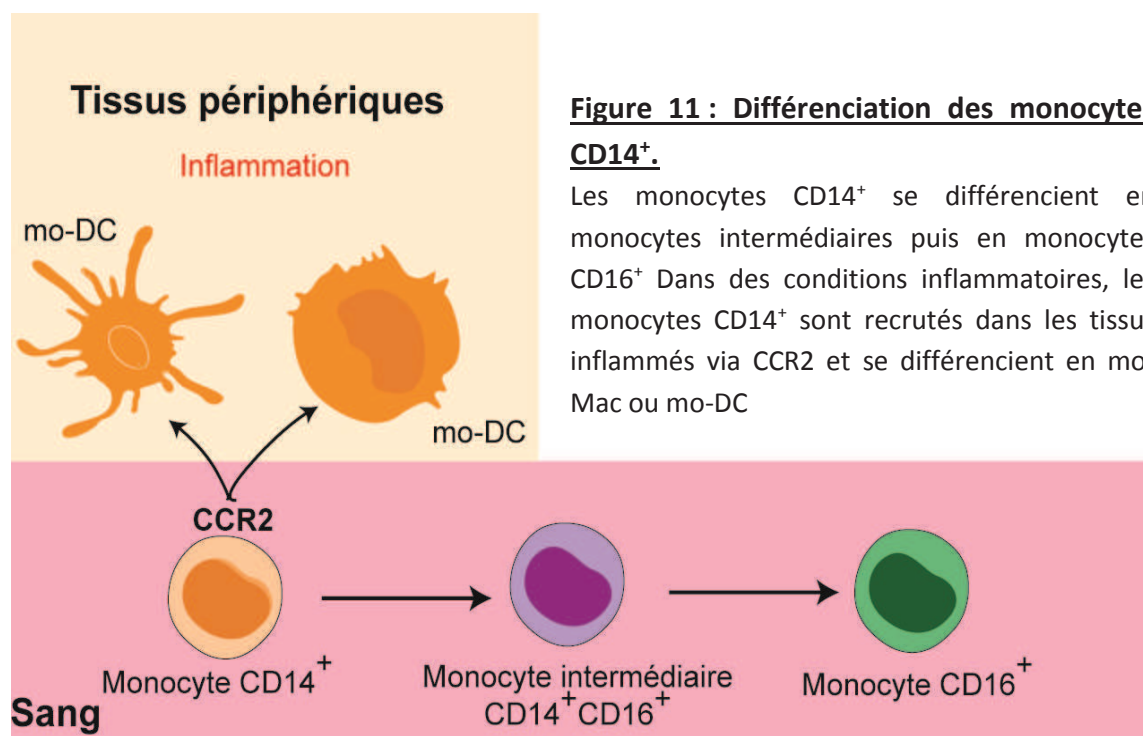
Figure 10 : Ontogénèse des monocytes

Les monocytes dérivent de précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les MDP, en présence de M-CSF, se différencient en cMoP puis en monocytes qui rejoindront la circulation sanguine. Abréviations : HSC, cellules souches hématopoïétique ; MDP, précurseur de monocytes et de DC ; cMoP, progéniteur commun des monocytes.

Récemment, il a été montré chez la souris que 24h après transplantation de monocytes Ly6C⁺, les monocytes transférés perdent progressivement le marqueur de surface Ly6C, donnant naissance à des monocytes Ly6C intermédiaire et enfin à des monocytes Ly6C^{low}. Ces données ont également été confirmées par Single Cell RNA-seq, où la signature moléculaire des monocytes Ly6C⁺ se déplace vers un profil de monocytes Ly6C^{low}. Ceci indique que les monocytes Ly6C⁺ représentent une population cellulaire instable avec un potentiel de différenciation par défaut vers les monocytes Ly6C^{low} (Mildner et al., 2017). Les mêmes observations ont été montrées chez l'homme, où les monocytes classiques

(CD14⁺CD16⁻) après 24h se différencie d'abord en monocytes intermédiaires puis en monocytes CD16⁺CD14⁻ (Patel et al., 2017a) (**Figure 11**).

Ces travaux montrent, chez l'homme et chez la souris, que les monocytes CD14⁺ ou LyC6⁺ sont programmés pour se différencier spontanément et par défaut en monocytes CD16⁺ ou LyC6^{low}, s'ils ne sont pas recrutés dans les tissus. Au cours de l'inflammation, les monocytes présents dans le sang périphérique sont recrutés via le récepteur de chimiokine CCR2 (Serbina and Pamer, 2006) au niveau des tissus inflammés où ils se différencient soit en DC ou en macrophages, qui sont appelés mo-DC et mo-Mac respectivement. Nous aborderons plus en détail les DC dérivées des monocytes dans la 4^{ème} partie.



B. Macrophages

Les macrophages dans les tissus jouent un rôle dans le développement et l'homéostasie tissulaire, grâce à l'élimination des cellules sénescentes, au remodelage et à la réparation des tissus après l'inflammation (Geissmann et al., 2010; Gordon, 1998). Les macrophages présentent également des spécialisations fonctionnelles en fonction de leur localisation tissulaire (cellules de Kupffer du foie; les macrophages alvéolaires, spléniques et péritonéaux, etc.) (Gale et al., 1978; Ginhoux et al., 2010; Thomas et al., 1976; Yona et al., 2013).

1. Les macrophages dérivés des précurseurs embryonnaires

Chez la souris et chez l'homme, les macrophages tissulaires dérivent de cellules souches embryonnaires qui colonisent les tissus avant la naissance et qui se maintiennent ensuite à l'âge adulte, indépendamment de la reconstitution par les monocytes sanguins (Hashimoto et al., 2013; Mass et al., 2016; Soucie et al., 2016; Yona et al., 2013).

Le développement et l'ontogénie des macrophages ont été initialement décrits chez la souris, mettant en évidence que les macrophages se développent dans l'embryon (sac vitellin; YS) avant l'apparition des cellules souches hématopoïétiques (HSC) et indépendamment du facteur de transcription Myb (qui est nécessaire pour les HSC et les monocytes). Ces résultats définissent une lignée de macrophages tissulaires provenant du YS et qui sont génétiquement distincts des autres cellules mononucléées phagocytaires (Gomez Perdiguero et al., 2015; Schulz et al., 2012).

Chez l'homme, la différenciation des macrophages est dépendante des facteurs de transcription Runx1 et Spl1 mais indépendante de Myb (Buchrieser et al., 2017; Karlsson et al., 2008; van Wilgenburg et al., 2013).

La capacité des macrophages à s'auto-renouveler a été confirmée par différentes études. En effet chez la souris, après déplétion des macrophages pulmonaires, il a été démontré que la repopulation des macrophages se faisait par prolifération cellulaire stochastique *in situ* dépendante des facteurs M-CSF et GM-CSF (Hashimoto et al., 2013). De plus chez l'homme, il a été constaté qu'après une greffe de moelle osseuse, les macrophages de la peau

conservaient la capacité de se développer et restent présent au moins plusieurs mois après la transplantation, contrairement aux DC dermales qui sont rapidement déplétées (Haniffa et al., 2009). Il a également été observé chez les patients avec une mutation du facteur de transcription GATA2 ou IRF8 une absence de tous les monocytes sanguins; malgré cela, les patients ne présentent pas de défaut du nombre de macrophages dermiques et pulmonaires, suggérant que le développement des macrophages résidents est indépendant des monocytes sanguins (Bigley and Collin, 2011; Hambleton et al., 2011).

2. Impact des facteurs environnementaux sur la différenciation des macrophages

Les macrophages sont des cellules hétérogènes, bien qu'ils proviennent de progéniteur embryonnaire commun, ils présentent des profils transcriptionnels distincts selon leur localisation tissulaire (Gautier et al., 2012).

Différentes études ont permis de démontrer que les facteurs environnementaux influencent la spécialisation des macrophages résidents dans les tissus. En effet, il a été rapporté que les facteurs de transcription, spécifiques aux tissus, dictent le programme transcriptionnel, dans les macrophages. Dans la rate, le facteur de transcription Spi-c est essentiel pour le développement des macrophages présents dans la pulpe rouge (Haldar et al., 2014; Kohyama et al., 2009), le récepteur nucléaire LXR α contrôle la spécialisation fonctionnelle des macrophages dans la zone marginale de la rate (A-Gonzalez et al., 2013) et des macrophages dans les cellules de Kupffer (Joseph et al., 2004). Le facteur de transcription NFATc1 est essentiel pour la différenciation des progéniteurs embryonnaires en macrophage (Takayanagi et al., 2002). La délétion de ces facteurs de transcription entraîne l'ablation des sous-populations de macrophages dans les différents tissus. Dans le péritoine, l'acide rétinoïque (RA) stimule l'expression du facteur de transcription Gata6 et contribue ainsi à la polarisation des macrophages (Okabe and Medzhitov, 2014). De plus, il a été mis en évidence que les facteurs de transcriptions spécifiques aux tissus ou au lineage contrôlent l'état épigénomique, des macrophages résidents dans les tissus et conduit à une hétérogénéité des macrophages tissulaires (Gosselin et al., 2014; Lavin et al., 2014).

Ces données fournissent des preuves que l'environnement tissulaire régit le programme transcriptionnel dans les macrophages et que leur différenciation n'est pas dictée par leur ontogénie (Gautier et al., 2012)

3. Les macrophages dérivés des monocytes (mo-Mac)

La plupart des macrophages résidents dans les tissus sont maintenus indépendamment du système monocyttaire sanguin à l'exception des macrophages au niveau des muqueuses (peau et intestin) (Rivollier et al., 2012; Tamoutounour et al., 2013). De plus, durant l'inflammation et le vieillissement, les macrophages sont renouvelés par des monocytes dérivés de la moelle osseuse afin de remplacer les macrophages résidents (Bain et al., 2014; Hashimoto et al., 2013; Molawi et al., 2014; Yona et al., 2013).

4. Fonctions des macrophages dans la présentation d'antigène

Les macrophages sont considérés comme des cellules du système immunitaire inné qui limitent la propagation des pathogènes par la phagocytose (Seiler et al., 1997) et la dégradation (Klaas and Crocker, 2012; Oehen et al., 2002). Ils sont localisés à des points d'entrée stratégiquement importants, tels que le sinus sous-capsulaire des ganglions lymphatiques (Kastenmüller et al., 2012), la zone marginale et les zones de la pulpe rouge de la rate, où ils capturent et filtrent les agents pathogènes (Aichele et al., 2003; Aoshi et al., 2009; Iannacone et al., 2010).

Les macrophages ne sont généralement pas efficaces pour initier la réponse immunitaire adaptative via l'activation des lymphocytes T (Aichele et al., 2003). Néanmoins, il a été démontré que les macrophages CD169⁺, présents dans la zone marginale de la rate ou le sinus sous-capsulaire des ganglions lymphatiques, sont capables d'induire une réponse T CD8 cytotoxique. En effet, il a été démontré chez les souris déplétées en DC, que les macrophages CD169⁺ présentent efficacement les antigènes viraux, des antigènes particulaires ou solubles aux LT et induisent la réponse CTL (Bernhard et al., 2015; Veninga et al., 2015).

En plus de leur capacité à induire une réponse CTL, les macrophages CD169⁺ sont également capable de présenter l'antigène OVA aux LT CD4 donnant naissance à des lymphocytes Tfh et aux lymphocytes B (LB) pour induire une réponse humorale (Phan et al., 2007). Il a été montré que les macrophages CD169⁺ retiennent l'Ag internalisé dans leur compartiment phagosomal pendant environ 2 jours, suggérant que ces macrophages possèdent une faible activité protéolytique qui est essentielle pour le « priming » des LB (Junt et al., 2007; Phan et

al., 2007). Cependant le rôle des macrophages dans l'induction des réponses humorales et CTL reste controversé. Une autre étude a montré par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence, que les cellules CD169⁺ dans les ganglions lymphatiques mésentériques, expriment le facteur de transcription zbtb46, qui est spécifique des cDC mais pas par les pDC et les macrophages. Ce qui suggère que les macrophages CD169⁺ sont en réalité une sous-population de cDC (Satpathy et al., 2012).

C. Les cellules dendritiques

1. Définition des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont été identifiées pour la première fois par Paul Langerhans en 1868 au niveau de l'épiderme. Ces cellules comportent de longs prolongements cytoplasmiques, ressemblant fortement aux dendrites des cellules neuronales d'où l'origine du nom : cellules dendritiques. Après cent ans, l'équipe de Ralph Steinman et Cohn découvre les DC chez la souris et caractérisent ces cellules comme étant des cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Steinman and Witmer, 1978; Steinman et al., 1974, 1979). Les cellules dendritiques ont la capacité de capturer des antigènes et de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont activer efficacement les lymphocytes T naïfs (Robbins et al., 2008; Shortman and Liu, 2002; Steinman and Hemmi, 2006; Steinman and Witmer, 1978).

2. Diversité des cellules dendritiques

Les DC constituent une population hétérogène. Les sous-populations de DC se distinguent par leur phénotype, leur localisation, leur ontogénie mais aussi par certaines propriétés fonctionnelles.

Les DC peuvent être séparées en deux grandes catégories : les DC résidentes et les DC migratoires. Les *DC résidentes* sont localisées dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate et amygdales). Les *DC migratoires* sont dans un premier temps localisées au niveau des tissus périphériques (peau, foie, poumon, rein, intestin et autres organes). Les DC migratoires migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques drainants via la lymphe afin de présenter les antigènes aux lymphocytes T (Braun et al.,

2011; Ulvmar et al., 2014; Wilson et al., 2008). Les mêmes observations ont été retrouvés chez l'homme (Haniffa et al., 2012; McIlroy et al., 2001; Morandi et al., 2013; Segura et al., 2012).

Ces deux populations de DC peuvent être distinguées par leur phénotype et leur différence d'expression des marqueurs de maturation. Contrairement aux DC migratoires, les DC résidentes présentent un phénotype « immature » en l'absence d'infection (Segura et al., 2013a; Wilson et al., 2003) (**Tableau 1 et 2**).

De nombreuses études chez la souris ont montré qu'au sein de ces deux grandes catégories de DC il existe plusieurs sous-populations de DC distinctes qui peuvent être classé en fonction de leur ontogénie (**Figure 12**) :

- Les pDC : elles sont considérés comme des DC résidentes, cependant elles ont la capacité de migrer vers les tissus périphériques durant l'inflammation. Le développement des pDC est dépendent des facteurs de transcription BCL11A (*B-cell lymphoma/leukemia 11A*) et E2-2 (Cisse et al., 2008; Ippolito et al., 2014).

- les DC classiques de type 1 (cDC1) : elles sont résidentes (CD8⁺) ou migratoires (CD103⁺ Langerin⁺). Leur développement dépend des facteurs de transcription IRF8 et Batf3 (Edelson et al., 2010; Ginhoux et al., 2009; Hildner et al., 2008).

- les DC classiques de type 2 (cDC2) : elles sont résidentes (CD8⁻CD11b⁺) ou migratoires (CD11b⁺). Leur différenciation dépend des facteurs de transcription RelB et IRF4 (Schlitzer et al., 2013; Wu et al., 1998) et aussi de Notch2 (Lewis et al., 2011).

- les cellules de Langerhans : elles sont présentes dans la peau et dans les muqueuses buccale et vaginale, et sont migratoires. Les cellules de Langerhans dérivent de monocytes embryonnaires qui ensemencent les tissus avant la naissance (Hoeffel et al., 2012). Leur différenciation dépend de CD115 / MCSF-R et du ligand IL-34 (Greter et al., 2012a; Wang et al., 2012). En conséquence, il a été proposé que les cellules de Langerhans pourraient être considérées comme des macrophages plutôt que comme DC (Guilliams et al., 2014).

- les DC dérivées de monocytes (mo-DC): elles peuvent être présentes dans les tissus périphériques en l'absence d'inflammation: dans l'intestin (Bogunovic et al., 2009; Varol et al., 2009), le muscle (Langlet et al., 2012) ou la peau (Tamoutounour et al., 2013) et le péritoine (Goudot et al., 2017).

Durant l'inflammation les monocytes sont recrutés au site d'inflammation où ils peuvent se différencier *in situ* en cellules exprimant des marqueurs de DC classiques (CD11c et CMH de classe II) et présenter certaines caractéristiques fonctionnelles des DC (migration vers les ganglions lymphatiques et la capacité de présentation antigénique) : ces cellules ont donc été identifiées comme étant une population de DC et sont généralement appelées «DC inflammatoires» (Segura and Amigorena, 2013). Leur développement dépend de CD115 / MCSF-R (Greter et al., 2012b) mais aussi de IRF4 et AHR (Goudot et al., 2017).

Il a été démontré que les DC dérivées de monocytes expriment le facteur de transcription *zbtb46*, qui est spécifique des DC (Satpathy et al., 2012; Zigmond et al., 2012). Je développerai plus en détails les DC dérivées des monocytes et leur différenciation dans la 4^{ème} partie.

Grâce aux analyses transcriptomiques comparatives, il a été montré que les sous-populations de DC sont conservés chez les mammifères : les ovins (Contreras et al., 2010) la souris (Robbins et al., 2008), les macaques (Dutertre et al., 2014) l'homme (Croizat et al., 2011) et le porc (Marquet et al., 2014).

La conservation des signatures génétiques et des marqueurs phénotypiques montrent que les DC humaines *Clec9A⁺/CD141⁺* (cDC1) sont homologues aux *CD8⁺DC* murines et les DC humaines *CD1c⁺/BDCA1⁺* (cDC2) sont homologues aux *CD11b DC* murines (Haniffa et al., 2012; Robbins et al., 2008; Watchmaker et al., 2014)(**Tableau 1 et 2**). Cependant, les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation de ces deux populations de DC chez l'homme peuvent être différents de ceux de la souris, car une mutation de *IRF8* provoque l'absence de toutes les sous-populations de cDC contrairement aux souris (Hambleton et al., 2011).

Les pDC (CD123⁺/BDCA2) ont été initialement décrites chez l'homme (Cella et al., 1999) et elles partagent un phénotype et des fonctions très similaires avec les pDC murines. Leur développement est dépendant de E2-2 (Nagasawa et al., 2008).

Les cellules de Langerhans humaines sont semblables aux cellules de Langerhans murines. Elles sont localisées au niveau de l'épiderme et des muqueuses (Duluc et al., 2013; Nestle et al., 1993). Les cellules de Langerhans humaines représentent une lignée distincte des DC et des monocytes et ont la capacité de s'auto renouveler. En effet, il a été observé chez des patients atteints d'une mutation du facteur de transcription GATA2 l'absence des monocytes dans le sang et de toutes les sous-populations de DC, mais pas des LC et des macrophages (Bigley et al., 2011).

Les mo-DC humaines seront plus particulièrement décrites dans la dernière partie.

Tableau 1 : Marqueurs phénotypiques des DC murines

Marqueurs	cDC1	cDC2	pDC	Cellules de Langerhans	DC dérivées des monocytes
CD11c	+	+	-	+	+
BST2/CD137	-immature +mature	-immature +mature	+	-	-immature + mature
XCR1	+	-	-	-	-
Clec9A	+	-	low	-	-
CD103	+	- + intestin	-	-	-
CD11b	-	+	-	-	+
Sirp- α	-	+	-	+	+
MR/CD206	-	-résidents + migratoires	-	-	+
Langerin/CD207	+	-	-	+	-
E-cadherin	-	-	-	+	-
CD14	-	-	-	-	+

Tableau 2 : Marqueurs phénotypiques des DC humaines

Marqueurs	cDC1	cDC2	pDC	CD1a+ DC Derme	CD14+ DC Derme	Cellules de Langerhans	DC dérivées des monocytes
CD11c	+	+	-	+	+	low	+
BDCA2/CD303	-	-	+	-	-	-	-
BDCA3/CD141	+	+/-immature + mature	-	-	+	-	-
BDCA1/CD1c	-	+	-	+	+	+	+
CD123	-	-	+	-	-	-	-
XCR1	+	-	-	-	-	-	-
Clec9A	+	-	-	-	-	-	-
CD11b	-	+	-	+	+	+	+
Sirp- α	-	+	-	+	+	+	+
MR/CD206	-	-	-	+	+	-	+
CD1a	-	-	-	+	-	+	+
CD14	-	-	-	-	+	-	+
FceRI	-	+ sang - tissus	-	-	-	-	+

3. Ontogénie

Les cellules dendritiques cDC1, cDC2 et pDC dérivent de progéniteurs présents dans la moelle osseuse.

Chez la souris, comme chez l'homme, différents groupes ont identifié le progéniteur commun des DC, appelé « CDP » (*CDP common-Dendritic Cell Progenitor*). Au cours de la différenciation dans la moelle osseuse, les précurseurs MDP s'orientent soit vers la lignée monocyttaire (cMoP), soit vers la lignée dendritique (CDP). Les CDP vont donner naissance aux pDC (dans la moelle osseuse) ou se différencier en précurseurs de DC (pré-DC) Les pré-DC circulent dans le sang vers les organes lymphoïdes et les tissus périphériques. Elles subissent alors un stade final de maturation avant de devenir des cDC (Breton et al., 2015a, 2015b; Lee et al., 2015a; Liu et al., 2007, 2009; Naik et al., 2006). Leur différenciation est dépendante du Flt3-L (Balan et al., 2014; Breton et al., 2015b, 2016; Lee et al., 2015a; Pulendran et al., 2000) (**Figure 12**).

Chez l'homme, les cDC sont présentes dans la circulation sanguine, il a donc été proposé que les cDC dans le sang ne soient pas complètement différenciées du fait qu'elles aient conservé leur capacité à proliférer, contrairement aux pDC et aux cDC dans les organes lymphoïdes (Nizzoli et al., 2013; Segura et al., 2012; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). D'autres études soutiennent l'hypothèse de la plasticité des cDC du sang car les cDC2 du sang en présence de TNF α et de TGF β peuvent se différencier en LC (Martínez-Cingolani et al., 2014; Milne et al., 2015).

Des analyses transcriptomiques comparatives des différentes sous populations de DC humaines provenant de différents tissus ont permis de montrer que le programme transcriptionnel des sous-populations de DC est principalement dicté par leur ontogénie et non par le microenvironnement tissulaire (Heidkamp et al., 2016; Miller et al., 2012). Cependant, les sous-populations de DC présentes dans les tissus périphériques peuvent être influencé par des signaux provenant de leur tissu d'origine (Heidkamp et al., 2016).

Récemment, grâce à des études par single-cell RNA-seq, il a été proposé que les précurseurs de DC sont pré-déterminés pour se différencier en cDC1 ou cDC2 (Breton et al., 2016; Schlitzer et al., 2015). En effet, Siglec-H et Ly6C sont des marqueurs qui permettent de

distinguer les sous-populations de pré-DC engagées dans la lignée cDC1 (Siglec-H⁻Ly6C⁻ pré-DC) ou la lignée cDC2 (Siglec-H⁻Ly6C⁺ pré-DC)(Schlitzer et al., 2015). Chez l'homme, le compartiment pré-DC contient des sous-populations distinctes, comprenant une sous-population de pré-DC CD123^{hi}CADM1⁻CD1c⁻ qui sont à un stade précoce (non engagé dans la différenciation des cDC1 ou cDC2) et deux sous-populations de pré-DC CD45RA⁺ CD123^{low} CADM1⁺ (cDC1) et CD45RA⁺ CD123^{low} CD1c⁺(cDC2) (See et al., 2017).

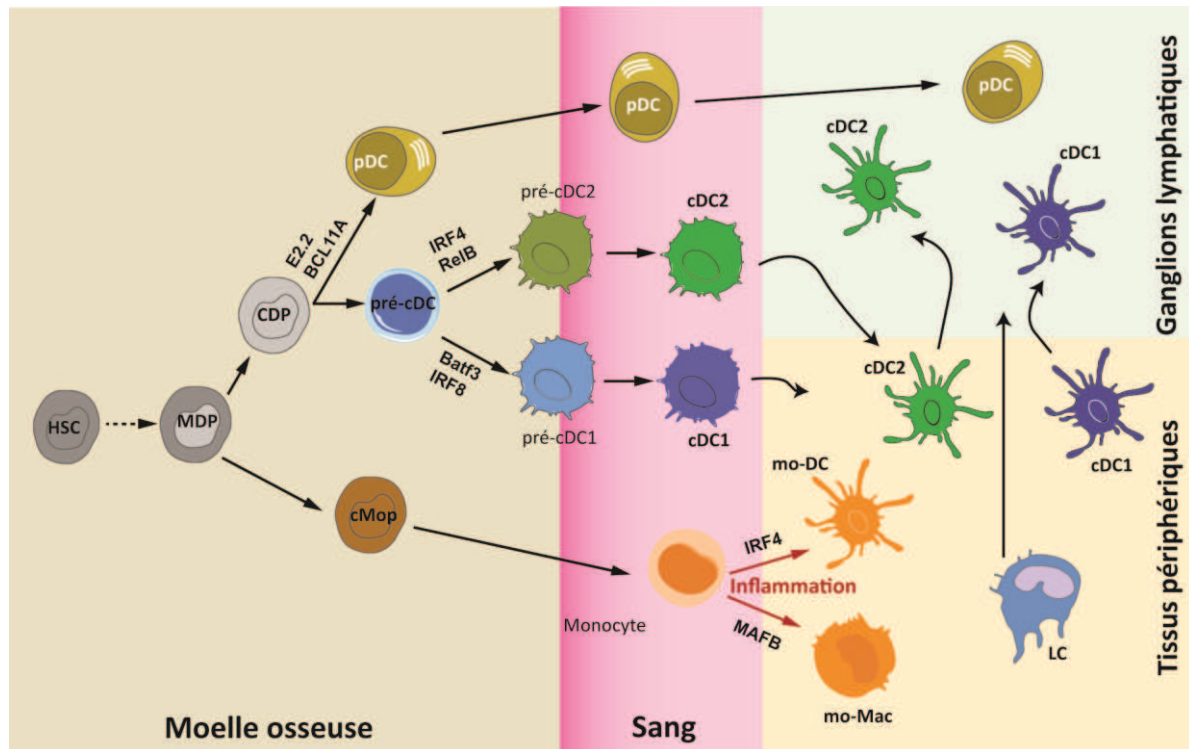


Figure 12 : Ontogénie des cDC, pDC, monocytes et mo-DC/Mac humaines

Les DC et les monocytes dérivent de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ils dérivent d'un progéniteur commun, le MDP. Le MDP se différencie en CDP pour donner des pDC et des précurseurs de DC, puis des cDC. Les pDC et les cDC présents dans le sang peuvent migrer vers les tissus périphériques et les ganglions lymphatiques. Le MDP peut également se différencier en cMop, puis en monocytes. Les monocytes dans le sang, migrent vers les tissus où ils se différencient en mo-DC ou mo-Mac. Les LC dérivent de monocytes embryonnaires qui ensemencent les tissus avant la naissance. Abréviations : HSC, cellules souches hématopoïétiques ; MDP, Monocytes DC précurseur ; CDP, précurseur commun des DC ; LC, cellules de Langerhans

4. Spécialisation fonctionnelle pour la cross-présentation

De nombreuses études réalisées chez la souris ont montré que ces sous-types de DC ont des fonctions différentes (Merad et al., 2013). Dans cette partie, je décrirai les sous-populations de DC identifiées chez la souris et l'homme qui sont capables de cross-présenter (Figure 13).

4.1. Les DC conventionnelles et la cross-présentation

Les cDC chez la souris

De nombreuses études ont montré que les cDC1 sont supérieures aux autres sous-populations de DC pour la cross-présentation chez la souris. Dans des modèles *in vitro* ou *ex vivo*, les DC CD8⁺ sont plus efficace que les DC CD8⁻ pour la cross-présentation de divers antigènes (Belz et al., 2004, 2005; den Haan and Bevan, 2002; Pooley et al., 2001; Schnorrer et al., 2006). Les DC CD103⁺ migratoires sont les plus efficace pour cross-présenter des antigènes acquis dans les poumons (Beauchamp et al., 2010; Desch et al., 2011; GeurtsvanKessel et al., 2008; del Rio et al., 2007), la peau (Bedoui et al., 2009; Henri et al., 2010) ou l'intestin (Cerovic et al., 2015). De plus, il a été montré qu'une ablation des cDC1 chez les souris affecte la cross-présentation des antigènes solubles ou particuliers (Desch et al., 2011; Kashiwada et al., 2011; Yamazaki et al., 2013) et des antigènes tumoraux (Helft et al., 2012; Hildner et al., 2008; Igyártó et al., 2011; Nopora et al., 2012). Toutefois, il a été montré que la cross-présentation n'est pas affectée chez les cDC1 déficientes en IRAP, ce qui suggère qu'elles utilisent la voie cytosolique pour la cross-présentation (Segura et al., 2009).

Les cDC1 présentent également des caractéristiques spécifiques favorisant la cross-présentation. Dans la rate, seuls les DC CD8⁺ limitent la dégradation de l'antigène en maintenant un pH alcalin dans leur compartiment endosomal via NOX2 (Savina et al., 2009). Les DC CD8⁺ résidentes et DC migratoires CD103⁺ sont plus efficaces pour exporter des protéines exogènes vers le cytosol (Desch et al., 2014). De plus, les DC CD8⁺ surexpriment les gènes impliqués dans la cross-présentation par rapport aux DC CD8⁻ (Dudziak et al., 2007; Nair-Gupta et al., 2014).

Cependant, des études ont montré que les cDC2 sont capables de cross-présenter des complexes immuns OVA (OVA-IC) aux lymphocytes T CD8⁺. Chez les souris déficientes en

chaînes gamma du récepteur Fc de l'immunoglobuline G (Fc(gamma)R ; avec un motif ITAM), la cross-présentation est altérée chez les DC CD8⁻ mais n'affecte pas la cross-présentation par les DC CD8⁺ (den Haan and Bevan, 2002). Les DC CD8⁻ résidentes sont également capables de cross-présenter des antigènes associés *Saccharomyces cerevisiae* via Dectin 1, qui contient une région intra-cytoplasmique présentant des motifs ITAM (Backer et al., 2008). Les DC CD8⁻ peuvent également cross-présenter des antigènes en ciblant des récepteurs de surface par l'expression CD205 (Kamphorst et al., 2010) ou en présence d'adjuvants (Neubert et al., 2014). Il a aussi été montré que les DC CD11b⁺ migratoires présentes dans les poumons ont la capacité de cross-présenter des antigènes solubles in vivo en présence du ligand de TLR7 (Desch et al., 2014). In vitro, l'activation des DC CD11b⁺ pulmonaires par TLR7 permet le transfert de protéines exogènes vers le cytosol. Ces études suggèrent que les cDC1 cross-présentent efficacement les antigènes en l'absence d'activation alors que cDC2 ont besoin de signaux d'activation spécifiques pour effectuer la cross-présentation. Il a également été démontré que les cellules de Langerhans ne cross-présentent pas d'antigènes in vivo (Bursch et al., 2009; Igyártó et al., 2011; Seneschal et al., 2014).

En résumé, ces résultats suggèrent que les cDC1 murines sont les plus efficaces pour effectuer la cross-présentation (**Figure 13**).

Les cDC chez l'homme

En revanche, chez l'homme, les cDC1 et cDC2 dans les organes lymphoïdes sont capables de cross-présenter des antigènes solubles, en l'absence d'activation (Mittag et al., 2011; Segura et al., 2012, 2013a). Après stimulation des ligands de TLR, les cDC1 et cDC2 dans le sang montrent une efficacité similaire pour la cross-présentation (Nizzoli et al., 2013; Tel et al., 2013). De plus, ces deux sous-populations de DC provenant des poumons de souris humanisées sont également capables de cross-présenter des antigènes aux lymphocytes T CD8 mémoire (Yu et al., 2013). Cependant, les cDC1 semblent être plus efficaces que les cDC2 pour la cross-présentation d'antigènes dérivés de cellules nécrotiques (Jongbloed et al., 2010; Segura et al., 2013a), ce qui peut être dû à l'expression du récepteur Clec9A (Iborra et al., 2012; Zelenay et al., 2012).

Des études sur les mécanismes intracellulaires impliqués dans la cross-présentation montrent que les cDC1 et cDC2 provenant d'amygdales ont un pH et une production de ROS phagosomaux similaires, il en est de même concernant leur capacité à transférer de protéines exogènes dans leur cytosol (Segura et al., 2013a). Ces deux sous-populations de DC dans le sang sont également capables d'exporter des antigènes exogènes vers le cytosol, seulement si elles ont été préalablement activées (Segura et al., 2013a). Il a été démontré que la cross-présentation d'antigène soluble par les cDC1 et cDC2 est affectée en présence d'inhibiteurs du protéasome (Jongbloed et al., 2010; Segura et al., 2012, 2013a), indiquant que ces deux sous-types de DC cross-présentent par la voie cytosolique. Cependant, la cross-présentation de complexes immuns par les cDC1 est altérée par les inhibiteurs du protéasome, de l'acidification des endosomes et les inhibiteurs des protéases lysosomales (Flinsenbergh et al., 2012) suggérant que les voies cytosoliques et vacuolaires pourraient être utilisées par les cDC humains, en fonction de la nature de l'antigène. Dans la peau, les DC CD1a⁺ (Klechevsky et al., 2008; Segura et al., 2012) et les cellules de Langerhans (Polak et al., 2012) sont également capables de cross-présenter. Cependant, une étude a rapporté que les cDC1 de la peau étaient plus efficaces pour cross-présenter des antigènes solubles que les autres sous-populations de DC (Haniffa et al., 2012) (**Figure 13**).

4.2. Les pDC et la cross-présentation

Concernant les pDC murines, il a été rapporté dans un modèle *ex vivo* que les pDC sont capables de cross-présenter après stimulation des TLR (Mouriès et al., 2008) ou *in vitro* en utilisant un antigène ciblant CD317 (Moffat et al., 2013). *In vivo*, les pDC ne sont pas impliqués dans la cross-présentation d'antigènes viraux. En revanche, ils sont essentiels pour l'activation des lymphocytes T CD4 via la sécrétion de l'IFN (Interféron) de type I pour contrôler l'infection virale (Cervantes-Barragan et al., 2012; GeurtsvanKessel et al., 2008; Lee et al., 2009; Swiecki et al., 2013).

Chez l'homme, de nombreuses études ont montré que les pDC humaines cross-présentent efficacement des antigènes solubles (Aspord et al., 2014; Mittag et al., 2011; Segura et al., 2013a; Tel et al., 2013), des antigènes viraux (Di Pucchio et al., 2008; Hoeffel et al., 2007; Lui et al., 2009; Zhang et al., 2014) mais aussi des antigènes associés aux cellules (Guillerme et

al., 2013). Cependant, les pDC humaines n'ont pas la capacité de capturer et de cross-présenter des antigènes nécrotiques (Segura et al., 2013a). Les pDC provenant d'amygdales sont les plus efficaces pour le transfert de protéines exogènes dans le cytosol (Segura et al., 2013a). Dans certaines études, la cross-présentation d'antigènes solubles et d'antigènes associés aux cellules est inhibé par les inhibiteurs du protéasome (Hoeffel et al., 2007). Cependant, dans une autre étude, il a été montré que la cross-présentation d'antigènes viraux par les pDC est affectée par les inhibiteurs de l'acidification endosomale et des protéases lysosomales et indépendante du protéasome (Di Pucchio et al., 2008). Ces études suggèrent que pDC peuvent utiliser à la fois les voies cytosolique et vacuolaire pour la cross-présentation (**Figure 13**).

4.3. Les mo-DC et la cross-présentation

Dans des conditions inflammatoires, il a été montré que les mo-DC chez la souris sont capables de cross-présenter *ex vivo* des antigènes qui ont été capturés *in vivo* (Aldridge et al., 2009; Ballesteros-Tato et al., 2010; Langlet et al., 2012; Segura et al., 2009). De plus, dans le cas d'encéphalomyélite (EAE) (Ji et al., 2013) ou dans un modèle de réactivation du HSV-1 (Wakim et al., 2008), il a été proposé que les mo-DC inflammatoires peuvent cross-présenter des antigènes directement dans les tissus inflammés. Chez les souris déficientes en IRAP, la cross-présentation d'antigène soluble par les mo-DC est partiellement altérée, suggérant que le chargement sur les molécules du CMH de classe I se produisait dans les compartiments du RE et endocytaires (Segura et al., 2009) (**Figure 13**).

Chez l'homme les propriétés fonctionnelles des DC inflammatoires humaines et leur capacité à cross-présenter ont été étudiées durant cette thèse.

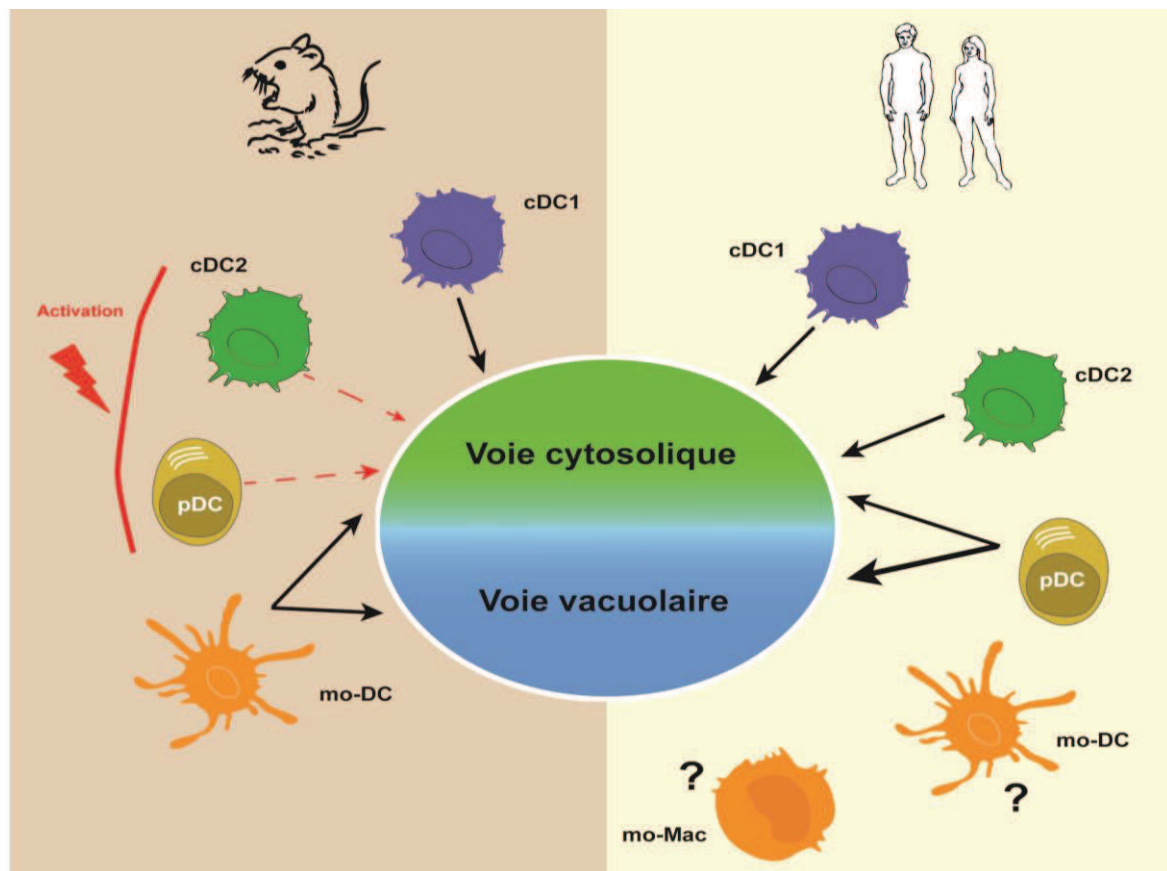


Figure 13 : La cross-présentation par les DC chez la souris et chez l'homme

Les cDC1 murines cross-présentent plus efficacement que les cDC2. Les cDC2 et pDC doivent être préalablement activées pour cross-présenter (pointillé rouge). La capacité des cDC et pDC humaines à cross-présenter est similaire. Les pDC humaines peuvent utiliser les deux voies de cross-présentation. Les mo-DC murines utilisent les deux voies de cross-présentation. Chez l'homme, la capacité des mo-DC et des mo-Mac à cross-présenter n'est pas connue et a été étudiée durant cette thèse.

Partie IV : Les cellules dendritiques dérivées des monocytes chez l'homme

Au cours de l'inflammation, les monocytes sont recrutés vers les sites inflammatoires où ils se différencient en cellules dendritiques qui sont appelées « mo-DC » (monocytes derived DC).

Dans cette partie, je développerai plus en détails l'origine des mo-DC humaines et leurs propriétés fonctionnelles.

A. Définition des mo-DC

De nombreuses études chez la souris ont montré que les monocytes peuvent se différencier in vivo en DC dans divers contextes inflammatoires, y compris les infections et les modèles de maladies auto-immunes (Mildner et al., 2013; Segura and Amigorena, 2013). Il a été montré que les mo-DC ont des caractéristiques similaires aux cDC telles que : leur morphologie avec la présence de dendrites, leur capacité à activer les cellules T naïves; et à migrer vers les ganglions lymphatiques. De plus, elles peuvent être définies en fonction de leur ontogénèse et des facteurs de transcription qu'elles expriment (Guilliams et al., 2014). De ce fait, les mo-DC sont classées comme une sous-population de DC distincte des cDC et pDC (Guilliams et al., 2014).

B. Identification des mo-DC inflammatoires humaines

Les mo-DC ont été identifiées pour la 1^{ère} fois dans la peau de patients atteints de dermatite atopique et nommées «cellules dendritiques épidermiques inflammatoires» (IDEC) (Wollenberg et al., 1996). Ces cellules ne sont pas présentes dans la peau saine et elles se distinguent des LC par leur phénotype. Par la suite, les IDEC ont également été identifiées dans la peau des patients atteints de psoriasis (Wollenberg et al., 2002). Une autre étude a rapporté la présence de «DC dermiques inflammatoires» dans la peau de patients atteints de psoriasis qui sont phénotypiquement différentes des DC dermiques retrouvées dans une peau saine (Zaba et al., 2009). Cependant, il n'est pas encore clair si ces DC inflammatoires représentent une forme activée de DC classiques ou si elles dérivent de monocytes.

Chez l'homme, plusieurs études ont mis en évidence que les monocytes sont recrutés dans les sites inflammatoires où ils se différencient en DC, comme chez la souris. Il a été observé que les monocytes sont recrutés dans l'intestin des patients atteints d'une maladie intestinale inflammatoire telles que la maladie de Crohn, de colite infectieuses ou dans le cas d'ulcère (Grimm et al., 1995) et que le nombre de monocytes augmente dans l'intestin des patients atteints de la maladie de Crohn et de colite ulcéreuse (Kamada et al., 2008). Un recrutement massif de monocytes au niveau des sites inflammatoires a également été observé dans des cloques cutanées induites par la cantharidine (Jenner et al., 2014), chez des patients atteints d'une inflammation du péritoine (Liao et al., 2017) et dans la muqueuse nasale de patients atteints de rhinite allergique (Eguíluz-Gracia et al., 2016).

Chez les patients atteints d'allergie rhinite, des monocytes sont recrutés dans la muqueuse nasale dans les heures qui suivent l'exposition aux allergènes conduisant à l'apparition d'une nouvelle population de DC (après 3 jours), suggérant que les monocytes se différencient en mo-DC. Une population de « DC inflammatoires » a aussi été identifiée dans le liquide synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et dans les ascites péritonéales de patients cancéreux, avec un phénotype différent de celui des cDC classiques (Segura et al., 2013b).

Enfin, les mo-DC ont également été mises en évidence dans les tumeurs pulmonaires et colorectales humaines. Ces mo-DC sont phénotypiquement proches des mo-DC identifiées dans les modèles tumoraux de souris (Laoui et al., 2016).

En résumé, ces résultats étayent l'idée que les monocytes recrutés sur les sites inflammatoires peuvent se différencier in situ en mo-DC chez l'homme.

C. Caractéristiques des mo-DC humaines

Les mo-DC inflammatoires humaines expriment des molécules de surfaces présentes sur les DC classiques mais expriment également des marqueurs de macrophages (Eguíluz-Gracia et al., 2016; Guttman-Yassky et al., 2007; Laoui et al., 2016; Segura et al., 2013b; Wollenberg et al., 2002). En revanche, les mo-DC n'expriment pas les molécules CD16 et CD163 qui sont présentes sur les macrophages (Laoui et al., 2016; Segura et al., 2013b)

(Tableau 3). Les mo-DC peuvent également être distinguées des macrophages par leur morphologie (Figure 14) et leur capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T (Segura et al., 2013b; Zaba et al., 2009).

Marqueurs de surface	cDC1	cDC2	Macrophage	mo-DC	CD14 ⁺ monocytes	Slan-DC
HLA-DR	+	+	+	+	+	+
CD11c	+	+	+	+	+	+
CD1c	-	+	-	+	-	-
CD1a	-	Tissu-dépendent	-	+	-	-
CD1b	-	Tissu-dépendent	-	+	-	-
CD141	+	low	low	+	-	-
CD14	-	-	+	intermédiaire	+	-
CD16	-	-	Tissu-dépendent	-	-/low	+
CD206	-	Tissu-dépendent	+	+	-	-
Clec9A	+	-	-	-	-	-
CD163	-	-	Tissu-dépendent	-	-	-
CD11b	-	Tissu-dépendent	+	+	+	+
MerTK	-	-	+	-	-	-
FceRI	-	Tissu-dépendent	-	+	-	-
Slan (M-DC8)	-	-	-	-	-	+

Tableau 3: Marqueurs phénotypiques des DC classiques, mo-DC, monocytes et macrophages. (cf annexe 1)

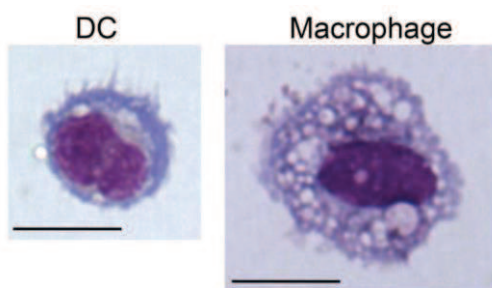


Figure 14 : Morphologie des DC humaines versus les macrophages.

DC et les macrophages du liquide synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ont été isolés et leur morphologie analysée après cytopspin et Giemsa/May-Grünwald coloration. La morphologie DC typique comprend une petite taille, la présence de dendrites et le manque de vacuoles internes. Bar = 10 μ m.

D. Ontogénie des mo-DC

La relation des mo-DC aux monocytes est suggérée par l'expression de CCR2, qui est un récepteur de chimiokine essentiel pour le recrutement des monocytes dans les tissus périphériques (Boring et al., 1997). Cependant, il ne s'agit pas d'un marqueur absolu des cellules dérivées des monocytes, car il a été montré dans l'intestin chez la souris, qu'une population de DC exprimant CCR2⁺ dérive de précurseur de DC (pré-DC) et non de monocytes (Scott et al., 2015). Généralement, l'ontogénie des DC humaines est déduite par l'analyse de leur profil transcriptomique et par l'expression de facteurs de transcription qui leur sont spécifiques, mais peut également être analysée à l'aide de modèles de différenciation in vitro (Breton et al., 2015a; Guilliams et al., 2014; Lee et al., 2015a). Les mo-DC provenant d'ascites tumorales expriment une combinaison unique de facteurs de transcription partagés avec les DC classiques (IRF4, BATF3, ZBTB46) ou avec les macrophages (EGR1, EGR2), mais n'expriment pas le facteur de transcription MAFB qui est restreint aux macrophages (Segura et al., 2013b). Récemment, un nouveau modèle de différenciation des monocytes humains en mo-DC et mo-Mac a été développé au laboratoire. Dans cette étude, nous avons montré que le facteur de transcription MAFB contrôle la différenciation des monocytes en mo-Mac, tandis que IRF4, BLIMP-1 et Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) sont essentiels pour la différenciation des monocytes en mo-DC (Goudot et al., 2017) (**Figure 15**). De plus, chez les patients atteints d'arthrite juvénile idiopathique systémique, les monocytes sous-expriment le facteur de transcription AHR, conduisant à la différenciation préférentielle des monocytes en mo-Mac (Cepika et al., 2017).

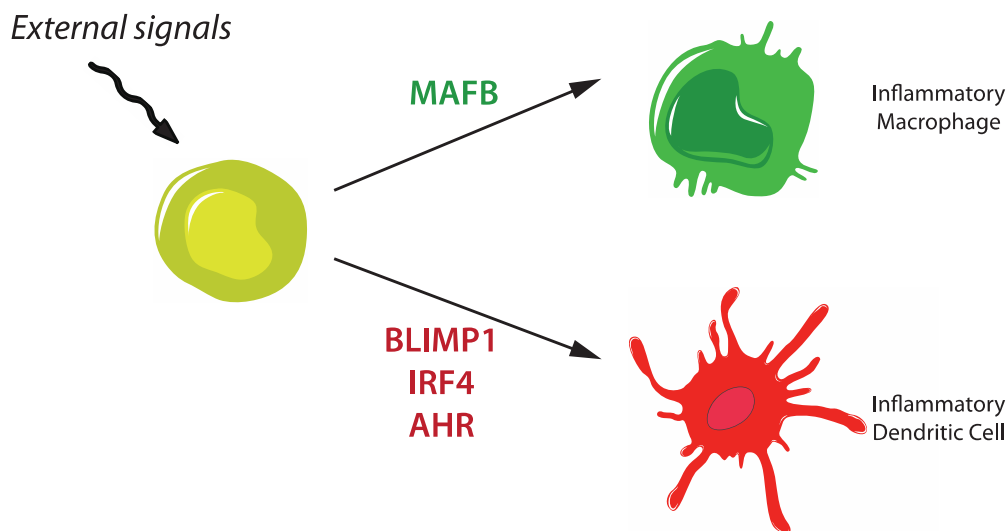


Figure 15 : Ontogénie des cellules dérivées des monocytes. En réponse à des signaux externes (cytokines et ligands AHR), les monocytes se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques. Les facteurs de transcription régissant ces deux voies sont indiqués

Il a été montré que les précurseurs des DC classiques humaines étaient pré-engagés, à un stade précoce, vers le lignage cDC1 ou cDC2 (Breton et al., 2016). En revanche, l'analyse par single cell RNA-seq des monocytes CD14⁺ humains a révélé que ceux-ci ne contiennent pas de précurseurs qui seraient pré-engagés à se différencier en mo-DC ou en mo-Mac (Goudot et al., 2017). Au contraire, les monocytes CD14⁺ du sang sont programmés pour se différencier spontanément en monocytes CD16⁺ dans le sang (Patel et al., 2017a) (cf partie 3 monocytes), à moins qu'ils ne migrent vers les tissus. Les monocytes partagent des gènes exprimés par les mo-Mac, suggérant que dans les tissus, les monocytes se différencient par défaut en macrophages à moins qu'ils ne rencontrent des signaux spécifiques, tels que les cytokines inflammatoires et les ligands AHR permettant leur différenciation en mo-DC (Goudot et al., 2017).

La différenciation des mo-DC et mo-Mac est régie par des facteurs de transcription distincts, ce qui signifie qu'elles ne représentent pas une population cellulaire hautement plastique comme il a été suggéré (Guilliams et al., 2014), mais qu'il s'agit plutôt d'authentiques lignées cellulaires distinctes, dérivées de monocytes (**Figure 15**).

E. Slan-DC

Les cellules CD16⁺ qui expriment une forme mutée de 6-sulfo-LacNAc du PSGL-1 (*P selectin glycoprotein ligand 1*) ont été dénommées «Slan-DC». Il a été proposé que les Slan-DC représentent un sous-type de DC inflammatoires ayant la capacité de produire de grandes quantités de TNF α après stimulation (Schäkel et al., 2002). Ces cellules ont été initialement identifiées dans le sang, mais peuvent aussi être présentes dans des tissus tels que la peau des patients atteints de psoriasis (Hänsel et al., 2011), les ganglions lymphatiques (Vermi et al., 2014), la lamina propria (Ogino et al., 2013), les ganglions mésentériques et la muqueuse intestinale de patients atteints de la maladie de Crohn (Bsat et al., 2015), de carcinome rénal (Toma et al., 2015), des amygdales (Vermi et al., 2014) et lésions cérébrales de patients atteints de sclérose en plaques (Thomas et al., 2014). Cependant, l'analyse transcriptomique comparative a identifié les slan-DC comme étant une sous-population de monocytes CD16⁺ (Cros et al., 2010; Hofer et al., 2015) distincte du lignage des cDC (van Leeuwen-Kerkhoff et al., 2017).

Ces résultats sont également confortés par l'analyse fonctionnelle montrant que les Slan-DC sont peu efficaces dans la cross-présentation contrairement aux DC classiques (Cros et al., 2010; van Leeuwen-Kerkhoff et al., 2017). De plus, les Slan-DC n'expriment pas CCR7 (Toma et al., 2015) et présentent une morphologie de macrophage dans les tissus (Ogino et al., 2013). Ces observations suggèrent que les Slan-DC pourraient être un sous-type monocytaire spécialisé plutôt que des mo-DC.

F. Distribution des mo-DC humaines

1. Les mo-DC dans les muqueuses

Plusieurs études ont identifié dans les poumons ou le lavage broncho-alvéolaire (BAL) d'individus sains une population de cellules exprimant CD14, CD1c, CD1a et CD206. De plus, les analyses transcriptomiques indiquent que ces cellules expriment aussi IRF4, CCR2 (Baharom et al., 2016; Desch et al., 2016), CD11b et/ou CCR7 (Patel et al., 2017b) (**Tableau 4**). Ces résultats suggèrent donc que des mo-DC sont présentes dans les poumons en l'absence d'inflammation.

Les cellules CD14^{low}CD206⁺ CD1c⁺ CD1a⁺ FcεRI⁺ CD11b⁺ peuvent également être trouvées dans le péritoine chez des patients, avec ou sans péritonite induite par dialyse (Liao et al., 2017). Ces cellules expriment CCR2, IRF4 et augmentent l'expression CCR7 une fois activées (Liao et al., 2017), suggérant qu'il s'agit de mo-DC.

Trois populations principales de DC ont été identifiées dans l'intestin grêle, dont une population CD1c⁺ CD11b⁺ chez les patients présentant une muqueuse hyperémique (c'est-à-dire avec une augmentation des rougeurs et du flux sanguin, compatible avec l'inflammation) (Watchmaker et al., 2014). L'analyse transcriptomique montre que cette population est plus proche des monocytes sanguins que des DC classiques du sang, suggérant que ce sont des mo-DC. Enfin, la présence de mo-DC dans la peau humaine en l'absence d'inflammation reste encore déterminer. Toutefois, il a été proposé que les CD14⁺ DC dermales pourraient être des mo-DC et elles présentent également un profil transcriptomique proche des monocytes sanguins (Haniffa et al., 2009, 2012). Cependant, cette population peut être hétérogène et une grande partie d'entre elles sont des macrophages dérivés de monocytes (McGovern et al., 2014).

2. Les mo-DC humaines et l'environnement tumoral

Plusieurs études chez la souris ont montré que les monocytes circulants sont recrutés dans les tumeurs et peuvent se différencier en mo-DC au niveau du site tumoral (Qian et al., 2011; Shand et al., 2014). Par analogie, il est possible que les tumeurs chez l'homme contiennent des mo-DC inflammatoires dans l'infiltrat myéloïde. La présence de cellules BDCA1⁺ CD14⁺ CD11b⁺ dans des tumeurs colorectales et pulmonaires a permis d'identifier la présence de mo-DC dans l'environnement tumoral (Laoui et al., 2016). Des cellules CD14⁺ CD1c⁺, qui sont probablement des mo-DC, ont également été observées par histologie dans les lésions cutanées du mélanome et les métastases du côlon (Bakdash et al., 2016). Enfin, une analyse par Single cell RNA-seq des adénocarcinomes pulmonaires a montré que certaines CD1c⁺ DC expriment aussi des marqueurs de monocytes / macrophages (CD14, CCR2, CD206, CD64, CD11b), suggérant qu'il s'agit de DC dérivées de monocytes (Lavin et al., 2017) (**Tableau 4**).

3. Les mo-DC humaines dans le sang

Des mo-DC humaines ont été identifiées dans divers tissus (**Tableau 4**), mais la présence de mo-DC circulantes dans le sang reste incertaine. Toutefois, des études montrent la présence de cellules CD14⁺ CD1c⁺ CD11b⁺ dans le sang, qui n'expriment ni CD206, ni CD1a (Bakdash et al., 2016). Cette population est plus élevée dans le sang des patients atteints de mélanome par rapport aux donneurs sains. L'analyse transcriptomique comparative a montré que cette population est étroitement apparentée aux monocytes, mais il n'est pas clair s'il s'agit d'une sous-population de monocytes ou de DC dérivées de monocytes.

De plus, l'analyse par Single cell RNA-seq a montré que les CD1c⁺ DC du sang comprennent deux sous-groupes distincts, dont l'un est défini comme «inflammatoire» (Villani et al., 2017). Ces CD1c⁺ DC «inflammatoires» expriment l'ARNm de CD14, mais pas la protéine à la surface cellulaire. Elles peuvent être distinguées de l'autre sous-groupe CD1c⁺ DC par l'expression de CD163 et CD36. Bien qu'elles soient appelées «inflammatoires», ces cellules sont plus proches des DC classiques que des monocytes, et sont très probablement dérivées de pré-DC. Les propriétés de ces deux populations de CD1c⁺ DC doivent être mieux caractérisées.

Tableau 4 : Distribution des mo-DC dans les tissus humains

Tissus	Condition	Références
BAL	Normal	(Baharom et al., 2016) 14/03/2018 15:01:00
BAL	Normal	(Patel et al., 2017b)
Tumeur colorectale	Cancer	(Laoui et al., 2016)
Intestin	Normal	(Watchmaker et al., 2014)
Poumon	Normal	(Desch et al., 2016)
Cancer du poumon	Cancer	(Laoui et al., 2016)
Cancer du poumon	Cancer	(Lavin et al., 2017)
Mélanome	Cancer	(Bakdash et al., 2016)n}
Muqueuse nasale	Rhinite allergique	(Eguíluz-Gracia et al., 2016)
Péritoine	Normal	(Liao et al., 2017)
Péritoine	Péritonite	(Liao et al., 2017)
Péritoine	Ascite tumorale	(Segura et al., 2013b)
Peau	Dermatite atopique	(Wollenberg et al., 1996)
Peau	Psoriasis	(Wollenberg et al., 2002) (Zaba et al., 2009)
Liquide synovial	Polyarthrite rhumatoïde	(Segura et al., 2013b)

4. Propriétés fonctionnelles des mo-DC humaines

Ex vivo, il a été montré que les mo-DC humaines activent efficacement les cellules T CD4 et CD8 (Liao et al., 2017; Segura et al., 2013b; Zaba et al., 2009). Les mo-DC péritonéales sécrètent de l'IL-6, du TNF α , de l'IL1-b et de l'IL-12p70 lors d'une restimulation ex vivo (Liao et al., 2017). Des mo-DC de BAL sécrètent également du TNF α une fois qu'elles sont restimulées, mais leur capacité à sécréter d'autres cytokines n'a pas été rapportée (Baharom et al., 2016). En revanche, les mo-DC inflammatoires présentes dans des ascites tumorales sécrètent de l'IL-6, du TNF-a, et de l'IL1-b sans qu'il soit nécessaire de les restimuler ex vivo, ce qui suggère que les mo-DC sont déjà activés in situ par l'environnement inflammatoire des ascites. Les mo-DC issues d'ascites sécrètent également IL-12p70 et IL-23 lors d'une restimulation ex vivo (Segura et al., 2013b).

En accord avec leur capacité à produire de l'IL-23, les mo-DC inflammatoires des ascites tumorales et du liquide synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde sont des inducteurs puissants de la polarisation Th17 ex vivo (Segura et al., 2013b). Les mo-DC inflammatoires de la peau des patients atteints de psoriasis induisent également une polarisation Th17 ex vivo (Zaba et al., 2009). Les cellules Th17 jouant un rôle majeur dans les lésions tissulaires dans ces maladies, ces résultats suggèrent que les mo-DC inflammatoires pourraient être impliquées dans la pathogenèse en alimentant l'inflammation. Néanmoins, les propriétés des mo-DC inflammatoires seront probablement influencées par leur microenvironnement, et leur capacité de polarisation des lymphocytes T peut être différente selon les pathologies (**Figure 16**).

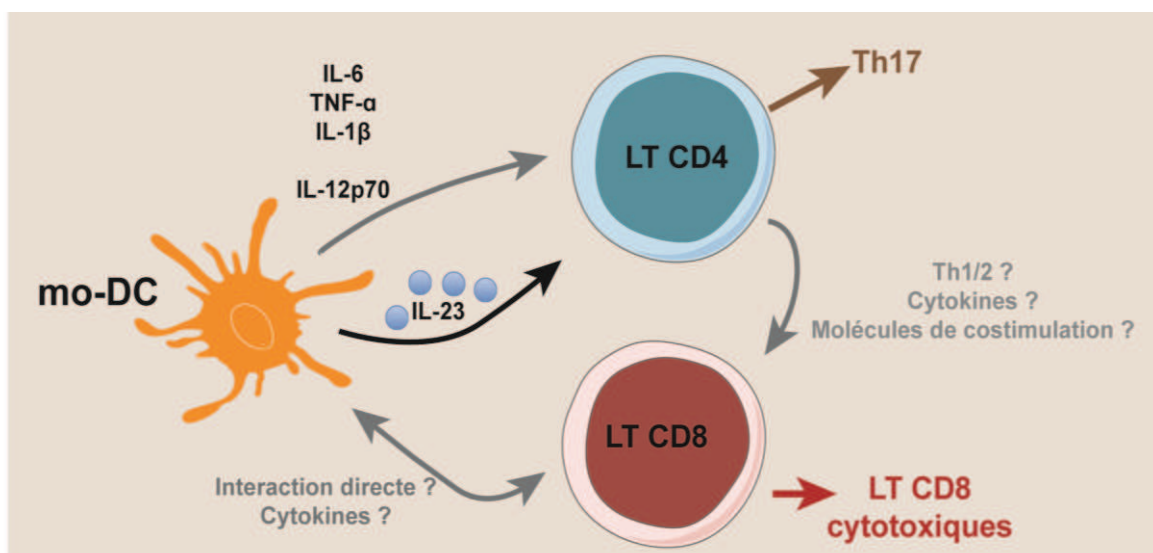


Figure 16 : Fonctionnalité des mo-DC. La sécrétion d'IL-23 par les mo-DC induit la différenciation des LT CD4 en Th17. Les mo-DC induisent des LT CD8 cytotoxiques et cette induction est dépendante des lymphocytes T CD4. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction des LT CD8 cytotoxiques sont encore inconnus.

OBJECTIFS

La cross-présentation est essentielle pour l'induction des cellules T CD8 + cytotoxiques efficaces contre les infections ou le cancer. De nombreuses études chez la souris ont montré que la cross-présentation est réalisée par des cellules dendritiques (DC), certaines sous-populations de DC étant plus efficaces que d'autres. En revanche, les cDC humaines ont toutes les mêmes capacités à cross-présenter, mais la capacité des mo-DC humaines à cross-présenter n'a pas encore été caractérisée.

Deux voies principales pour la cross-présentation ont été décrites. Dans la «voie cytosolique», les antigènes exogènes sont transférés des compartiments endocytaires dans le cytosol, où ils sont dégradés par le protéasome. Dans la «voie vacuolaire», les antigènes internalisés sont dégradés dans les compartiments endocytaires par les protéases lysosomales. Le laboratoire a montré que les cDC1, cDC2 et pDC des organes lymphoïdes humains transfèrent efficacement des protéines exogènes dans leur cytosol, et peuvent donc cross-présenter en utilisant la voie cytosolique. Des études ont montré que la voie vacuolaire existe chez l'homme, mais sa pertinence physiologique reste peu claire. Chez la souris, il a été montré que les mo-DC, dans un contexte inflammatoire, utilisent la voie vacuolaire pour la cross-présentation. Nous avons donc voulu déterminer si les mo-DC humaines, dans un contexte inflammatoire et tumoral, ont la capacité de cross-présenter et quelle voie elles utilisent.

Au cours de cette thèse, nous avons donc décidé dans un premier temps de déterminer si les mo-DC et mo-Mac humains sont capables de cross-présenter, puis nous avons cherché à identifier les mécanismes intracellulaires utilisés par les mo-DC pour la cross-présentation. Enfin, nous avons voulu déterminer si les mo-DC et mo-Mac induisent une réponse CTL.

RÉSULTATS

Human naturally-occurring monocyte-derived dendritic cells cross-present antigens exclusively through a vacuolar pathway

Authors: Tsing-Lee Tang-Huau^{1,2}, Paul Gueguen¹, Christel Goudot¹, Mylène Bohec³, Sylvain Baulande³, Benoît Pasquier², Sebastian Amigorena¹, Elodie Segura^{1*}.

Affiliations:

¹ Institut Curie, PSL Research University, INSERM, U932, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

² Sanofi, Breakthrough Laboratory, 1 impasse des ateliers, 94400 Vitry-sur-Seine, France

³ Institut Curie, PSL Research University, NGS platform, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

*Correspondence to: elodie.segura@curie.fr

Abstract

The presentation of exogenous antigens on MHC class I molecules, termed cross-presentation, is essential for the induction of cytotoxic CD8⁺ T cells. In mouse, dendritic cells (DC) that arise from monocytes (mo-DC) during inflammation play a key role in cytotoxic T cell responses by cross-presenting antigens directly in peripheral tissues. Whether human naturally-occurring mo-DC can cross-present is unknown. To address this question, we have used human mo-DC directly purified from peritoneal tumor ascites. Using single-cell RNA-seq, we first confirm that ascites DC contain exclusively monocyte-derived cells. Both ascites mo-DC and macrophages cross-present efficiently, but are unable to transfer exogenous proteins into their cytosol. Inhibition of cysteine proteases, but not of proteasome, abolishes cross-presentation by mo-DC. We conclude that human monocyte-derived cells cross-present exclusively using a vacuolar pathway. Finally, we demonstrate that only ascites mo-DC, but not macrophages, efficiently

induce effector cytotoxic CD8⁺ T cells. These results will have important implications for harnessing cross-presentation for therapeutic purposes.

Introduction

Cross-presentation is essential for the induction of cytotoxic CD8⁺ T cells and efficient immune responses against infections or cancer ¹. Numerous studies in mice have shown that cross-presentation is performed by dendritic cells (DC). DC can be classified into 4 subsets based on ontogeny ². “Classical” Batf3-dependent DC1 (cDC1), “classical” Batf3-independent DC2 (cDC2) and plasmacytoid DC (pDC) derive from pre-committed bone marrow precursors. Monocyte-derived DC (mo-DC) arise from monocytes recruited into tissues, and become the most abundant DC population during inflammation. In mice, cross-presentation is mainly performed by cDC1 in lymphoid organs ^{1,3}, but mo-DC have the unique ability to cross-present antigens to CD8⁺ T cells directly in peripheral tissues ⁴⁻⁶. Cross-presentation by mo-DC has a crucial role in the rapid activation of tissue-resident memory CD8⁺ T cells upon infection ⁴ and in the efficacy of anti-tumoral treatments based on immunostimulatory agents or chemotherapy ^{5,7}. Harnessing the cross-presentation capacity of mo-DC for therapeutic intervention is therefore an attractive prospect. However, determining whether human mo-DC that arise in tissues can cross-present, and the molecular mechanisms involved, will be a prerequisite.

We and others have shown that the functional specialization for cross-presentation is not conserved between mouse and human DC subsets. In contrast to mouse DC, human cDC1, cDC2 and pDC all have a similar ability to cross-present antigens ⁸⁻¹¹. Human mo-DC generated *in vitro* from monocytes cultured with GM-CSF and IL-4 can cross-present, and have long been used as a model to understand the biology of cross-presentation, however this culture system gives rise to DC that do not closely resemble naturally-occurring mo-DC found *in vivo* in inflammatory fluids ¹². Therefore, the cross-presentation ability of human mo-DC remains unclear. Here we

addressed this question using human *in vivo*-generated mo-DC, directly isolated from peritoneal ascites from cancer patients ^{12,13}.

Results

Tumor ascites DC are monocyte-derived cells

Based on phenotype and gene expression analysis, we have identified the DC population found in tumor ascites as naturally-occurring mo-DC ^{12,13}. Because of the sensitivity of the functional assay for cross-presentation, a minor population of cDC within ascites DC could bias the results. Therefore, we first sought to address the heterogeneity of ascites DC using single-cell RNA-seq analysis. Purified ascites DC (HLA-DR⁺CD11c⁺CD1c⁺CD16⁻) and ascites macrophages (HLA-DR⁺CD11c⁺CD1c⁻CD16⁺) were analysed using a droplet-based method enabling 3' mRNA counting ¹⁴. To increase the power of the analysis, we combined single-cell transcriptome data from ascites DC and ascites macrophages with that of blood CD14⁺ monocytes that we had previously generated with cells from two different blood donors ¹². To evaluate cellular heterogeneity, we clustered individual transcriptomes using a graph-based approach with the Seurat package ¹⁵. For visualization of the cell clusters, we used t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (*t*-SNE). Unsupervised clustering of the combined dataset identified 9 main clusters (fig.1A and fig.S1), with 3 clusters containing cells from the macrophage sample, 2 clusters from monocytes and 4 clusters from the DC sample (fig.1A-B). Monocyte clusters comprised mixed cells from both monocyte donors, but other clusters contained cells from only one sample origin, either DC or macrophages. Expression of selected genes was consistent with the sample origin of these clusters (fig.1C). To address the transcriptional similarity of these

different clusters with mo-DC or monocyte-derived macrophages (mo-Mac), we analysed the expression of signature genes for these two populations at the single-cell level (fig.1D-E). Gene signature for mo-DC was designed previously as genes preferentially expressed in ascites DC versus monocytes, in ascites DC versus ascites macrophages and in *in vitro*-derived mo-DC versus *in vitro*-derived mo-Mac (and vice-versa for mo-Mac gene signature) ¹². Clusters Mac1 and Mac2 had the highest expression of mo-Mac signature, while clusters DC2 and DC3 had the highest expression of mo-DC signature. Overall, these results show that ascites DC and ascites macrophages are distinct populations, and comprise groups of cells with slightly different gene expression patterns.

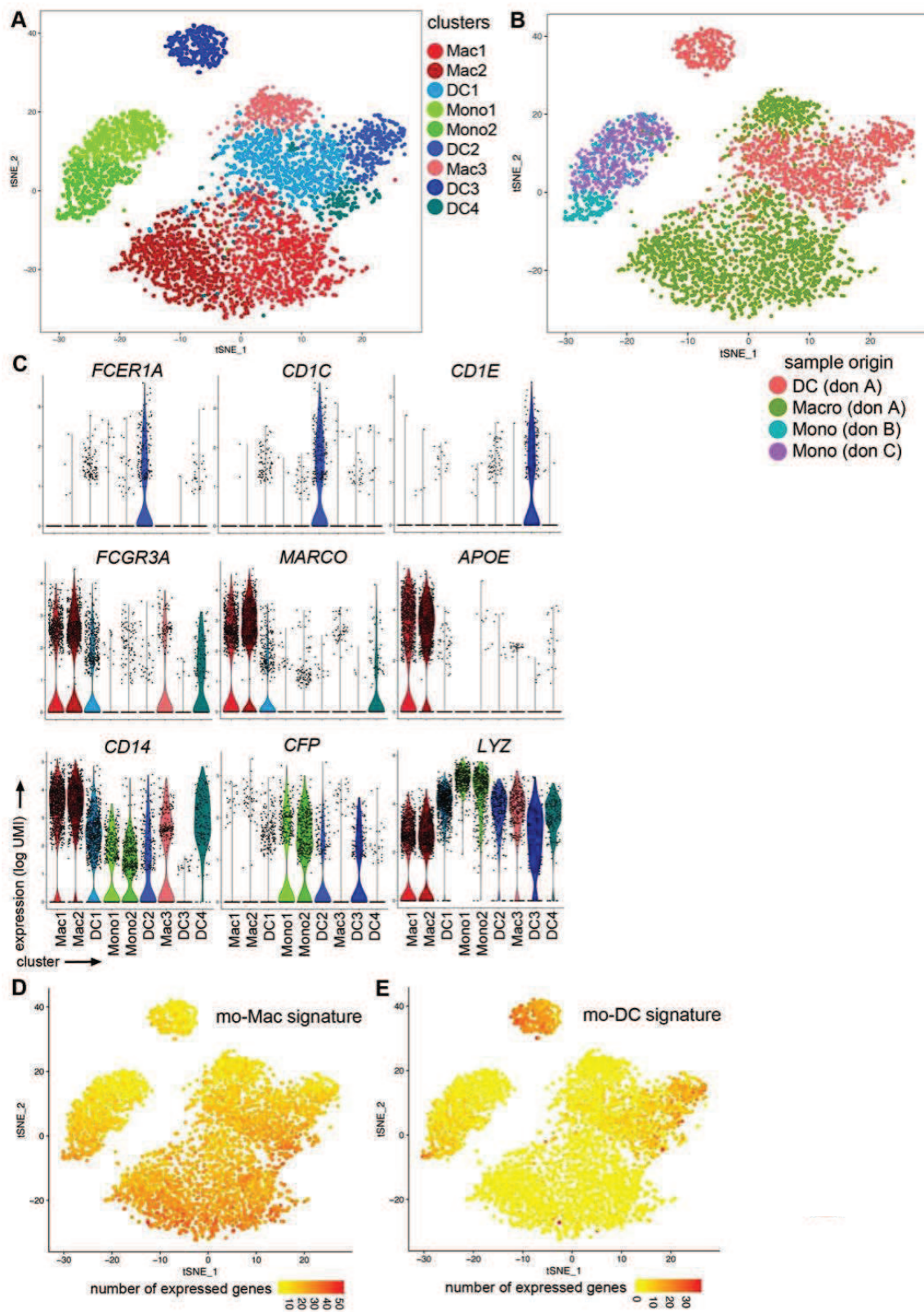


Figure 1. Ascites DC and macrophages are distinct populations. Purified DC and macrophages from tumor ascites and monocytes from blood were analyzed by single-cell RNA-seq using a Drop-seq approach. Combined single-cell transcriptomes were analyzed. (A) *t*-SNE analysis. Colors represent unbiased clustering from graph-based clustering. Clusters are ordered based on cell numbers. Each dot represents an individual cell. (B) Colors represent sample origin (don = donor). Each dot represents an individual cell. (C) Expression of selected genes across the different clusters. (D-E) For each cell, the number of detected genes from the mo-Mac (D) or mo-DC (E) signature is depicted.

This analysis of cells directly purified from an inflammatory fluid represents a snapshot of gene expression during a process that is highly dynamic. It is therefore possible that we detect unsynchronized gene expression, and that the clusters represent intermediate stages of development on the differentiation pathway from monocytes to mo-DC or mo-Mac. To test this hypothesis, we analysed single-cell developmental trajectories in an unsupervised manner using Monocle2¹⁶. This algorithm orders single cells along a biological trajectory, termed pseudotime, using advanced machine learning techniques (Reversed Graph Embedding). To generate the developmental trajectory, we used as input the top 30 expressed genes of each cluster, and set the monocytes as the root for the tree structure of the trajectory. Pseudotime-trajectory reconstruction identified a single branch point representing significant divergence in single-cell transcriptomes, corresponding to two possible outcomes (fig.2A, branches A and B). Macrophages aligned in their majority along branch A while DC aligned mostly along branch B (fig.2A), consistent with the idea that individual monocytes implement two alternative gene

expression programs (DC versus macrophage). Some cells from clusters Mac3, DC1 and DC4 were scattered on the “pre-branch” or the alternative branch, suggesting asynchronous gene expression within the same cluster. To further characterize the two branches, we analyzed gene expression for the mo-DC and mo-Mac signatures for each branch, using branched expression analysis modeling (BEAM) from Monocle2 ¹⁶. Mo-Mac or mo-DC genes were expressed predominantly along branch A or B, respectively (fig.2B). BEAM also identified modules of genes that were expressed at different positions in pseudotime, including in the “pre-branch” mixed expression of mo-DC and mo-Mac genes. These results support the hypothesis that the clusters identified within ascites DC and ascites macrophages represent cells at different stages of development.

Collectively, these results show that ascites DC contain several populations of monocyte-derived cells, some of which are closer to monocytes than to DC. These cells therefore represent an appropriate tool to analyse the functional features of naturally-occurring human mo-DC.

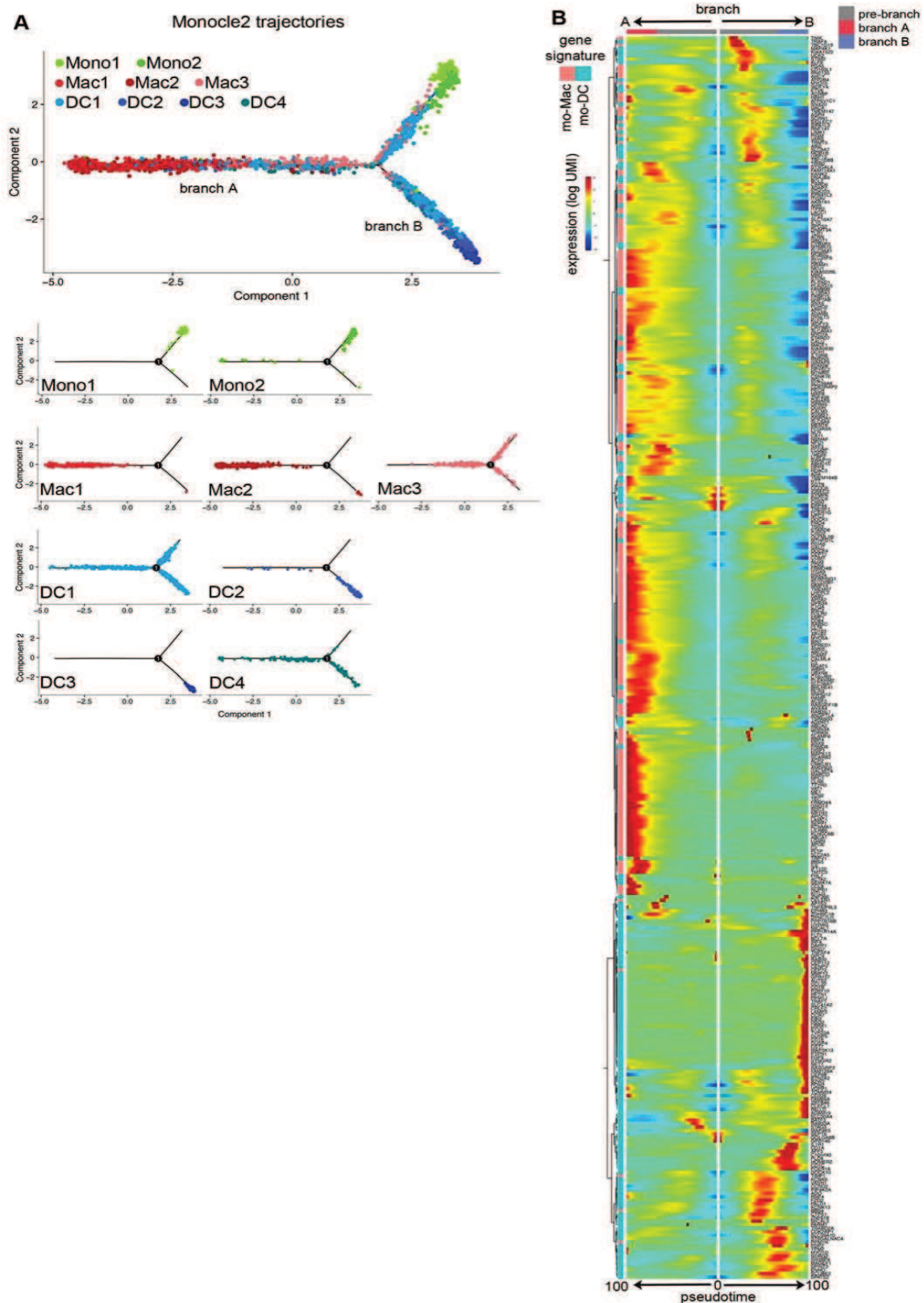


Figure 2. Ascites DC are monocyte-derived cells. Purified DC and macrophages from tumor ascites and monocytes from blood were analyzed by single-cell RNA-seq using a Drop-seq approach. (A)

Combined dataset was analyzed for single-cell trajectories and branch points by reversed graph embedding using Monocle 2. Cells were projected into a two-dimensional space. Alignment along the branches is shown for individual cells from each cluster. (B) Heatmap of branch-dependent expression for genes from the mo-DC and mo-Mac gene signatures. Columns represent points in pseudotime. Genes were clustered hierarchically according to the peak recorded time for expression.

Human mo-DC and mo-Mac can both efficiently cross-present antigens

To address whether ascites mo-DC can cross-present, we analyzed cross-presentation of a soluble antigen using a MelanA-specific CD8⁺ T cell clone. Ascites mo-DC, and mo-Mac for comparison, were incubated with a 34-aa long peptide (requiring processing for cross-presentation) or a pre-processed short peptide corresponding to the minimal epitope, as control for T cell activation ability (fig.3A). Ascites mo-DC and mo-Mac could both cross-present the MelanA antigen, with ascites mo-Mac being more efficient than mo-DC. Mo-Mac were also more efficient for presentation of the short peptide, suggesting a better ability for T cell activation, possibly due to greater MHC class I molecules expression. This finding was surprising because we have previously shown that tonsil macrophages are poor cross-presenting cells⁹. To assess whether the ability to cross-present was induced in macrophages by the ascites environment, we performed the same experiment using *in vitro* equivalents of these cells, obtained by culturing monocytes with M-CSF, IL-4 and TNF α ¹². *In vitro*-derived mo-DC and mo-Mac could both cross-present MelanA antigen (fig.3B). As an internal control for this assay, we used DC obtained by culturing blood CD34⁺ precursors with GM-CSF, Flt3-L and TNF α . CD1a⁺ DC could cross-present efficiently, in contrast to CD14⁺ DC, as previously reported^{9,17}. We conclude that mo-DC and mo-Mac can both cross-present antigens.

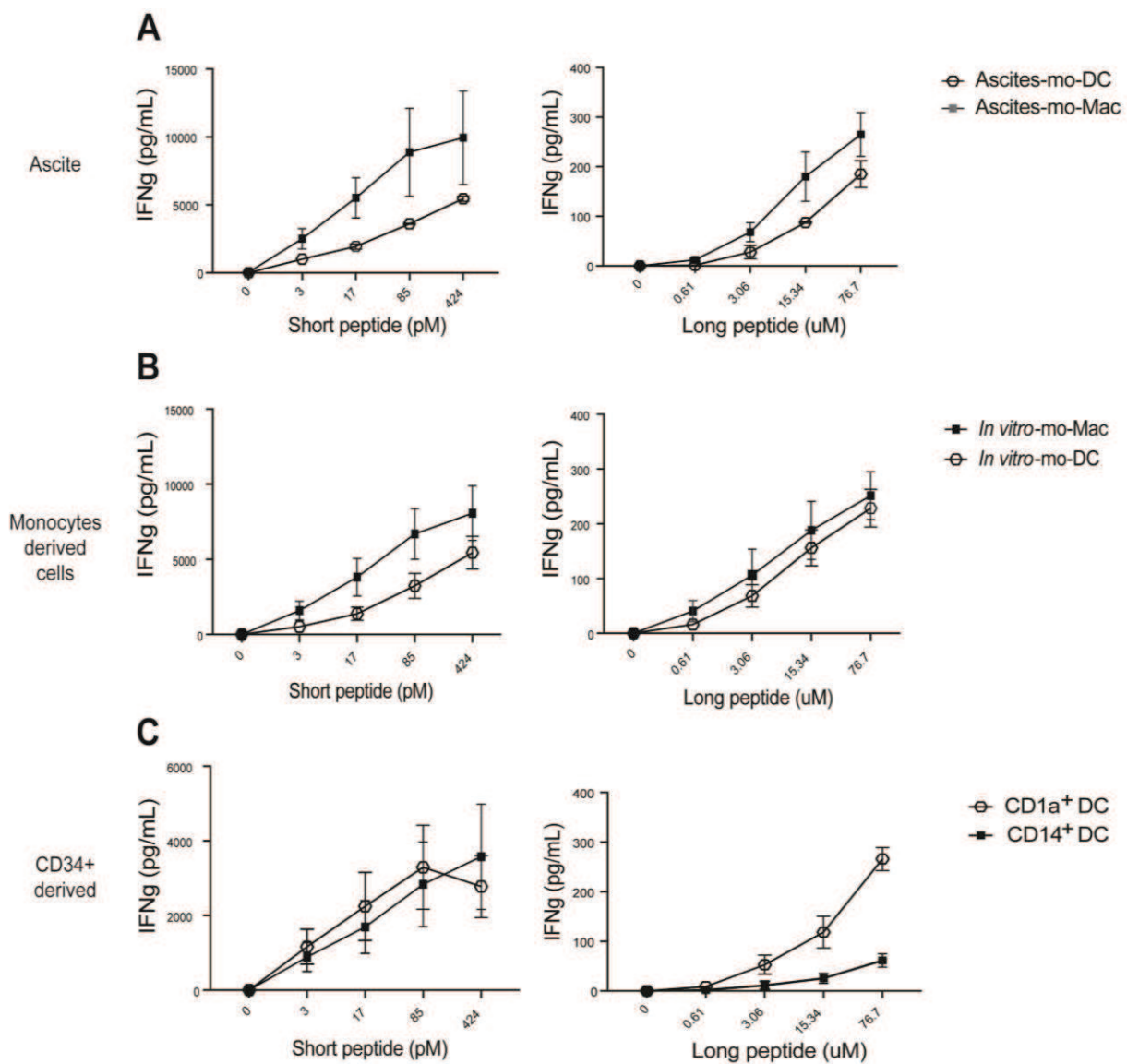


Figure 3. Human mo-DC and mo-Mac both cross-present efficiently. Purified DC and macrophages from tumor ascites (A), *in vitro* culture of monocytes (B) or of CD34⁺ precursors (C) were incubated with serial concentrations of MelanA long or short peptide. After washing, antigen-specific CD8⁺ T cells were added. After 24 h, IFN- γ secretion was assessed as a measure of T cell activation. Background level was subtracted. Mean \pm SEM of three (A and C) or six (B) independent experiments.

Human mo-DC and mo-Mac do not transfer exogenous proteins into their cytosol

Two main pathways have been described for cross-presentation^{1,3}. In the “cytosolic pathway”, exogenous antigens are transferred from endocytic compartments into the cytosol, where they are degraded by the proteasome. In the “vacuolar pathway”, internalized antigens are degraded in endocytic compartments by lysosomal proteases. To address the intracellular pathway used by mo-DC and mo-Mac for cross-presentation, we first analysed their ability to transfer exogenous β -lactamase into their cytosol by measuring the cleavage of a cytosolic β -lactamase-sensitive FRET probe^{9,18}. Transfer of β -lactamase was inefficient in ascites mo-DC and mo-Mac (fig.4A-B). This was not due to the tumor ascites micro-environment, as the same was found for *in vitro*-differentiated mo-DC and mo-Mac (fig.4A-B), nor to deficient uptake of β -lactamase, as all populations could efficiently internalize fluorescent β -lactamase (fig.4C). By contrast, CD1a⁺ DC could transfer exogenous β -lactamase into their cytosol, but not CD14⁺ DC, as previously reported⁹ (fig.4A-B). These results suggest that human mo-DC and mo-Mac do not use the cytosolic pathway for cross-presentation.

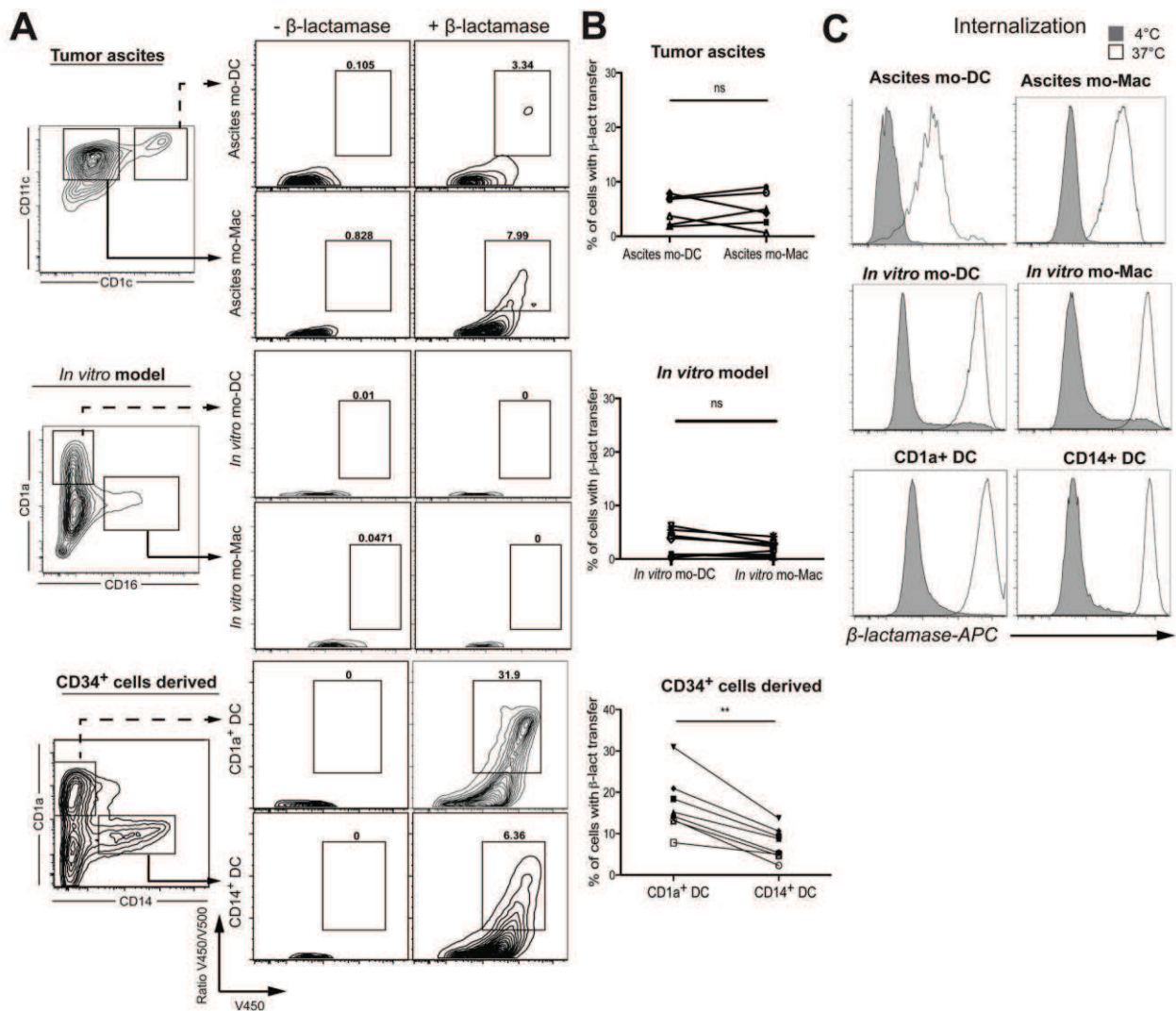


Figure 4. Human mo-DC and mo-Mac do not transfer exogenous proteins into their cytosol. (A-B) Purified DC and macrophages from tumor ascites, derived *in vitro* from monocytes or DC derived *in vitro* from CD34⁺ precursors were loaded with a cell-permeable FRET-sensitive substrate of β -lactamase, and incubated with or without exogenous β -lactamase. After 3h, cleavage was measured by flow cytometry. (A) Representative results of six (tumor ascites) or eight (*in vitro* models) independent experiments. (B) Quantification of β -lactamase transfer. Symbols represent individual donors. ** $p < 0.05$, Wilcoxon non-parametric test. (C) Purified DC or macrophages were incubated with β -lactamase coupled to Atto dye 633 at 4°C or 37°C during 3h. Representative results of three independent experiments.

Human mo-DC use the vacuolar pathway for cross-presentation

To confirm this finding, we analysed cross-presentation by mo-DC in the presence of a proteasome inhibitor, lactacystin (fig. 5A). We have previously shown that lactacystin abolishes cross-presentation by CD1a⁺ DC⁹. By contrast, cross-presentation by mo-DC was not impaired in the presence of lactacystin (fig.5A), showing that proteasome activity was dispensable for cross-presentation. To directly assess the role of the vacuolar pathway, we used a pan-cathepsin inhibitor to block the activity of lysosomal cysteine proteases (fig.5B). In this condition, cross-presentation by mo-DC was severely impaired, showing that antigens are degraded by lysosomal proteases for cross-presentation.

Collectively, these results show that human monocyte-derived cells use exclusively the vacuolar pathway for cross-presentation.

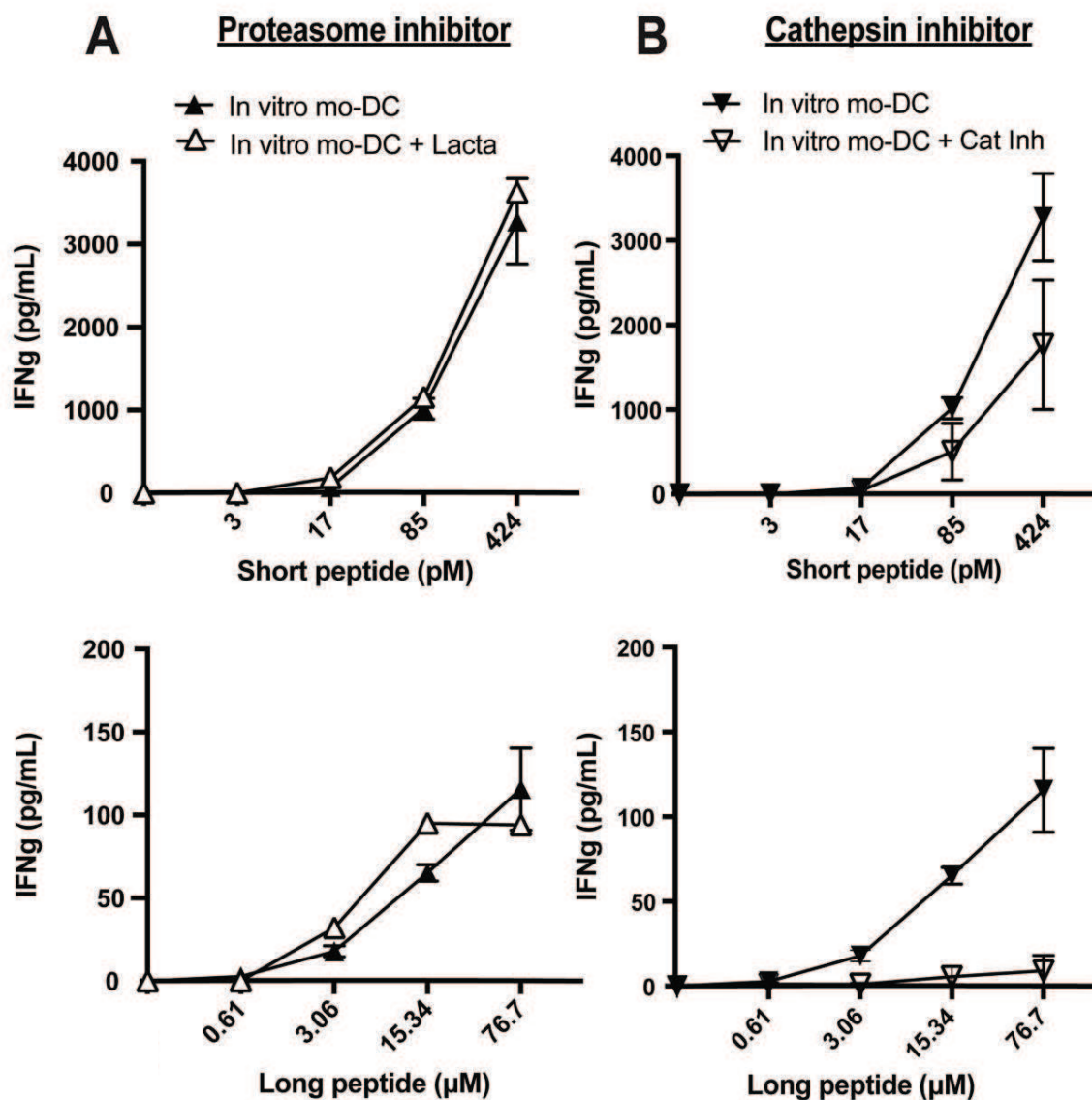


Figure 5. Human mo-DC use the vacuolar pathway for cross-presentation. (A) Purified *in vitro*-generated mo-DC were incubated with serial concentrations of MelanA long or short peptide, in the absence or presence of lactacystin (Lacta) or pan-cathepsin inhibitor (Cat Inh). After washing, antigen-specific CD8⁺ T cells were added. After 24 h, IFN- γ secretion was assessed as a measure of T cell activation. Background level was subtracted. Mean \pm SEM of three (A) or two (B) independent experiments.

Only mo-DC are efficient inducers of cytotoxic CD8⁺ T cells

Finally, to address the outcome of cross-presentation, we analyzed the ability of ascites mo-DC and mo-Mac to induce the differentiation of cytotoxic CD8⁺ T cells. We co-cultured purified mo-DC or mo-Mac with allogeneic naïve CD8⁺ T cells and assessed T cell proliferation and expression of effector molecules (Granzyme A, Perforin and IFN γ). As reported previously¹⁰, we found that CD4⁺ T cells were indispensable for CD8⁺ T cell proliferation (fig.6A-B). When cultured with both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, only mo-DC could induce significant proliferation of CD8⁺ T cells and expression of Granzyme A, Perforin and IFN γ (fig.6C-D). To evaluate the efficiency of effector differentiation induced by mo-DC, we performed the same experiment with tonsil DC subsets. We purified cDC1, cDC2, pDC and tonsil macrophages⁹. cDC1 and cDC2 were the most efficient inducers of CD8⁺ T cell proliferation and effector differentiation, while macrophages and pDC were poor at it (fig.S2). Overall, proliferation and induction of effector molecules were comparable between cDC1, cDC2 and ascites mo-DC, suggesting that mo-DC are indeed efficient activators of cytotoxic CD8⁺ T cells.

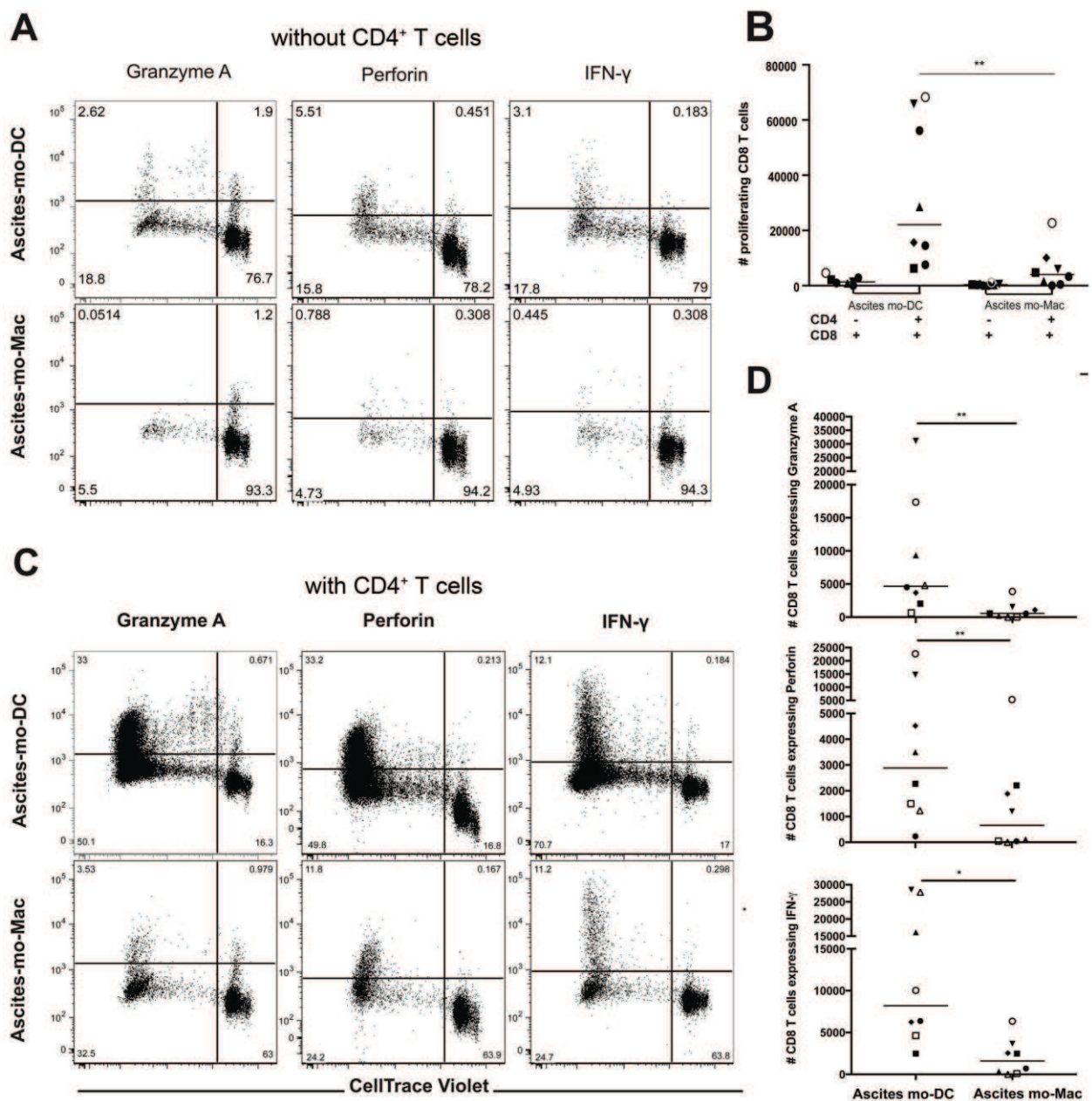


Figure 6. Human mo-DC, but not mo-Mac, are efficient inducers of effector cytotoxic CD8⁺ T

cells. Purified DC and macrophage from tumor ascites were cultured with allogeneic CellTrace Violet-stained naïve CD8⁺ T cells for 7 days, in the absence (A-B) or presence (B-D) of naïve CD4⁺ T cells autologous to CD8⁺ T cells. Expression of Granzyme A, Perforin and IFN-γ was assessed by intracellular flow cytometry. (A and C) Representative results of eight independent experiments. Gated on live CD8⁺ T cells. (B) Number of proliferating CD8⁺ T cells is shown. Symbols represent individual donors. Median is

shown. (D) Number of CD8⁺ T cells expressing effector molecules is shown. Symbols represent individual donors. Median is shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Wilcoxon non-parametric test.

Discussion

Here we show that human mo-DC and mo-Mac, both naturally-occurring *in vivo* in peritoneal ascites and generated *in vitro* from monocyte cultured with M-CSF, IL-4 and TNF α , cross-present exclusively using a vacuolar pathway. Numerous studies have shown that DC are the most efficient cross-presenting cells^{1,3}. However, mouse macrophages can cross-present *in vivo* in some settings^{19,20}. Here we found that macrophages from tumor ascites could cross-present efficiently. However, only ascites mo-DC induced cytotoxic CD8⁺ T cells.

Contradictory data exists on the pathway used for cross-presentation by *in vitro*-differentiated DC derived from monocytes using GM-CSF and IL-4, with some studies showing for the cross-presentation of soluble antigens a vacuolar pathway^{21,22} and others a cytosolic pathway²³⁻²⁶, while cross-presentation of cell-associated antigen was reported to be proteasome-dependent²⁷. The reasons for these discrepancies are not clear. Using a culture model that yields mo-DC closely resembling naturally-occurring mo-DC¹², we found that mo-DC were unable to transfer exogenous proteins into their cytosol, and use exclusively a vacuolar pathway for cross-presentation.

It has been proposed that the choice of cytosolic versus vacuolar pathway for cross-presentation is dictated by the form of antigen. Consistent with this, human pDC cross-present soluble and cell-associated antigens using a cytosolic pathway^{9,28}, but cross-presentation of viral antigens has been shown to be proteasome-independent and to use a vacuolar pathway²⁹. Furthermore, human cDC1 cross-present soluble antigens using a cytosolic pathway^{9,22,30}, but

cross-presentation of immune complexes is inhibited by both proteasome and lysosomal proteases inhibitors³¹. The possibility to use either pathway for cross-presentation may also be subset-specific. In support of this, the molecular requirements for cross-presentation are different between mouse cDC1 and mo-DC, both *in vivo* and *in vitro*^{32,33}. Our results extend these observations to human DC subsets.

Mouse cDC1 are recognized as the main cross-presenting cells^{1,3}. Mo-DC can also cross-present efficiently in various inflammatory settings^{4-7,32,34,35}. Accumulating evidence indicates that mo-DC play a key role in the induction and regulation of cytotoxic T cell responses, complementary to that of cDC1. In contrast to cDC1 which interact with CD8⁺ T cells in lymphoid organs, mo-DC are able to cross-present antigens and to stimulate effector CD8⁺ T cells directly *in situ*, in inflamed tissues⁴⁻⁶. In addition, mo-DC express high levels of co-stimulatory signals involved in the differentiation of cytotoxic CD8⁺ T cells, including CD70^{35,36}. Our results suggest that human naturally-occurring mo-DC are equipped for playing a similar role.

Enhancing cross-presentation represents a way of improving vaccination efficiency or anti-tumor immune responses. Deciphering cross-presentation in the human DC that are present *in vivo* is a pre-requisite for its manipulating for therapeutic purposes. By providing a better understanding of cross-presentation mechanisms in human DC subsets, our results should have important implications for the design of DC-targeted therapies.

Material and Methods

Human Samples. Buffy coats from healthy donors (both male and female donors) were obtained from Etablissement Français du Sang (Paris, France) in accordance with INSERM ethical

guidelines. Tumor ascites from ovarian cancer patients were obtained from Hôpital de l'Institut Curie in accordance with hospital guidelines. Tonsils from healthy patients undergoing tonsillectomy were obtained from Hôpital Necker (Paris, France). According to French Public Health Law (art L 1121-1-1, art L 1121-1-2), written consent and IRB approval are not required for human non-interventional studies.

Cell isolation. Tonsil samples were digested as described previously ³⁷. In brief, samples were cut into small fragments, digested with 0.1 mg/mL Liberase TL (Roche) in the presence of 0.1 mg/mL DNase (Roche) for 40 minutes at room temperature before addition of 10 mM EDTA. Cells were filtered on a 40 µm cell strainer (BD Falcon) and washed. Light density cells were isolated by centrifugation on a Ficoll gradient (Lymphoprep, Greiner Bio-One). DCs were enriched by depletion of cells expressing CD3, CD15, CD19, CD56 and CD235a using antibody-coated magnetic beads (Miltenyi). Cell subsets were further isolated by cell sorting on a FACS Aria instrument (BD Biosciences). Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were prepared by centrifugation on a Ficoll gradient. Blood CD14⁺ monocytes were isolated from healthy donors' PBMC by positive selection using anti-CD14-coated magnetic beads according to manufacturer's instructions (Miltenyi). Cell populations from ascites were isolated after centrifugation on a Ficoll gradient, enrichment by depletion of cells expressing CD3, CD15, CD19, CD56 and CD235a using antibody-coated magnetic beads and cell sorting on a FACS Aria instrument.

Cell culture. Blood CD34⁺ cells were isolated from PBMC by positive selection using anti-CD34-coated magnetic beads and magnetic columns according to manufacturer's instructions (Miltenyi). CD34⁺ cells were cultured for 9-10 days in Yssel medium supplemented with 10%

foetal calf serum (FCS), penicillin/streptomycin and 50 ng/mL GM-CSF (Miltenyi), 100 ng/mL Flt3-L (Miltenyi) and 10 ng/mL TNF α (Miltenyi). DC subsets were isolated by cell sorting on a FACS Aria instrument (BD Biosciences) after staining for CD1a and CD14. Monocytes (1×10^6 cells/mL) were cultured for 5 days in RPMI-Glutamax medium (Gibco) supplemented with antibiotics (penicillin and streptomycin) and 10% FCS in the presence or absence of 100 ng/mL M-CSF (Miltenyi), 40 ng/mL IL-4 (Miltenyi) and 5 ng/mL TNF α (Miltenyi). Cell populations were isolated by cell sorting on a FACS Aria instrument after staining for CD1a and CD16.

Flow cytometry. Non-specific binding was blocked using TruStain (Biolegend). Unless otherwise stated, cell viability was assessed using DAPI (Sigma). Cells were stained with FITC anti-CD16 (BD Bioscience), APC anti-CD1a (BioLegend), FITC anti-CD14 (eBioscience), PerCP/Cy5.5 anti-CD1c (BioLegend), APC-eFluor780 anti-HLA-DR (eBioscience), Pe/Cy7 anti-CD11c (BioLegend), APC anti-CD123 (Miltenyi Biotec), PE anti-BDCA3 (Miltenyi Biotec), PE anti-HLAA2 (BD), FITC anti-TCR Vbeta2 (Beckman coulter), Alexa Fluor 488 anti-Granzyme A (BioLegend), PE/Cy7 anti-IFN γ (eBioscience), PerCP/Cy5.5 anti-CD8 (BioLegend), APC anti-CD4 (BioLegend), PE anti-Perforin (BioLegend). Cells were analyzed on a FACSVerse instrument (BD Biosciences).

Cytosolic translocation assay. Cells were incubated with 0.5 μ g/mL CCF4-AM (Invitrogen) for 30 min at room temperature in loading buffer (120mM NaCl, 7mM KCl, 1,8mM CaCl₂, 0,8mM MgCl₂, 5mM glucose, 25mM Hepes pH 7.3) containing solution B (dilution 1/20, LiveBLazer FRET-B/G loading kit, Invitrogen) and 1mM probenidicid (Invitrogen). After washing, cells were incubated in loading buffer containing 1mM probenidicid in the presence or absence of β -lactamase (Penicillinase from *Bacillus cereus*, Sigma) for 3 hours at 4°C or 37°C. Cell viability was assessed using Fixable Viability Dye eFluor780 (eBioscience). After washing, cells were analyzed

on a FACS Verse Instrument (BD Biosciences) by measuring the 450 nm and 520 nm fluorescence channels.

Internalisation assay. β -lactamase was conjugated to Atto dye 633 according to manufacturer's instructions (Sigma). Cells were incubated with fluorescent β -lactamase in Yssel medium at 4°C or 37°C for 3h. After extensive washing, cells were analyzed a FACS Verse Instrument.

Cross-presentation assay. Purified HLA-A2⁺ antigen-presenting cells (APC) were incubated (10^4 cells/well) in V-bottom 96 wells plates (Corning) with different concentrations of MelanA long peptide (KGGHGSYTTAEEAAGIGILTVILGVL), MelanA short peptide (EAAGIGILTV) or different numbers of necrotic Mel888 cells for 3-4 hours in Yssel medium, in the presence or absence of 2.5 μ g/mL lactacystin (clasto-Lactacystin β -Lactone ; Merck/Millipore) or 10 μ M Cathepsin Inhibitor I (inhibiting cathepsin B, cathepsin L, cathepsin S and papain; Calbiochem). After extensive washing, APC were cultured for 24 hours with CD8 T cell LT12 clones ³⁸ (2×10^4 cells/well) in Yssel medium supplemented with 10% FCS. Supernatants were collected and kept at -20°C until measurement of IFN- γ concentration by ELISA (BD Biosciences). Background levels (APC cultured with LT12 cells without peptide) was subtracted for each cell type.

Cytotoxic T lymphocyte polarisation assay. Naive CD8⁺ T cells and CD4⁺ T cells were isolated from healthy donors' PBMC using EasySep human Naïve CD8 or CD4 isolation kit according to manufacturer's instructions (StemCell Technologies). Antigen-presenting cells (1×10^4 cells/well) were cultured with naive CD8⁺ T cells (5×10^4 cells/well) with or without naive CD4⁺ T cells from the same T cell donor (5×10^4 cells/well) for 7 days in Yssel medium supplemented with 10% FCS. To analyze T cell proliferation, CD8⁺ T cells were stained with CTV (Cell Trace Violet, Thermofisher) prior to culture. To assess the expression of intracellular effector molecules, T

cells were stimulated with PMA (50ng/ml) and ionomycin (1µg/ml) for 6h in presence of BFA (4µg/ml) for 6h (all from Sigma). After washing, cells were stained for surface CD4 for 30 min at 4°C, washed and stained with Live/dead eFluor780 (Thermo Fisher Scientific) for 20 min at 4°C. Then the cells were fixed and permeabilized (Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, eBioscience) and stained for intracellular proteins (Granzyme A, Perforin and IFN- γ) at room temperature for 45 min in a buffer containing 2% of normal mouse serum. The samples were acquired on a FACS Verse instrument (BD Biosciences).

Single cell RNA-seq library preparation. Cellular suspension (3500 cells) of cell-sorted ascites DC or ascites macrophages was loaded on a 10X Chromium instrument (10X Genomics) according to manufacturer's protocol based on the 10X GEMCode proprietary technology. Single-cell RNA-Seq libraries were prepared using Chromium Single Cell 3' v2 Reagent Kit (10X Genomics) according to manufacturer's protocol. Briefly, the initial step consisted in performing an emulsion where individual cells were isolated into droplets together with gel beads coated with unique primers bearing 10X cell barcodes, UMI (unique molecular identifiers) and poly(dT) sequences. Reverse transcription reactions were engaged to generate barcoded full-length cDNA followed by the disruption of emulsions using the recovery agent and cDNA clean up with DynaBeads MyOne Silane Beads (Thermo Fisher Scientific). Bulk cDNA was amplified using a GeneAmp PCR System 9700 with 96-Well Gold Sample Block Module (Applied Biosystems) (98 °C for 3 min; cycled 14 × : 98 °C for 15 s, 67 °C for 20 s, and 72 °C for 1 min; 72 °C for 1 min; held at 4 °C). Amplified cDNA product was cleaned up with the SPRI select Reagent Kit (Beckman Coulter). Indexed sequencing libraries were constructed using the reagents from the Chromium Single Cell 3' v2 Reagent Kit, following these steps: (1) fragmentation, end repair and A-tailing;

(2) size selection with SPRI select; (3) adaptor ligation; (4) post ligation cleanup with SPRI select; (5) sample index PCR and cleanup with SPRI select beads. Library quantification and quality assessment was performed using Qubit fluorometric assay (Invitrogen) with dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit and Bioanalyzer Agilent 2100 using a High Sensitivity DNA chip (Agilent Genomics). Indexed libraries were equimolarly pooled and sequenced on an Illumina HiSeq2500 using paired-end 26x98bp as sequencing mode. Using a full Rapid flow cell, a coverage around 100M reads per sample were obtained corresponding to 100,000 reads/cell.

Single-cell RNA-seq data analysis. Single-cell expression was analyzed using the Cell Ranger Single Cell Software Suite (v2.0.1) to perform quality control, sample de-multiplexing, barcode processing, and single-cell 3' gene counting¹⁴. Sequencing reads were aligned to the UCSC hg38 transcriptome using the Cell Ranger suite with default parameters. A total of 5619 single cells were analyzed. Mean raw reads per cell were 55,344. Further analysis was performed in R (v3.3) using the Seurat package (v2.1.0)¹⁵. The gene-cell-barcode matrix of the samples was log-transformed and filtered based on the number of genes detected per cell (any cell with less than 400 genes or more than 3000 genes per cell was filtered out). Regression in gene expression was performed based on the number of unique molecular identifiers (UMI) and the percentage of mitochondrial genes. Only genes detected in at least 3 cells were included. Cells were then scaled to a total of 10^4 molecules. Any cell with more than 10% of mitochondrial UMI counts was filtered out. Altogether, 4707 cells were kept for statistical analysis. To reduce data dimensionality, 3755 variable genes were selected based on their expression and dispersion (expression cut-off = 0, and dispersion cut-off = 0.5). PCA was run on the normalized gene-barcode matrix. Barnes-hut approximation to *t*-SNE³⁹ was then performed on the first 15

principal components to visualize cells in a two-dimensional space. The first 15 principal components were used for the *t*-SNE projection and clustering analysis using the Elbow Plot approach. Clusters were identified using the “Find_Clusters” function in Seurat with a resolution parameter of 1.2. This graph-based clustering method relies on a clustering algorithm based on shared nearest neighbor (SNN) modularity optimization. Unique cluster-specific genes were identified by running the Seurat « Find_All_Markers » function using default parameters. Clusters containing less than 70 cells were removed. In addition, a cluster of 110 cells containing contaminating CD11c⁺ B lymphocytes was excluded from the analysis. Heatmaps and violin plots were plotted using Seurat. Monocyte, DC and macrophage clusters were ordered in pseudotime using the Monocle 2 package ¹⁶. For each cluster, the top 30 differentially expressed genes (identified by Seurat) was used as input for temporal ordering in Monocle 2.

Software and Statistical analysis

Flow cytometry data were analyzed using FlowJo software (Tree Star). Statistical analyses were performed using the Prism software v7 (GraphPad).

Author contributions. T-L.T-H, CG, BP, SA and ES designed experiments. T-L.T-H and MB performed experiments. T-L.T-H, PG and CG analyzed the data. T-L.T-H, PG and ES prepared the figures. SB provided expertise on sequencing. T-L.T-H and ES wrote the manuscript, with input from all authors. ES supervised the project.

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM, Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LABX-0043, ANR-CHIN-0002 and ANR-10-IDEX-0001-02 PSL), Institut Curie (CIC IGR-Curie 1428 and ICGex-2017), the European Research Council (2013-AdG N° 340046 DCBIOX), La Ligue Nationale contre le Cancer (EL2014.LNCC/SA). T-L.T-H is supported by an industry-funded PhD scholarship (CIFRE) at Université Paris Descartes (Paris V). PG is supported by a PhD fellowship from Ligue Nationale contre le Cancer at Université Paris Descartes (Paris V). High-throughput sequencing performed by the ICGex NGS platform of the Institut Curie was supported by grants ANR-10-EQPX-03 (Equipex) and ANR-10-INBS-09-08 (France Génomique Consortium), by Cancéropôle Ile-de-France, by SESAME program from Région Ile-de-France and by SiRIC-Curie program (SiRIC Grant «INCa-DGOS- 4654»).

The authors wish to thank the Flow Cytometry Platform of Institut Curie for cell sorting.

Supplementary figure legends

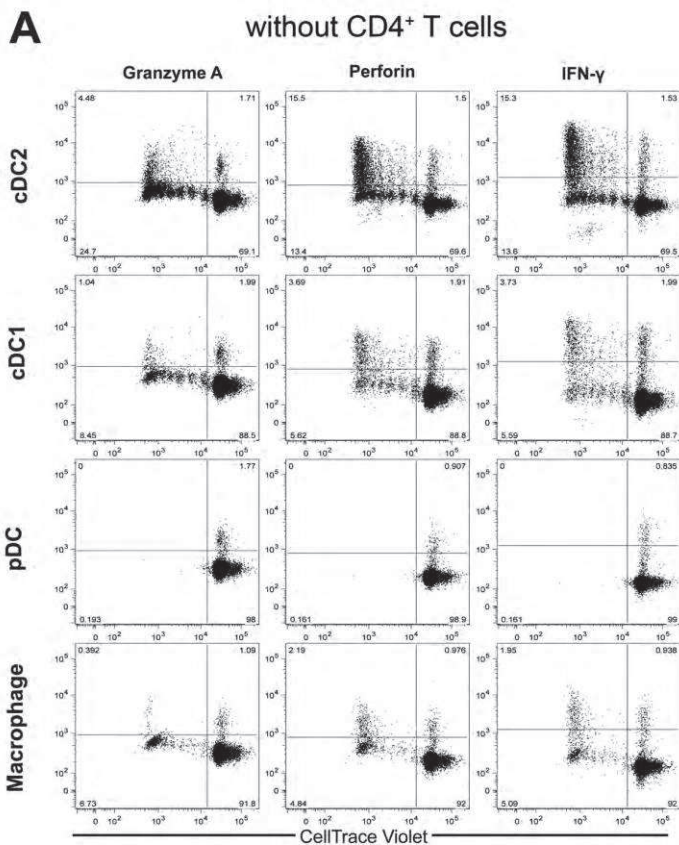


fig S2

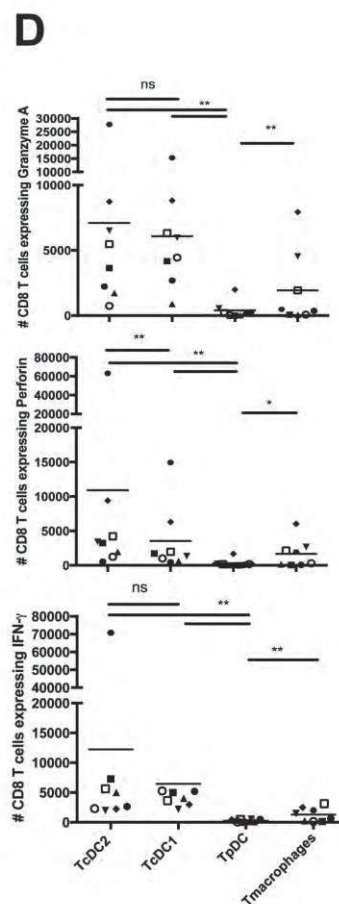
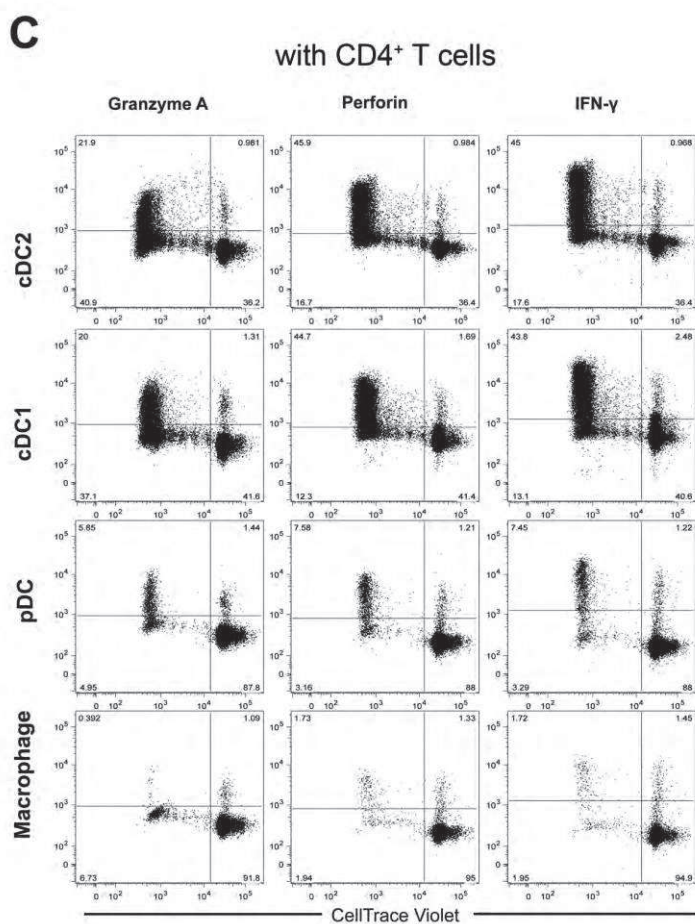
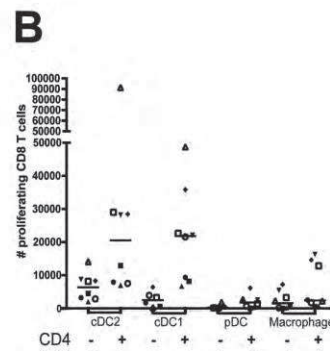


Figure S2. Induction of effector CD8⁺ T cells by tonsil DC subsets. Purified DC and macrophage from tonsils were cultured with allogeneic CellTrace Violet-stained naïve CD8⁺ T cells for 7 days, in the absence (A-B) presence (B-D) of naïve CD4⁺ T cells autologous to CD8⁺ T cells. Expression of Granzyme A, Perforin and IFN- γ was assessed by intracellular flow cytometry. (A and C) Representative results of eight independent experiments. Gated on live CD8⁺ T cells. (B) Number of proliferating CD8⁺ T cells is shown. Symbols represent individual donors. Median is shown. (D) Number of CD8⁺ T cells expressing effector molecules is shown. Symbols represent individual donors. Median is shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Wilcoxon non-parametric test.

References

- 1 Segura, E. & Amigorena, S. Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. *Advances in immunology* **127**, 1-31, doi:10.1016/bs.ai.2015.03.002 (2015).
- 2 Guillems, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* **14**, 571-578, doi:10.1038/nri3712 (2014).
- 3 Cruz, F. M., Colbert, J. D., Merino, E., Kriegsman, B. A. & Rock, K. L. The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu Rev Immunol* **35**, 149-176, doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055254 (2017).
- 4 Wakim, L. M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W. R. & Carbone, F. R. Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* **319**, 198-202, doi:10.1126/science.1151869 (2008).

- 5 Ma, Y. *et al.* Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity* **38**, 729-741, doi:10.1016/j.immuni.2013.03.003 (2013).
- 6 Ji, Q., Castelli, L. & Goverman, J. M. MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8(+) T cells. *Nat Immunol* **14**, 254-261, doi:10.1038/ni.2513 (2013).
- 7 Kuhn, S., Yang, J. & Ronchese, F. Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Essential for CD8(+) T Cell Activation and Antitumor Responses After Local Immunotherapy. *Frontiers in immunology* **6**, 584, doi:10.3389/fimmu.2015.00584 (2015).
- 8 Mittag, D. *et al.* Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J. Immunol.* **186**, 6207-6217, doi:[jimmunol.1002632 \[pii\]](https://doi.org/10.1093/jimmunol.1002632)
[10.4049/jimmunol.1002632](https://doi.org/10.1093/jimmunol.1002632) (2011).
- 9 Segura, E., Durand, M. & Amigorena, S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J Exp Med* **210**, 1035-1047, doi:10.1084/jem.20121103 (2013).
- 10 Nizzoli, G. *et al.* Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T cell responses. *Blood*, doi:10.1182/blood-2013-04-495424 (2013).
- 11 Tel, J. *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* **121**, 459-467, doi:10.1182/blood-2012-06-435644 (2013).

12 Goudot, C. *et al.* Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* **47**, 582-596 e586, doi:10.1016/j.immuni.2017.08.016 (2017).

13 Segura, E. *et al.* Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* **38**, 336-348, doi:10.1016/j.immuni.2012.10.018 (2013).

14 Zheng, G. X. *et al.* Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nature communications* **8**, 14049, doi:10.1038/ncomms14049 (2017).

15 Satija, R., Farrell, J. A., Gennert, D., Schier, A. F. & Regev, A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol* **33**, 495-502, doi:10.1038/nbt.3192 (2015).

16 Qiu, X. *et al.* Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nat Methods* **14**, 979-982, doi:10.1038/nmeth.4402 (2017).

17 Klechevsky, E. *et al.* Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* **29**, 497-510, doi:S1074-7613(08)00371-3 [pii] 10.1016/j.immuni.2008.07.013 (2008).

18 Cebrian, I. *et al.* Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* **147**, 1355-1368, doi:S0092-8674(11)01359-6 [pii] 10.1016/j.cell.2011.11.021 (2011).

19 Asano, K. *et al.* CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity* **34**, 85-95, doi:10.1016/j.immuni.2010.12.011 (2011).

- 20 Bernhard, C. A., Ried, C., Kochanek, S. & Brocker, T. CD169+ macrophages are sufficient for priming of CTLs with specificities left out by cross-priming dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5461-5466, doi:10.1073/pnas.1423356112 (2015).
- 21 Ma, W. *et al.* Long-Peptide Cross-Presentation by Human Dendritic Cells Occurs in Vacuoles by Peptide Exchange on Nascent MHC Class I Molecules. *J Immunol* **196**, 1711-1720, doi:10.4049/jimmunol.1501574 (2016).
- 22 Chiang, M. C. *et al.* Differential uptake and cross-presentation of soluble and necrotic cell antigen by human DC subsets. *Eur J Immunol* **46**, 329-339, doi:10.1002/eji.201546023 (2016).
- 23 Menager, J. *et al.* Cross-presentation of synthetic long peptides by human dendritic cells: a process dependent on ERAD component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1. *PLoS One* **9**, e89897, doi:10.1371/journal.pone.0089897 (2014).
- 24 Dinter, J. *et al.* Variable processing and cross-presentation of HIV by dendritic cells and macrophages shapes CTL immunodominance and immune escape. *PLoS Pathog* **11**, e1004725, doi:10.1371/journal.ppat.1004725 (2015).
- 25 Baleeiro, R. B. *et al.* Spatial separation of the processing and MHC class I loading compartments for cross-presentation of the tumor-associated antigen HER2/neu by human dendritic cells. *Oncoimmunology* **4**, e1047585, doi:10.1080/2162402X.2015.1047585 (2015).
- 26 Baleeiro, R. B. & Walden, P. Immature human DCs efficiently translocate endocytosed antigens into the cytosol for proteasomal processing. *Mol Immunol* **88**, 148-154, doi:10.1016/j.molimm.2017.06.028 (2017).

- 27 Fonteneau, J. F. *et al.* Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* **102**, 4448-4455, doi:10.1182/blood-2003-06-1801 (2003).
- 28 Hoeffel, G. *et al.* Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **27**, 481-492, doi:S1074-7613(07)00415-3 [pii] 10.1016/j.immuni.2007.07.021 (2007).
- 29 Di Pucchio, T. *et al.* Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol* **9**, 551-557, doi:ni.1602 [pii] 10.1038/ni.1602 (2008).
- 30 Jongbloed, S. L. *et al.* Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* **207**, 1247-1260, doi:jem.20092140 [pii] 10.1084/jem.20092140 (2010).
- 31 Flinsenberg, T. W. *et al.* Fcγ receptor antigen targeting potentiates cross-presentation by human blood and lymphoid tissue BDCA-3+ dendritic cells. *Blood* **120**, 5163-5172, doi:10.1182/blood-2012-06-434498 (2012).
- 32 Segura, E., Albiston, A. L., Wicks, I. P., Chai, S. Y. & Villadangos, J. A. Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20377-20381, doi:0910295106 [pii] 10.1073/pnas.0910295106 (2009).

- 33 Kretzer, N. M. *et al.* RAB43 facilitates cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* **213**, 2871-2883, doi:10.1084/jem.20160597 (2016).
- 34 Langlet, C. *et al.* CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol* **188**, 1751-1760, doi:10.4049/jimmunol.1102744 (2012).
- 35 Ballesteros-Tato, A., Leon, B., Lund, F. E. & Randall, T. D. Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8(+) T cell responses to influenza. *Nat Immunol* **11**, 216-224, doi:[ni.1838 \[pii\]](https://doi.org/10.1038/ni.1838)
[10.1038/ni.1838](https://doi.org/10.1038/ni.1838) (2010).
- 36 Chang, Y. H. *et al.* Dichotomous Expression of TNF Superfamily Ligands on Antigen-Presenting Cells Controls Post-priming Anti-viral CD4(+) T Cell Immunity. *Immunity* **47**, 943-958 e949, doi:10.1016/j.immuni.2017.10.014 (2017).
- 37 Durand, M. & Segura, E. Dendritic Cell Subset Purification from Human Tonsils and Lymph Nodes. *Methods Mol Biol* **1423**, 89-99, doi:10.1007/978-1-4939-3606-9_6 (2016).
- 38 Dufour, E. *et al.* Diversity of the cytotoxic melanoma-specific immune response: some CTL clones recognize autologous fresh tumor cells and not tumor cell lines. *J Immunol* **158**, 3787-3795 (1997).
- 39 van der Maaten, L. Barnes-Hut-SNE. *Proceedings of the International Conference on Learning Representations*. (2013).

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Résultats supplémentaires

A. *Test d'inhibition du protéasome*

1. Objectifs

Au cours de cette thèse, nous avons démontré que les mo-DC et mo-Mac ne sont pas efficaces pour exporter un antigène exogène vers le cytosol, ce qui suggère qu'ils n'utilisent pas la voie cytosolique pour la cross-présentation.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons analysé la cross-présentation en présence d'un inhibiteur du protéasome (lactacystine). Afin de nous assurer que la lactacystine à 2,5 μ g/mL inhibe l'activité du protéasome dans les DC ou les macrophages, nous avons mesuré l'activité du protéasome.

2. Méthode

Pour évaluer l'efficacité de l'inhibiteur du protéasome (Lactacystine ou clasto-lactacystine β -lactone, Merck / Millipore), les DC et les macrophages purifiées (1×10^4 cellules / puits) ont été traités avec de la lactacystine (2,5 μ g / mL) en milieu RPMI pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, les cellules ont été incubées avec un substrat fluorogène pour l'activité du protéasome (LLVY-R110) pendant 3 heures à 37 ° C, 5% de CO₂; selon les instructions du fabricant (Sigma). Le clivage de LLVY-R110 par le protéasome va augmenter l'intensité de la fluorescence qui est mesurée par un fluoromètre (Xex = 490 nm et Xem = 525 nm). La fluorescence de tous les puits a été corrigée en soustrayant la fluorescence du bruit de fond (milieu sans cellules).

3. Résultat

Afin de confirmer que la lactacystine inhibe l'activité du protéasome dans les mo-DC et mo-Mac, nous avons mesuré l'activité du protéasome grâce à un substrat fluorimétrique.

Nous avons observé que dans les mo-DC, l'activité du protéasome est partiellement inhibée en présence de la lactacystine, alors que dans les mo-Mac, la lactacystine à 2,5 μ g/mL, n'inhibe pas l'activité du protéasome (Fig S1A). Nous observons que la lactacystine n'affecte pas la capacité

des mo-DC (voir manuscrit) et des mo-Mac à présenter le peptide court aux cellules T, ni à cross-présenter (Fig S1B).

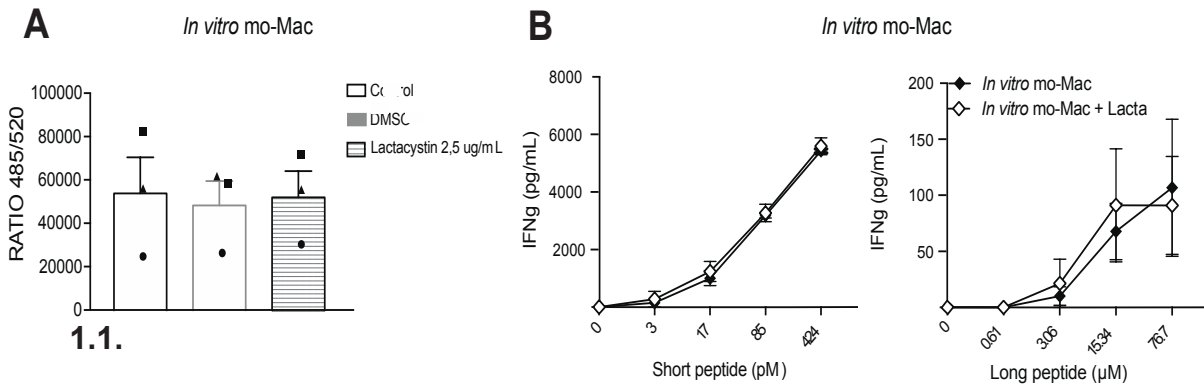


Figure S1 : Activité du protéasome en présence de lactacystine

(A) Après tri cellulaire, les mo-Mac ont été incubés avec un substrat fluorogène du protéasome, en l'absence ou en présence de lactacystine. Après 3 heures, le ratio de l'intensité de la fluorescence a été mesuré. Moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes. (B) Les mo-Mac ont été incubés avec différentes concentrations de MelanA (peptide long ou court), en l'absence ou en présence de lactacystine (Lacta). Après lavage, les mo-Mac ont été mis en culture avec des cellules T CD8 spécifiques de l'antigène. Après 24 h, la sécrétion d'IFN- γ par les cellules T a été mesurée par ELISA. Le bruit de fond a été soustrait. Moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes.

4. Conclusion

Ces résultats confirment que les mo-DC n'utilisent pas la voie cytosolique pour cross-présenter. Pour les mo-Mac, la lactacystine n'est pas efficace pour inhiber le protéasome à la concentration utilisée, de ce fait, nous ne pouvons pas conclure définitivement.

B. Test d'inhibition des cathepsines

1. Objectifs

Pour confirmer que les mo-DC et mo-Mac utilisent la voie vacuolaire pour la cross-présentation, nous avons réalisé un test de cross-présentation en présence d'un inhibiteur des protéases présentes dans les phagosomes (cathepsines B/L et S) et qui sont potentiellement impliquées dans la voie vacuolaire.

2. Méthodes

Inhibition de la dégradation antigénique

Après tri cellulaire, les mo-DC et les mo-Mac ($5 \cdot 10^5$ cellules/tubes) ont été incubés avec l'inhibiteur de cathepsines à $10 \mu\text{M}$ durant 15 min à 37°C . Les cellules ont ensuite été incubées avec le DQ-OVA à $0,25 \text{ mg/mL}$ (Substrat fluorescent, ThermoFischer) durant 10 min à 37°C . Après lavage, la dégradation du DQ-OVA (qui entraîne une augmentation de la fluorescence) est mesurée par cytométrie en flux à des temps différents.

Test de la capture de l'antigène

Afin de s'assurer que l'inhibiteur de cathepsines n'affecte pas la capture de OVA, nous avons inclus dans le test d'inhibition du protéasome (ci dessus) l'OVA couplé un fluorochrome à $0,125 \text{ mg/mL}$ (A647- ThermoFischer). Nous avons alors mesuré la fluorescence émise par l'OVA-A647 capturé par les cellules, par cytométrie en flux à différents temps.

3. Résultat

Pour évaluer l'efficacité de l'inhibiteur de cathepsines dans les mo-DC et mo-Mac, nous avons utilisé la protéine DQ-OVA qui est un substrat fluorogène des protéases. Nous observons que l'inhibiteur de cathepsines à $10 \mu\text{M}$ n'affecte pas la viabilité cellulaire (Fig S2A). L'hydrolyse de l'OVA-DQ entraîne une augmentation de la fluorescence, nous pouvons observer que l'inhibiteur de cathepsines diminue la dégradation de l'OVA-DQ dans les mo-DC et mo-Mac (Fig

S2B). En revanche, nous pouvons observer que la dégradation de l'OVA-DQ est fortement affectée dans les mo-Mac en présence de DMSO, qui a été utilisé pour reconstituer l'inhibiteur, contrairement aux mo-DC. Nous pouvons également observer que l'inhibiteur de cathepsines n'affecte pas la capture de l'OVA (OVA-A647) par les mo-DC, contrairement aux mo-Mac.

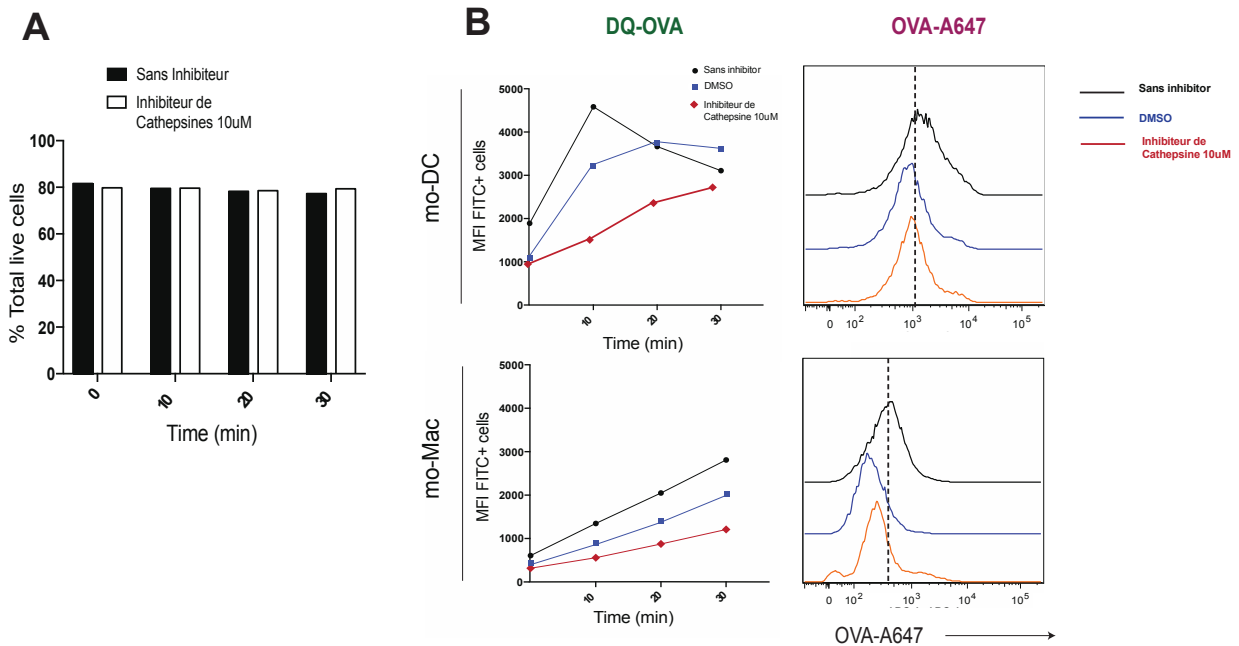


Figure S2 : Inhibition de la dégradation de l'OVA par l'inhibiteur de cathepsines

(A) La viabilité cellulaire en absence et présence d'inhibiteur. (B) Après tri cellulaire, les mo-DC et mo-DC ont été incubés avec l'inhibiteur de cathepsines à 10µM pendant 10 min à 37°C puis avec de l'OVA-DQ et OVA-A647 pendant 10 min à 37°C. La fluorescence de l'OVA-DQ et OVA-647 a été mesurée toutes les 10 min.

4. Conclusion

L'inhibiteur de cathepsines diminue la dégradation de l'antigène dans les mo-DC sans affecter la capture de l'antigène. En revanche, nous ne pouvons pas conclure que l'inhibiteur est efficace dans les mo-Mac, car en présence de DMSO la dégradation de OVA est également affectée. De plus, l'inhibiteur de cathepsines affecte la capture de l'OVA par mo-Mac. Nous pouvons alors conclure que l'inhibiteur de cathepsines inhibe efficacement la dégradation de l'antigène par les protéases lysosomales dans les mo-DC, mais semble peu efficace dans les mo-Mac. Il serait donc nécessaire d'inhiber la voie vacuolaire en utilisant un autre inhibiteur ou des shRNA, qui n'affecteront pas la capture de l'antigène par les mo-Mac.

C. *Capacité des mo-DC et des mo-Mac à présenter sur molécules du CMH II.*

1. Objectif

Nous avons constaté que les mo-DC sont efficaces, contrairement aux mo-Mac, pour induire une réponse T CD8⁺ cytotoxique et qui est dépendante des LT CD4⁺. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les mo-Mac présentent peu efficacement l'antigène aux LT CD4, conduisant à une faible activation des LT CD4. Afin de tester cette hypothèse, nous avons déterminé la capacité des mo-DC et des mo-Mac à présenter la tétanos toxoïde aux LT CD4 mémoires autologues. Pour cela, nous avons analysé par cytométrie en flux la prolifération des LT CD4 induite par ces deux populations cellulaires après 5 jours de co-culture.

2. Matériel et méthode

Les sous populations de DC et de macrophages (10⁴/puits) ont été incubées avec différentes concentrations de l'anatoxine tétanique (Tetanus Toxoid EMD Millipore) pendant 3h à 37°C dans du milieu Yssel. Les LT CD4⁺ mémoires autologues sont marqués avec 5 µM de marqueur de prolifération cellulaire violet (CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit, ThermoFischer) puis plusieurs lavages sont effectués. Les DC et les macrophages sont mis en co-culture avec les LT

CD4 marqués au CTV (10^5 /puits) durant 5 jours. La prolifération des LT CD4 est ensuite analysée par cytométrie en flux.

3. Résultat

Les résultats montrent que les mo-DC activent plus efficacement les LT CD4 mémoires que les mo-Mac et donc présentent l'anatoxine tétanique sur leurs molécules du CMH de classe II plus efficacement que les mo-Mac (Fig S3A-B). Cependant, les niveaux de prolifération sont faibles. Nous avons donc inclus dans notre expérience un contrôle interne, en utilisant des populations de DC modèles générées in vitro à partir de cellules CD34⁺ du sang: CD1a⁺ DC et CD14⁺ DC (Fig S3C-D). En effet, il a été démontré par notre laboratoire que ces deux types de DC présentent l'anatoxine aux cellules T CD4⁺ autologues (Segura et al., 2013a).

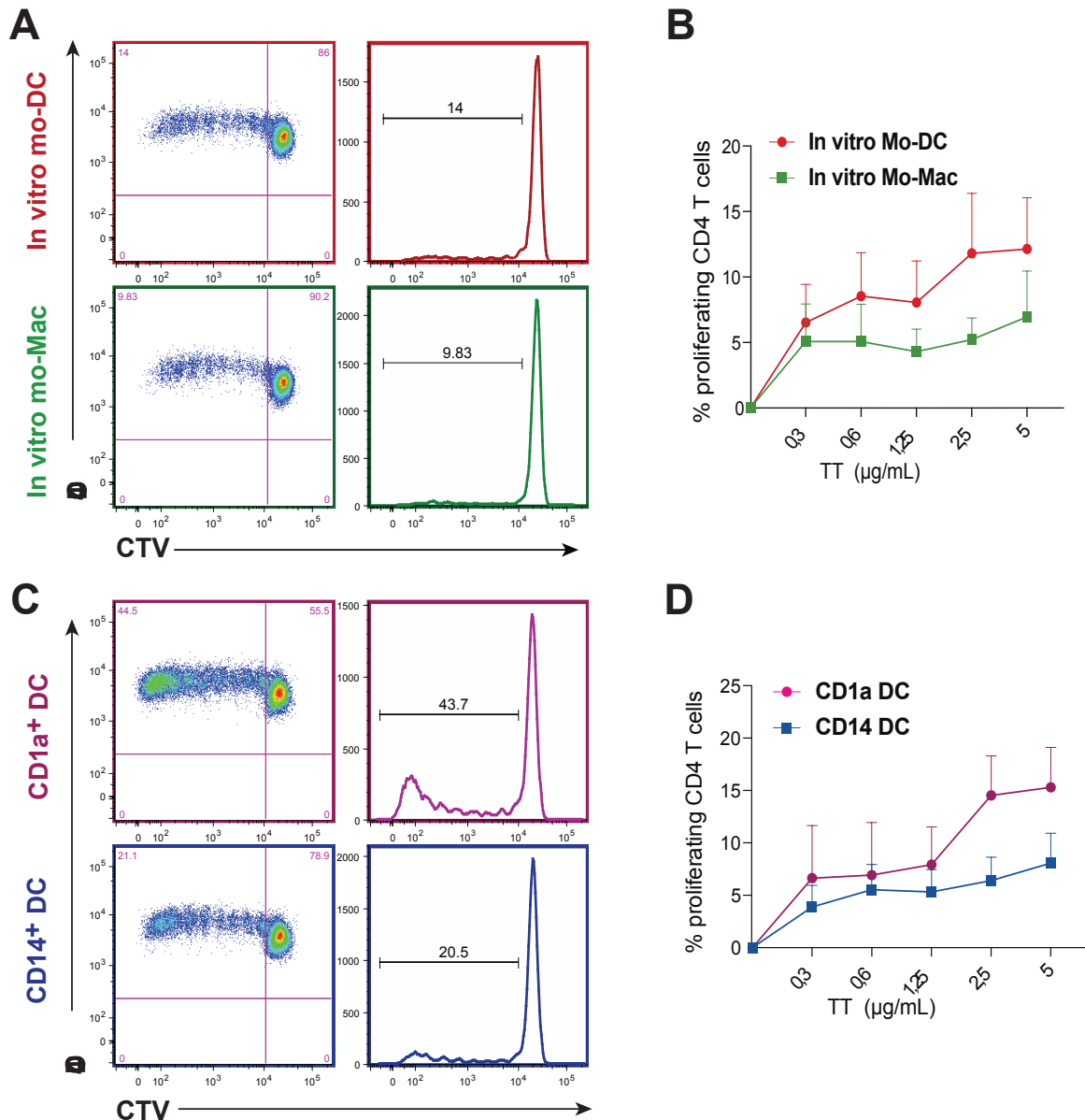


Figure S3 : Présentation de l’anatoxine tétanique aux lymphocytes T CD4+ mémoires par les mo-DC et mo-Mac

Les sous-populations de DC et de macrophages ont été triées par cytométrie puis incubées avec différentes concentrations d’anatoxine tétanique (TT). Après lavage, les DC et les macrophages ont été mis en culture pendant 5 jours avec des lymphocytes T CD4 mémoires autologues préalablement marqués avec du CTV. La prolifération des lymphocytes T CD4 est analysée par cytométrie en flux. (A-B) Les mo-DC et mo-Mac ont été différenciés in vitro à partir de monocytes du sang. (C-D) les CD1a⁺ DC et CD14⁺ DC ont été différenciées in vitro à partir de précurseurs CD34⁺ du sang. (A et C) Prolifération des LT CD4 mémoires en présence de cellules dérivées des monocytes ou CD34⁺ après incubation avec la TT à 5µg/mL. (B et D) Mean±SEM de 5 expériences indépendantes.

4. Conclusion

Malgré la variabilité inter donneur, les mo-DC **semblent** plus efficaces que les mo-Mac pour la présentation sur les molécules du CMH II. Ceci pourrait expliquer que les mo-Mac ne sont pas efficaces pour induire une réponse T CD8 cytotoxique.

D. Induction de Treg

1. Objectif

Durant cette thèse, nous avons montré que les mo-Mac ne sont pas efficaces pour induire une réponse CTL. Nous avons alors émis l'hypothèse que les mo-Mac pourraient induire des lymphocytes T CD8 régulateurs (Treg).

Afin d'évaluer la capacité des mo-Mac à induire des Treg, nous avons utilisé notre protocole de co-culture mis en place pour étudier la réponse cytotoxique et analysé l'expression de CD15s et Foxp3 par les lymphocytes T CD4⁺ et LT CD8⁺ (Miyara et al., 2015) .

2. Matériel et méthode

Après tri cellulaire, les mo-DC et mo-Mac (1x10⁴/puit) ont été mis en culture avec les LT CD8 et/ou LT CD4 naïfs CD45RA⁺, CD45RO⁻ (5x10⁴/puit). Après 6 jours de co-culture, la prolifération des LT CD4 et CD8, ainsi que l'expression de Foxp3 et CD15s a été analysée par cytométrie en flux.

3. Résultats

Nous avons analysé par cytométrie en flux la prolifération et l'expression de CD15s et Foxp3 par les LT CD4 et LT CD8 après 7 jours de co-culture. Nous constatons que les mo-DC induisent une meilleure prolifération des lymphocytes T naïfs que les mo-Mac (Fig S4A et B).

Nous pouvons également observer que les mo-DC induisent l'expression de CD15s à la surface des LT CD4 et LT CD8. Les mo-Mac, quant à eux, induisent uniquement l'expression de CD15s

par les LT CD4. En revanche, les mo-DC et les mo-Mac n'induisent pas l'expression de Foxp3 par les LT CD4 et LT CD8.

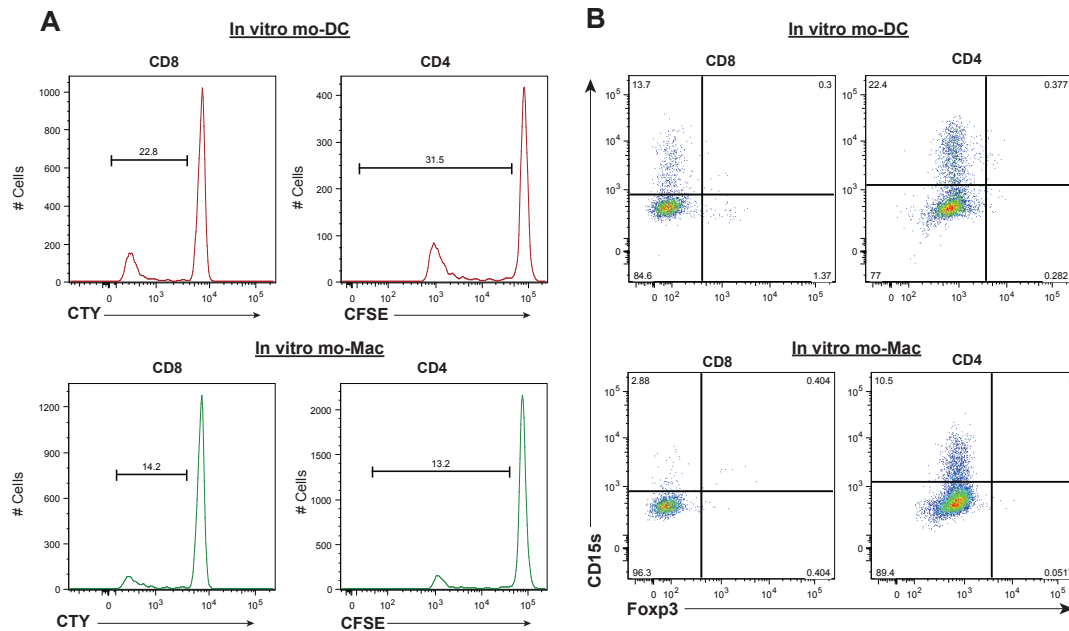


Figure S4 : Expression de CD15s et Foxp3 par les lymphocytes T

Les mo-DC et mo-Mac ont été différenciées in vitro à partir de monocytes du sang.

(A) Après tri cellulaire, les mo-DC et mo-Mac ont été mis en culture avec des lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs allogéniques préalablement marqués avec du CFSE pour les CD4 et du CTV pour les CD8. (B) Après 7 jours de co-culture, nous avons analysé par cytométrie en flux l'expression de CD15s et Foxp3 après restimulation des lymphocytes T avec de la PMA/ Ionomycine en présence de Bréfeldine A.

4. Conclusion

Cette expérience a montré que les mo-Mac n'induisent pas de Treg. L'expression de CD15s sur les LT CD4 et LT CD8 montre que les mo-DC ont la capacité d'activer les LT et les mo-Mac uniquement les LT CD4. Ce résultat rejoint nos données montrant que les mo-Mac n'ont pas la capacité d'induire une réponse CTL, suggérant que les mo-Mac, contrairement aux DC, ne sont pas capables de produire des signaux de co-activation et/ou les cytokines qui sont nécessaires pour induire une réponse CTL.

DISCUSSION

DISCUSSION

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux propriétés fonctionnelles des cellules dendritiques et des macrophages dérivés des monocytes, pour la cross-présentation et la capacité à induire une réponse T CD8+ cytotoxique.

Pour étudier ces questions, nous avons plus particulièrement utilisé des mo-DC et mo-Mac provenant d'ascites tumorales de patients cancéreux. Afin d'étudier les spécialités fonctionnelles de ces deux types cellulaires, nous avons employé différents modèles expérimentaux.

Dans cette partie, je commencerai par les limites de nos modèles expérimentaux et les solutions apportées, puis je discuterai des résultats obtenus et les perspectives de ce projet.

A. Les limites expérimentales

1. Variabilité des échantillons humains

Dans notre étude, nous avons principalement travaillé avec des ascites tumorales provenant de patients cancéreux, ainsi que des cellules provenant du sang de donneurs sains. L'utilisation d'échantillons humains présente des limitations car plusieurs paramètres peuvent influencer les résultats tels que : le traitement médical, l'âge, le stade tumoral et le polymorphisme génétique (Simon et al., 2015). De plus, la réponse immunitaire varie d'un individu à un autre (Brodin and Davis, 2017; De Jager et al., 2015; Liston et al., 2016). Tous ces critères doivent être pris en compte lors de l'interprétation des résultats car ils contribuent à des variations inter-donneurs. Cependant, il est difficile de prendre en compte ces différents paramètres car nos échantillons sont anonymisés, dès lors nous avons décidé d'utiliser un nombre suffisamment élevé de donneurs dans notre étude afin de renforcer la validité de nos conclusions par des tests statistiques.

Durant notre étude, nous avons utilisé un modèle expérimental basé sur une réaction allogénique entre les DC ou macrophages d'un donneur et les lymphocytes T naïfs d'un autre donneur. La réaction allogénique est dépendante du « mismatch » entre donneurs, ce qui

explique les variations d'activation et de prolifération des lymphocytes T CD4 ou CD8 dans notre modèle expérimental.

2. Rareté et fragilité des APC humaines

Les DC et les macrophages sont des cellules primaires rares et fragiles, limitant le nombre de conditions pouvant être testées dans nos expériences. Nous utilisons les mo-DC et les mo-Mac fraîchement purifiés et le plus rapidement possible. Les cellules ne sont pas mises en culture en présence de cytokines ou facteurs de croissance pour ne pas modifier leurs propriétés fonctionnelles.

L'utilisation d'inhibiteurs à une concentration minimale inhibitrice entraîne également la mort cellulaire des mo-DC et des mo-Mac. De ce fait, il a été impossible de réaliser des expériences avec certains inhibiteurs (E64 et inhibiteur de cathepsine) avec les mo-DC des ascites. Dans le cas des mo-Mac, nous n'avons pas réussi à inhiber le protéasome avec la lactacystine à la même concentration que celle utilisée pour les mo-DC, il serait donc nécessaire d'employer d'autres inhibiteurs du protéasome (l'époxomicine ou MG-132, qui sont plus toxiques).

Afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour certaines expériences, nous avons utilisé un modèle de différenciation des monocytes in vitro, récemment développé au laboratoire, et qui permet d'obtenir des mo-DC et mo-Mac qui sont très semblables aux cellules présentes dans l'ascite (Goudot et al., 2017). Nous avons ainsi utilisé ces cellules pour tester les inhibiteurs de la voie vacuolaire.

B. Discussion et perspectives

1. La cross-présentation par la voie vacuolaire

Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence que les mo-DC et mo-Mac, provenant d'ascites tumorales ou de notre modèle in vitro, cross-présentent uniquement par la voie vacuolaire.

Des données contradictoires existent dans la littérature car il a été montré que les mo-DC générées in vitro en utilisant les cytokines GM-CSF et IL-4 peuvent utiliser l'une ou l'autre des

deux voies pour la cross-présentation. En effet, certaines études montrent les mo-DC utilisent pour la cross-présentation d'antigènes solubles la voie vacuolaire (Chiang et al., 2016; Ma et al., 2016), et d'autres que les mo-DC utilisent la voie cytosolique (Baleeiro and Walden, 2017; Baleeiro et al., 2015; Dinter et al., 2015; Ménager et al., 2014). De plus, il a été rapporté que la cross-présentation d'antigène associé aux cellules est dépendante du protéasome dans ces DC (Fonteneau et al., 2003). Ces résultats suggèrent que selon la nature de l'antigène, les mo-DC différenciées avec GM-CSF/IL-4 utilisent la voie vacuolaire ou la voie cytosolique pour la cross-présentation.

Des analyses transcriptomiques ont montré que les mo-DC de notre modèle in vitro sont différentes des mo-DC générées avec les cytokines GM-CSF et IL-4. En effet, les mo-DC GM-CSF/IL4 sont plus proches des cDC, contrairement aux mo-DC de notre modèle in vitro qui sont plus proches des mo-DC des ascites tumorales (Goudot et al., 2017). Ceci suggère que ces deux types de mo-DC sont des populations distinctes, et pourraient utiliser des mécanismes différents pour la cross-présentation.

Il a été proposé que le choix de la voie cytosolique par rapport à la voie vacuolaire pour la cross-présentation est dicté par la forme de l'antigène. En accord avec cela, il a été montré que les pDC humaines cross-présentent les antigènes solubles et associés aux cellules par la voie cytosolique (Hoeffel et al., 2007)(Segura et al., 2013a) mais utilisent la voie vacuolaire pour cross-présenter des antigènes viraux (Di Pucchio et al., 2008). De plus, les cDC1 humaines cross-présentent les antigènes solubles en utilisant la voie cytosolique (Chiang et al., 2016)(Jongbloed et al., 2010)(Segura et al., 2013a), mais la cross-présentation des complexes immuns est inhibée à la fois par les inhibiteurs du protéasome et des protéases lysosomales (Flinsenbergh et al., 2012).

Enfin, il n'est pas exclu que les propriétés intrinsèques des sous-populations de DC puissent orienter le choix de la voie de cross-présentation. En effet, il a été démontré chez la souris que les molécules impliquées dans la cross-présentation sont différentes entre les cDC1 et les mo-

DC générées *in vivo* et *in vitro* (Kretzer et al., 2016; Segura et al., 2009). Nos résultats montrent la validité de cette hypothèse pour les DC humaines.

2. Mécanismes moléculaires de la voie vacuolaire

Les travaux réalisés par *Shen et al* ont montré que la cross-présentation par la voie vacuolaire est altérée par la leupeptine, un inhibiteur de cystéine protéase et serine protéase. Chez la souris, il a été démontré que les DC knock out à la fois pour cathepsine S et TAP perdent leur capacité à cross-présenter aux lymphocytes T CD8⁺ des antigènes particuliers, des antigènes associés aux cellules ou du virus Influenza. En effet, les DC déficientes en cathepsine S génèrent peu de peptides antigéniques dans leur phagosome, diminuant la fixation des peptides sur les molécules du CMH-I et la cross-présentation. En revanche, les DC où les phagosomes contiennent de la cathepsine S ou une cathepsine S recombinante sont capables de cross-présenter, car la cathepsine S génère des peptides qui se lient aux molécules du CMH-I (Shen et al., 2004). Cette étude suggère que la cathepsine S joue un rôle majeur dans la génération des antigènes pour la cross-présentation par la voie vacuolaire.

Dans notre étude, nous avons montré que la capacité des mo-DC à cross-présenter est altérée par un inhibiteur de cathepsine (qui inhibe les cathepsines B, L et S) mais pas par l'inhibiteur des cystéines protéases et de cathepsines B/H et L (E-64). En accord avec la littérature, nos résultats suggèrent que la cathepsine S a un rôle clé dans la cross-présentation par la voie vacuolaire.

Cependant, il n'est pas exclu que d'autres molécules puissent être impliquées. Il serait intéressant de déterminer quelles protéases sont impliquées dans la voie vacuolaire dans les DC humaines en utilisant notre modèle *in vitro* de DC et de macrophages dérivées des monocytes. En effet, ces cellules utilisent uniquement la voie vacuolaire pour la cross-présentation, et il est possible de les manipuler pour éteindre l'expression de gènes candidats par la technique de shRNA après infection par un lentivirus. Il est important de déterminer les activités enzymatiques impliquées, car selon le mécanisme de dégradation de l'antigène, la nature des épitopes peut être différente et avoir un impact sur la cross-présentation par les mo-DC (Dinter et al., 2015).

3. La cross-présentation par les macrophages

Durant cette thèse, nous avons mis en évidence que les mo-Mac humains provenant d'ascites ou de notre modèle in vitro sont également capables de cross-présenter, alors que les macrophages résidents dans les amygdales ne cross-présentent pas (Segura et al., 2013a).

Les DC sont considérées comme les seules cellules spécialisées dans la cross-présentation. Néanmoins, différentes études ont mis en évidence que les macrophages, chez l'homme et chez la souris, ont la capacité de cross-présenter. Dans des modèles in vitro, il a été démontré que des lignées cellulaires ressemblant à des macrophages (Kovacovics-Bankowski and Rock, 1995) (Houde et al., 2003) (Norbury et al., 1995) ou des monocytes différenciées en macrophages en présence de GM-CSF (Boyer et al., 1999) cross-présentent des antigènes particulaires et solubles. In vivo chez la souris, les macrophages cross-présentent aux lymphocytes T CD8+ des antigènes viraux (Alatery et al., 2010) (Bernhard et al., 2015) et des antigènes associés aux cellules (Belizaire and Unanue, 2009).

Chez l'homme, dans un modèle in vitro de différenciation des monocytes en DC ou macrophages en présence de GM-CSF et IL-13 ou IL-4, il a été montré que les mo-Mac cross-présentent des particules virales aussi efficacement que les mo-DC dérivées des monocytes (Buseyne et al., 2001).

Pour expliquer ces résultats, on peut faire l'hypothèse que les macrophages dérivés des monocytes ont un programme transcriptionnel différent de celui des macrophages « classiques » et qui leur permet de cross-présenter.

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans la cross-présentation par les mo-Mac, on pourrait identifier des gènes candidats par RNA-seq en comparant l'expression des gènes entre les macrophages des amygdales et les mo-Mac des ascites, et valider ces gènes candidats en éteignant leur expression par la technique de shRNA. Nous pourrions également comparer les propriétés fonctionnelles des phagosomes des mo-Mac des ascites avec ceux des macrophages

des amygdales, telles que le pH et la vitesse de dégradation des antigènes exogènes internalisés.

4. Induction de la réponse T CD8 cytotoxique par les mo-DC

Nous avons montré que les mo-DC induisent des CTL aussi efficacement que les cDC présentes dans les amygdales, et cette induction est dépendante des lymphocytes T CD4. De nombreuses études ont mis en évidence que les lymphocytes T CD4 auxiliaires jouent un rôle primordial dans l'induction de CTL. En effet, chez la souris la déplétion ou l'absence de LT CD4 affecte la réponse cytotoxique anti-tumorale ou infectieuse (Ridge et al., 1998) (Kumaraguru et al., 2005)(Lu et al., 2000)(Ahrends et al., 2017). Les mêmes résultats ont été observés chez l'homme dans un système allogénique in vitro (Nizzoli et al., 2013) . Nos résultats rejoignent les données de la littérature, car les mo-DC et les cDC présentes dans l'amygdale induisent la prolifération des lymphocytes T CD8+ et une réponse CTL uniquement en présence de LT CD4.

En revanche, nos résultats montrent que les mo-Mac, malgré leur capacité à cross-présenter, ne sont pas efficaces pour induire une réponse cytotoxique. Ce résultat peut s'expliquer par plusieurs hypothèses : 1) les mo-Mac, contrairement aux DC, ne présentent pas efficacement les antigènes aux LT CD4, qui à leur tour, n'exprimeront pas les signaux nécessaires pour activer les LT CD8 ou 2) les mo-Mac, contrairement aux DC, n'ont pas la capacité de produire les cytokines ou molécules de co-stimulation nécessaires à l'induction des CTL.

Dans notre étude, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction des CTL par les mo-DC restent encore à élucider. Néanmoins, plusieurs études ont montré que l'expression de CD40-L (Schoenberger et al., 1998)(Bennett et al., 1998; Lu et al., 2000)(Lee et al., 2003), CD86 (Prilliman et al., 2002), CD70 (Bullock and Yagita, 2005)(Arens et al., 2004)(Hendriks et al., 2003) (Ahrends et al., 2017), 4-1BBL (Diehl et al., 2002) et des cytokines IL2 (Steiger et al., 1995)(Buhlmann et al., 1999)(Janssen et al., 2003)(Williams et al., 2006), IL-12 (Bianchi et al.,

1999; Curtsinger et al., 2003; Grufman and Kärre, 2000; Wan et al., 2001) et IL-15 (Oh et al., 2008) sont essentielles pour induire une réponse T cytotoxiques.

Récemment, une étude a montré, chez la souris, que les mo-DC et les cDC n'expriment pas les mêmes molécules de co-stimulation (Chang et al., 2017). Au cours d'une infection, les cDC expriment fortement les molécules CMH-II, CD80 et CD86, tandis que les mo-DC expriment fortement GITRL, 4-1 BBL, OX40L et CD70 (Chang et al., 2017). L'induction de CTL n'a pas été directement étudiée dans ce travail, mais ces résultats suggèrent que les mo-DC pourraient jouer un rôle important, complémentaire des cDC, dans la régulation des réponses cytotoxiques.

Des travaux chez la souris ont démontré que lors d'une réactivation du virus herpès simplex (HSV), l'activation des lymphocytes T CD8+ mémoires peut être initiée directement dans les tissus périphériques par les mo-DC (Wakim et al., 2008). Il a également été démontré, chez la souris, après inhalation d'une forte dose d'allergène, que les mo-DC présentent efficacement l'allergène aux LT dans les poumons (Plantinga et al., 2013). Dans les cas de vaccination intramusculaire contenant des adjuvants, il a été observé un recrutement massif des monocytes sur le site de vaccination, conduisant à une augmentation du nombre de mo-DC (Langlet et al., 2012). Les mo-DC peuvent présenter l'antigène vaccinal aux lymphocytes T présents dans le muscle (Calabro et al., 2011)(Kool et al., 2008)(Giannini et al., 2006)(Didierlaurent et al., 2009)(MacLeod et al., 2011). Enfin lors d'une vaccination intra-tumorale avec de l'antracycline, qui stimule la mort des cellules cancéreuses, les cellules cancéreuses mortes, libèrent de l'ATP. L'ATP permet le recrutement des cellules myéloïdes dans les tumeurs et stimule leur différenciation en cellules CD11c+CD11b+Ly6Chi, qui présentent certaines caractéristiques des mo-DC, qui vont induire une réponse anti-tumorale sur le site de vaccination (Ma et al., 2013). La surexpression d'ectonucléotidases dans les tumeurs, le blocage des récepteurs purinergiques ou la neutralisation de CD11b, supprime la réponse anti-tumorale induite par l'antracycline. Ce qui suggère, que les CD11c+CD11b+Ly6Chi dans les tumeurs présentent les antigènes tumoraux (provenant des cellules tumorales mortes) aux lymphocytes T.

Ces résultats montrent que, en plus d'exprimer des molécules de co-stimulation différentes des cDC, les mo-DC peuvent interagir directement avec les lymphocytes T dans les tissus et induire ainsi une réponse CTL plus rapide que les cDC. En effet, les cDC, après capture de l'antigène, doivent migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter l'antigène aux lymphocytes T. Ces données suggèrent que ces deux types de DC ont un rôle complémentaire.

En accord avec ces données, nous avons montré que les mo-DC humaines ont également la capacité d'induire une réponse cytotoxique dans un contexte inflammatoire, aussi efficacement que les cDC des amygdales.

De ce fait, les mo-DC sont des cibles potentielles pour le développement de nouveaux traitements afin d'induire une réponse CTL efficace anti-infectieuse ou anti-tumorale.

C. La cross-présentation et le cancer

1. Rôle des DC et de la cross-présentation dans la réponse anti-tumorale

Plusieurs études suggèrent que les cDC1 sont essentielles pour la cross-présentation dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

Dans un modèle *in vivo* chez les souris déplétées en cDC1 (souris *Batf3^{-/-}*), le rejet de tumeurs syngéniques hautement immunogènes est altéré (Hildner et al., 2008)(Fuertes et al., 2011).

Il a été démontré que les cDC1 murines capturent les antigènes directement dans les tumeurs puis migrent, via CCR7, vers les ganglions lymphatiques où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T CD8 naifs (Broz et al., 2014; Roberts et al., 2016).

Par cytométrie en flux et par imagerie intravitale, il a également été démontré, chez la souris, que les cDC1 dans le mélanome sécrètent des chimiokines telles que CXCL10, qui favorise la migration des lymphocytes T CD8 effecteurs dans la tumeur (Spranger et al., 2017). En revanche, dans les tumeurs mammaires chez la souris, les cDC1 expriment fortement CXCL9 et faiblement CXCL10. De plus, une étude récente montre que le traitement par chimiothérapie

combiné à de l'anti-TIM3 (exprimé par les DC, qui est un régulateur négatif des LT) augmente la sécrétion de CXCL9 par les cDC1 et favorise la réponse T CD8 anti-tumorale (de Mingo Pulido et al., 2018).

De plus, il a été montré chez l'homme que les cDC1 dans les tissus tumoraux expriment la lymphotoxine- β , qui est importante pour la formation des structures lymphoïdes tertiaires (TLS, enrichis en lymphocytes T) au niveau des sites tumoraux (Dieu-Nosjean et al., 2008; Lavin et al., 2017).

Ces résultats suggèrent que les cDC1 chez l'homme, comme chez la souris, ont un rôle clé dans la réponse anti-tumorale.

De plus, il a été montré que les interférons de type I sont impliqués dans le rejet de la tumeur par leurs effets sur les cDC1 dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur (Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011). En effet, les interférons de type I peuvent améliorer la cross-présentation en diminuant la dégradation de l'antigène dans les compartiments endocytaires et en favorisant la survie des cDC1 (Lorenzi et al., 2011).

2. Echappement des tumeurs aux réponses T cytotoxiques

De nombreuses études ont montré que les cellules tumorales créent un microenvironnement leur permet d'échapper au système immunitaire, et en particulier aux réponses T cytotoxiques. Les facteurs solubles dérivés des tumeurs semblent supprimer activement la fonction normale des DC et leur recrutement dans le microenvironnement tumoral (Veglia and Gabrilovich, 2017). Dans un modèle de cancer du sein, il a été démontré que l'IL-10 sécrété par les macrophages inhibe la production d'IL-12 par cDC1 dans la tumeur, altérant leur capacité à induire des réponses T CD8+ spécifiques de l'antigène. En effet, l'expression de l'IL-12 et les réponses anti-tumorales sont restaurées chez des souris traitées avec un anticorps bloquant le récepteur de l'IL-10 (IL-10R) (Ruffell et al., 2014).

Chez les patientes atteints de cancer du sein, les DC du sang présentent généralement un phénotype immature, qui empêche l'activation des LT (Verronèse et al., 2016).

Chez l'homme et chez la souris, il a été démontré que dans les tumeurs, la Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) stimule le récepteur TLR2, ce qui entraîne l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 par les DC et l'inhibition de la différenciation des cellules T auxiliaires (Th1), et favorise la différenciation des cellules T pro-tumorigènes Th2 (Godefroy and Bhardwaj, 2012; Godefroy et al., 2014, 2014; Gonzalez-Gugel et al., 2016).

De plus, chez l'homme, l'expression dans le microenvironnement tumoral de cytokines suppressives telles que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Wallin et al., 2016), MCSF (Chockalingam and Ghosh, 2014) et chez la souris ; TGF- β (Chen and Wahl, 2002) et IL-10 (Mannino et al., 2015) inhibe la différenciation et la maturation des DC, altérant ainsi la différenciation des cellules T en LT Th1. Ces cytokines suppressives induisent également l'expression de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les mo-DC humaines (GMCSF/IL4) (Marti et al., 2014) et de PDL1 par les DC murines (Song et al., 2014), favorisant ainsi l'anergie des lymphocytes T et la différenciation des cellules T en Treg (Ghiringhelli et al., 2005). Ces facteurs suppressifs peuvent aussi empêcher la migration des DC de la tumeur vers les OLS, où elles activent les LT (Weber et al., 2005).

Le microenvironnement tumoral peut également modifier les voies métaboliques des cellules immunitaires pour échapper au système immunitaire. Chez l'homme et chez la souris, il a été démontré que le microenvironnement tumoral entraîne une accumulation de lipides dans les DC, affectant leur capacité à cross-présenter les antigènes tumoraux aux LT (Cubillos-Ruiz et al., 2015)(Tyurin et al., 2011)(Gao et al., 2015)(Herber et al., 2010). De plus, le microenvironnement tumoral peut entraîner un stress dans le RE des DC et une augmentation de l'expression du facteur de transcription XBP-1, ce qui inhibe la capacité des DC à cross-présenter et à activer les LT (Cubillos-Ruiz and Glimcher, 2016; Cubillos-Ruiz et al., 2015).

Enfin, l'hypoxie dans le microenvironnement tumoral entraîne une accumulation excessive d'adénosine dans les DC. Le rôle physiologique de l'adénosine est de réduire l'inflammation jusqu'à ce que l'homéostasie soit rétablie. Cependant, chez l'homme il a été démontré que l'adénosine s'accumule dans les DC de la tumeur, favorisant la production de cytokines immunosuppressives et l'expression d'IDO (Young et al., 2014), ce qui inhibe la capacité des DC à cross-présenter et à activer les LT (Mellor and Munn, 2003; Munn et al., 2002) (van Baren and Van den Eynde, 2015).

Tous ces résultats démontrent que les DC, par leur capacité à cross-présenter et à produire des cytokines, sont primordiales pour induire une réponse T CD8 cytotoxique anti-tumorale. Le microenvironnement tumoral affecte la fonctionnalité et la capacité des DC à cross-présenter les antigènes aux LT CD8+ et à les stimuler, par la production excessive de cytokines suppressives ou en modifiant les voies métaboliques dans les DC. C'est pourquoi cibler les DC en immunothérapie représente une stratégie prometteuse pour le développement de nouveaux vaccins anti-tumoraux. Mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la cross-présentation des DC humaines est donc essentiel pour manipuler la réponse CTL induite par les DC, que je développerai dans cette dernière partie.

D. Immunothérapie contre le cancer

Au cours des dernières années, le développement de vaccins ciblant les DC a connu une véritable expansion. Ces nouveaux vaccins prennent en compte la suppression immunitaire induite par le microenvironnement tumoral et les connaissances acquises sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la cross-présentation par les DC.

En conséquence, le développement de nouveaux vaccins vise à :

1) Stimuler la maturation des DC grâce à des ligands des récepteurs TLR (tels que Poly I :C, LPS) (Napolitani et al., 2005), des cytokines (TNF- α , IL1- β , IL-6, IFN- α , IFN- γ) ou des molécules de co-stimulation (CD40L) (Ma and Clark, 2009). Cette stimulation induit une augmentation de l'expression des molécules du CMH-I/CMH-II mais également des molécules de co-stimulation

(CD86 ; CD70)(Bullock and Yagita, 2005; Prilliman et al., 2002), la sécrétion de cytokines, telles que IL-12 et IFN γ et l'expression de récepteurs de chimiokines tels que CCR7 (Buhlmann et al., 1999; Janssen et al., 2003; Steiger et al., 1995; Williams et al., 2006) qui sont nécessaires pour induire une réponse T CD8 cytotoxique (Okada et al., 2011).

2) Optimiser la forme de l'antigène. Chez la souris, il a été observé que le traitement des antigènes tumoraux avec de l'acide hypochloreux (HPO) entraîne une augmentation de la capture et de la cross-présentation des antigènes vaccinaux par les DC, conduisant à une réponse T CD8 cytotoxique spécifique (Chiang et al., 2013). Une autre étude chez la souris montre que la vaccination avec des cellules tumorales irradiées qui sécrètent du GM-CSF, induit l'activation et la maturation des DC, favorisant leur capacité à cross-présenter l'antigène tumoral (Clancy-Thompson et al., 2013; Lee et al., 2015b).

3) Optimiser la capture des antigènes

Les antigènes tumoraux couplés à des anticorps contre les récepteurs d'endocytose tels que les récepteurs de lectine de type C (Schreibelt et al., 2012), DEC-205 (Saluja et al., 2014), les récepteurs du mannose et CD40 (Beatty et al., 2011) sont plus susceptibles d'être cross-présentés contrairement aux antigènes solubles. En effet, il a été démontré que les DC cross-présentent efficacement les antigènes tumoraux couplés avec une protéine de fusion de DEC-205 et induit une réponse immunitaire anti-tumorale beaucoup plus forte que les antigènes solubles à des doses standard beaucoup plus élevée (1000 fois) (Bonifaz et al., 2002, 2004). Les mêmes résultats ont été observés avec des vaccins comprenant des anticorps contre les récepteurs au mannose et CD40 (Macri et al., 2016; Nimanong et al., 2017; Thompson et al., 2015).

Par conséquent, les méthodes visant à augmenter la cross-présentation des antigènes des cellules tumorales par les DC ont des avantages pour l'immunothérapie du cancer, en augmentant les réponses T cytotoxiques. Cependant, les vaccins qui visent à augmenter la cross-présentation en agissant directement sur ses mécanismes intracellulaires n'ont pas encore été développés.

Outre la capacité des DC à cross-présenter pour induire une réponse CTL, la cross-présentation peut également conduire à la tolérance (cf Partie II, 5 régulateurs de la cross-présentation), ce qui pourrait être exploité pour un bénéfice thérapeutique. En effet, l'inhibition de la cross-présentation par des agents thérapeutiques qui affectent la dégradation des antigènes (Hervé et al., 2013; Hunzeker et al., 2011), et la formulation d'antigènes pouvant conduire à une réponse tolérogène (Bonifaz et al., 2002) pourraient être utilisés pour traiter les maladies auto-immunes ou dans le cas de transplantation.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Abdel Motal, U.M., Zhou, X., Joki, A., Siddiqi, A.R., Srinivasa, B.R., Stenvall, K., Dahmén, J., and Jondal, M. (1993). Major histocompatibility complex class I-binding peptides are recycled to the cell surface after internalization. *Eur. J. Immunol.* *23*, 3224–3229.
- Accapezzato, D., Visco, V., Francavilla, V., Molette, C., Donato, T., Paroli, M., Mondelli, M.U., Doria, M., Torrisi, M.R., and Barnaba, V. (2005). Chloroquine enhances human CD8⁺ T cell responses against soluble antigens in vivo. *J. Exp. Med.* *202*, 817–828.
- Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampé, R., and Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12889–12894.
- Ackerman, A.L., Giodini, A., and Cresswell, P. (2006). A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* *25*, 607–617.
- A-Gonzalez, N., Guillen, J.A., Gallardo, G., Diaz, M., de la Rosa, J.V., Hernandez, I.H., Casanova-Acebes, M., Lopez, F., Tabraue, C., Beceiro, S., et al. (2013). The nuclear receptor LXR α controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nat. Immunol.* *14*, 831–839.
- Ahrends, T., Spanjaard, A., Pilzecker, B., Bąbała, N., Bovens, A., Xiao, Y., Jacobs, H., and Borst, J. (2017). CD4⁺ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* *47*, 848–861.e5.
- Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R.A., Kaufmann, S.H.E., and Seiler, P. (2003). Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 1148–1155.
- Alatery, A., Siddiqui, S., Chan, M., Kus, A., Petrof, E.O., and Basta, S. (2010). Cross, but not direct, presentation of cell-associated virus antigens by spleen macrophages is influenced by their differentiation state. *Immunol. Cell Biol.* *88*, 3.
- Aldridge, J.R., Moseley, C.E., Boltz, D.A., Negovetich, N.J., Reynolds, C., Franks, J., Brown, S.A., Doherty, P.C., Webster, R.G., and Thomas, P.G. (2009). TNF/*i*NOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 5306–5311.

- Alloatti, A., Kotsias, F., Pauwels, A.-M., Carpier, J.-M., Jouve, M., Timmerman, E., Pace, L., Vargas, P., Maurin, M., Gehrman, U., et al. (2015). Toll-like Receptor 4 Engagement on Dendritic Cells Restrains Phago-Lysosome Fusion and Promotes Cross-Presentation of Antigens. *Immunity* 43, 1087–1100.
- Alloatti, A., Rookhuizen, D.C., Joannas, L., Carpier, J.-M., Iborra, S., Magalhaes, J.G., Yatim, N., Kozik, P., Sancho, D., Albert, M.L., et al. (2017). Critical role for Sec22b-dependent antigen cross-presentation in antitumor immunity. *J. Exp. Med.* 214, 2231–2241.
- Aoshi, T., Carrero, J.A., Konjufca, V., Koide, Y., Unanue, E.R., and Miller, M.J. (2009). The cellular niche of *Listeria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *Eur. J. Immunol.* 39, 417–425.
- Arens, R., Schepers, K., Nolte, M.A., van Oosterwijk, M.F., van Lier, R.A.W., Schumacher, T.N.M., and van Oers, M.H.J. (2004). Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8⁺ T cell formation. *J. Exp. Med.* 199, 1595–1605.
- Askenase, M.H., Han, S.-J., Byrd, A.L., Morais da Fonseca, D., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Konkel, J.E., Hand, T.W., Lacerda-Queiroz, N., Su, X., et al. (2015). Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity* 42, 1130–1142.
- Aspord, C., Leloup, C., Reche, S., and Plumas, J. (2014). pDCs efficiently process synthetic long peptides to induce functional virus- and tumour-specific T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* 44, 2880–2892.
- Backer, R., van Leeuwen, F., Kraal, G., and den Haan, J.M.M. (2008). CD8⁺ dendritic cells preferentially cross-present *Saccharomyces cerevisiae* antigens. *Eur. J. Immunol.* 38, 370–380.
- Badrinath, S., Huyton, T., Blasczyk, R., and Bade-Doeding, C. (2014). HLA Class I Polymorphism and Tapasin Dependency.
- Baharom, F., Thomas, S., Rankin, G., Lepzien, R., Pourazar, J., Behndig, A.F., Ahlm, C., Blomberg, A., and Smed-Sörensen, A. (2016). Dendritic Cells and Monocytes with Distinct Inflammatory Responses Reside in Lung Mucosa of Healthy Humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 196, 4498–4509.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* 15, 929–937.

- Bakdash, G., Buschow, S.I., Gorris, M.A.J., Halilovic, A., Hato, S.V., Sköld, A.E., Schreiber, G., Sittig, S.P., Torensma, R., Duiveman-de Boer, T., et al. (2016). Expansion of a BDCA1+CD14+ Myeloid Cell Population in Melanoma Patients May Attenuate the Efficacy of Dendritic Cell Vaccines. *Cancer Res.* 76, 4332–4346.
- 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. Baltim. Md 1950* 193, 1622–1635.
- Baleeiro, R.B., and Walden, P. (2017). Immature human DCs efficiently translocate endocytosed antigens into the cytosol for proteasomal processing. *Mol. Immunol.* 88, 148–154.
- Baleeiro, R.B., Rietscher, R., Diedrich, A., Czaplowska, J.A., Lehr, C.-M., Scherließ, R., Hanefeld, A., Gottschaldt, M., and Walden, P. (2015). Spatial separation of the processing and MHC class I loading compartments for cross-presentation of the tumor-associated antigen HER2/neu by human dendritic cells. *Oncoimmunology* 4, e1047585.
- Ballesteros-Tato, A., León, B., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2010). Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8(+) T cell responses to influenza. *Nat. Immunol.* 11, 216–224.
- Basha, G., Lizée, G., Reinicke, A.T., Seipp, R.P., Omilusik, K.D., and Jefferies, W.A. (2008). MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS One* 3, e3247.
- Basha, G., Omilusik, K., Chavez-Steenbock, A., Reinicke, A.T., Lack, N., Choi, K.B., and Jefferies, W.A. (2012). A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nat. Immunol.* 13, 237–245.
- Beatty, G.L., Chiorean, E.G., Fishman, M.P., Saboury, B., Teitelbaum, U.R., Sun, W., Huhn, R.D., Song, W., Li, D., Sharp, L.L., et al. (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* 331, 1612–1616.
- Beauchamp, N.M., Busick, R.Y., and Alexander-Miller, M.A. (2010). Functional divergence among CD103+ dendritic cell subpopulations following pulmonary poxvirus infection. *J. Virol.* 84, 10191–10199.
- Becher, B., Schlitzer, A., Chen, J., Mair, F., Sumatoh, H.R., Teng, K.W.W., Low, D., Ruedl, C.,

- Riccardi-Castagnoli, P., Poidinger, M., et al. (2014). High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nat. Immunol.* *15*, 1181–1189.
- Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., et al. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* *10*, 488–495.
- Belizaire, R., and Unanue, E.R. (2009). Targeting proteins to distinct subcellular compartments reveals unique requirements for MHC class I and II presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17463–17468.
- Belz, G.T., Smith, C.M., Eichner, D., Shortman, K., Karupiah, G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004). Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 1996–2000.
- Belz, G.T., Shortman, K., Bevan, M.J., and Heath, W.R. (2005). CD8alpha+ dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 196–200.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* *393*, 478–480.
- Bernhard, C.A., Ried, C., Kochanek, S., and Brocker, T. (2015). CD169+ macrophages are sufficient for priming of CTLs with specificities left out by cross-priming dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 5461–5466.
- Bertholet, S., Goldszmid, R., Morrot, A., Debrabant, A., Afrin, F., Collazo-Custodio, C., Houde, M., Desjardins, M., Sher, A., and Sacks, D. (2006). Leishmania Antigens Are Presented to CD8+ T Cells by a Transporter Associated with Antigen Processing-Independent Pathway In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* *177*, 3525–3533.
- Bevan, M.J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* *143*, 1283–1288.
- Bevan, M.J. (2010). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. 1976. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 1361–1366.
- Bianchi, R., Grohmann, U., Vacca, C., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (1999). Autocrine IL-12 is involved in dendritic cell modulation via CD40 ligation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 2517–2521.

- Bigley, V., and Collin, M. (2011). Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new GATA-2 dependent myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 96, 1081–1083.
- Bigley, V., Haniffa, M., Doulatov, S., Wang, X.-N., Dickinson, R., McGovern, N., Jardine, L., Pagan, S., Dimmick, I., Chua, I., et al. (2011). The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J. Exp. Med.* 208, 227–234.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 443–473.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., et al. (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513–525.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 196, 1627–1638.
- Bonifaz, L.C., Bonnyay, D.P., Charalambous, A., Darguste, D.I., Fujii, S.-I., Soares, H., Brimnes, M.K., Moltedo, B., Moran, T.M., and Steinman, R.M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* 199, 815–824.
- Boring, L., Gosling, J., Chensue, S.W., Kunkel, S.L., Farese, R.V., Broxmeyer, H.E., and Charo, I.F. (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 100, 2552–2561.
- Bougnères, L., Helft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B.H.-J., Chan, L., Campisi, L., Lauvau, G., Hugues, S., Kumar, P., et al. (2009). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* 31, 232–244.
- Boyer, A., Andreu, G., Romet-Lemonne, J.L., Fridman, W.H., and Teillaud, J.L. (1999). Generation of phagocytic MAK and MAC-DC for therapeutic use: characterization and in vitro functional properties. *Exp. Hematol.* 27, 751–761.
- Braun, A., Worbs, T., Moschovakis, G.L., Halle, S., Hoffmann, K., Bölter, J., Münk, A., and Förster, R. (2011). Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nat. Immunol.*

12, 879–887.

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

Breton, G., Lee, J., Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2015b). Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry. *Nat. Protoc.* 10, 1407.

Breton, G., Zheng, S., Valieris, R., Tojal da Silva, I., Satija, R., and Nussenzweig, M.C. (2016). Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c⁺ or CD141⁺ DCs. *J. Exp. Med.* 213, 2861–2870.

Brodin, P., and Davis, M.M. (2017). Human immune system variation. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 21–29.

Bsat, M., Chapuy, L., Baba, N., Rubio, M., Panzini, B., Wassef, R., Richard, C., Soucy, G., Mehta, H., and Sarfati, M. (2015). Differential accumulation and function of proinflammatory 6-sulfo LacNAc dendritic cells in lymph node and colon of Crohn's versus ulcerative colitis patients. *J. Leukoc. Biol.* 98, 671–681.

Buchrieser, J., James, W., and Moore, M.D. (2017). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Macrophages Share Ontogeny with MYB-Independent Tissue-Resident Macrophages. *Stem Cell Rep.* 8, 334–345.

Buhlmann, J.E., Gonzalez, M., Ginther, B., Panoskaltsis-Mortari, A., Blazar, B.R., Greiner, D.L., Rossini, A.A., Flavell, R., and Noelle, R.J. (1999). Cutting edge: sustained expansion of CD8⁺ T cells requires CD154 expression by Th cells in acute graft versus host disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 4373–4376.

Bullock, T.N.J., and Yagita, H. (2005). Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8⁺ T cell responses in the absence of CD4⁺ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 710–717.

Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., and Kurts, C. (2006). The Mannose Receptor Mediates Uptake of Soluble but Not of Cell-Associated Antigen for Cross-Presentation. *J. Immunol.* 176, 6770–6776.

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

Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R., and Kurts, C. (2008). Spatial and mechanistic

- separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol.* 9, 558–566.
- Bursch, L.S., Rich, B.E., and Hogquist, K.A. (2009). Langerhans cells are not required for the CD8 T cell response to epidermal self-antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 4657–4664.
- Buseyne, F., Le Gall, S., Boccaccio, C., Abastado, J.P., Lifson, J.D., Arthur, L.O., Rivière, Y., Heard, J.M., and Schwartz, O. (2001). MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nat. Med.* 7, 344–349.
- Calabro, S., Tortoli, M., Baudner, B.C., Pacitto, A., Cortese, M., O’Hagan, D.T., De Gregorio, E., Seubert, A., and Wack, A. (2011). Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29, 1812–1823.
- Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (2001). 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 20, 2357–2366.
- Cebrian, I., Visentin, G., Blanchard, N., Jouve, M., Bobard, A., Moita, C., Enninga, J., Moita, L.F., Amigorena, S., and Savina, A. (2011). Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 147, 1355–1368.
- Cebrian, I., Croce, C., Guerrero, N.A., Blanchard, N., and Mayorga, L.S. (2016). Rab22a controls MHC-I intracellular trafficking and antigen cross-presentation by dendritic cells. *EMBO Rep.* 17, 1753–1765.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5, 919–923.
- Cepika, A.-M., Banachereau, R., Segura, E., Ohouo, M., Cantarel, B., Goller, K., Cantrell, V., Ruchaud, E., Gatewood, E., Nguyen, P., et al. (2017). A multidimensional blood stimulation assay reveals immune alterations underlying systemic juvenile idiopathic arthritis. *J. Exp. Med.* 214, 3449–3466.
- Cerovic, V., Houston, S.A., Westlund, J., Utriainen, L., Davison, E.S., Scott, C.L., Bain, C.C., Joeris, T., Agace, W.W., Kroczek, R.A., et al. (2015). Lymph-borne CD8 α ⁺ dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8⁺ T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol.* 8, 38–48.
- Cervantes-Barragan, L., Lewis, K.L., Firner, S., Thiel, V., Hugues, S., Reith, W., Ludewig, B.,

- and Reizis, B. (2012). Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3012–3017.
- Chang, Y.-H., Wang, K.C., Chu, K.-L., Clouthier, D.L., Tran, A.T., Torres Perez, M.S., Zhou, A.C., Abdul-Sater, A.A., and Watts, T.H. (2017). Dichotomous Expression of TNF Superfamily Ligands on Antigen-Presenting Cells Controls Post-priming Anti-viral CD4⁺ T Cell Immunity. *Immunity* *47*, 943–958.e9.
- Chapman, H.A., Riese, R.J., and Shi, G.P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* *59*, 63–88.
- Chen, L., and Jondal, M. (2008). Brefeldin A inhibits vesicular MHC class I processing in resting but not in CpG- and disruption-activated DC. *Mol. Immunol.* *46*, 158–165.
- Chiang, C.L.-L., Kandalafi, L.E., Tanyi, J., Hagemann, A.R., Motz, G.T., Svoronos, N., Montone, K., Mantia-Smaldone, G.M., Smith, L., Nisenbaum, H.L., et al. (2013). A dendritic cell vaccine pulsed with autologous hypochlorous acid-oxidized ovarian cancer lysate primes effective broad antitumor immunity: from bench to bedside. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 4801–4815.
- Chiang, M.-C., Tullett, K.M., Lee, Y.S., Idris, A., Ding, Y., McDonald, K.J., Kassianos, A., Leal Rojas, I.M., Jeet, V., Lahoud, M.H., et al. (2016). Differential uptake and cross-presentation of soluble and necrotic cell antigen by human DC subsets. *Eur. J. Immunol.* *46*, 329–339.
- Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A., Lane, W.S., and Strominger, J.L. (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* *178*, 27–47.
- Ciechanover, A., Hod, Y., and Hershko, A. (2012). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. 1978. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *425*, 565–570.
- Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N.S., Kant, S.G., et al. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* *135*, 37–48.
- Clancy-Thompson, E., King, L.K., Nunnley, L.D., Mullins, I.M., Slingluff, C.L., and Mullins, D.W. (2013). Peptide vaccination in Montanide adjuvant induces and GM-CSF increases CXCR3 and cutaneous lymphocyte antigen expression by tumor antigen-specific CD8 T cells. *Cancer Immunol. Res.* *1*, 332–339.

- Contreras, V., Urien, C., Guiton, R., Alexandre, Y., Manh, T.-P.V., Andrieu, T., Crozat, K., Jouneau, L., Bertho, N., Epardaud, M., et al. (2010). Existence of CD8 α -Like Dendritic Cells with a Conserved Functional Specialization and a Common Molecular Signature in Distant Mammalian Species. *J. Immunol.* *185*, 3313–3325.
- Crespo, M.I., Zacca, E.R., Núñez, N.G., Ranocchia, R.P., Maccioni, M., Maletto, B.A., Pistoiresi-Palencia, M.C., and Morón, G. (2013). TLR7 triggering with polyuridylic acid promotes cross-presentation in CD8 α ⁺ conventional dendritic cells by enhancing antigen preservation and MHC class I antigen permanence on the dendritic cell surface. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 948–960.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., and Diedrich, G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* *172*, 21–28.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., et al. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* *33*, 375–386.
- Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.-P., Fossum, E., Luche, H., Ardouin, L., Guilliams, M., Azukizawa, H., Bogen, B., Malissen, B., et al. (2011). Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8 α ⁺ type. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 4411–4415.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J. Exp. Med.* *197*, 1141–1151.
- Cwiklik, L., and Jungwirth, P. (2010). Massive oxidation of phospholipid membranes leads to pore creation and bilayer disintegration. *Chem. Phys. Lett.* *486*, 99–103.
- Datta, S.K., Redecke, V., Prilliman, K.R., Takabayashi, K., Corr, M., Tallant, T., DiDonato, J., Dziarski, R., Akira, S., Schoenberger, S.P., et al. (2003). A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4102–4110.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* *14*, 986–995.
- De Jager, P.L., Hacohen, N., Mathis, D., Regev, A., Stranger, B.E., and Benoist, C. (2015). ImmVar project: Insights and design considerations for future studies of “healthy” immune

variation. *Semin. Immunol.* 27, 51–57.

Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630–1634.

Desch, A.N., Randolph, G.J., Murphy, K., Gautier, E.L., Kedl, R.M., Lahoud, M.H., Caminschi, I., Shortman, K., Henson, P.M., and Jakubzick, C.V. (2011). CD103⁺ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *J. Exp. Med.* 208, 1789–1797.

Desch, A.N., Gibbings, S.L., Clambey, E.T., Janssen, W.J., Slansky, J.E., Kedl, R.M., Henson, P.M., and Jakubzick, C. (2014). Dendritic cell subsets require cis-activation for cytotoxic CD8 T-cell induction. *Nat. Commun.* 5, 4674.

Desch, A.N., Gibbings, S.L., Goyal, R., Kolde, R., Bednarek, J., Bruno, T., Slansky, J.E., Jacobelli, J., Mason, R., Ito, Y., et al. (2016). Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Phagocytes in Nondiseased Human Lung and Lung-Draining Lymph Nodes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 614–626.

Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sørensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., and Connolly, J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol.* 9, 551–557.

Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., et al. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.* 208, 1989–2003.

Didierlaurent, A.M., Morel, S., Lockman, L., Giannini, S.L., Bisteau, M., Carlsen, H., Kielland, A., Vosters, O., Vanderheyde, N., Schiavetti, F., et al. (2009). AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 6186–6197.

Diehl, L., van Mierlo, G.J.D., den Boer, A.T., van der Voort, E., Fransen, M., van Bostelen, L., Krimpenfort, P., Melief, C.J.M., Mittler, R., Toes, R.E.M., et al. (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 3755–3762.

Ding, Y., Guo, Z., Liu, Y., Li, X., Zhang, Q., Xu, X., Gu, Y., Zhang, Y., Zhao, D., and Cao, X.

- (2016). The lectin Siglec-G inhibits dendritic cell cross-presentation by impairing MHC class I-peptide complex formation. *Nat. Immunol.* *17*, 1167–1175.
- Dingjan, I., Verboogen, D.R., Paardekooper, L.M., Revelo, N.H., Sittig, S.P., Visser, L.J., Mollard, G.F. von, Henriët, S.S., Figdor, C.G., Ter Beest, M., et al. (2016). Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation. *Sci. Rep.* *6*, 22064.
- Dinter, J., Duong, E., Lai, N.Y., Berberich, M.J., Kourjian, G., Bracho-Sanchez, E., Chu, D., Su, H., Zhang, S.C., and Gall, S.L. (2015). Variable Processing and Cross-presentation of HIV by Dendritic Cells and Macrophages Shapes CTL Immunodominance and Immune Escape. *PLoS Pathog.* *11*.
- Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.-W., Park, C.G., et al. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* *315*, 107–111.
- Duluc, D., Gannevat, J., Anguiano, E., Zurawski, S., Carley, M., Boreham, M., Stecher, J., Dullaers, M., Banchereau, J., and Oh, S. (2013). Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T-cell responses. *Mucosal Immunol.* *6*, 626–638.
- Dutertre, C.-A., Jourdain, J.-P., Rancez, M., Amraoui, S., Fossum, E., Bogen, B., Sanchez, C., Couëdel-Courteille, A., Richard, Y., Dalod, M., et al. (2014). TLR3-responsive, XCR1+, CD141(BDCA-3)+/CD8 α + equivalent dendritic cells uncovered in healthy and simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 4697–4708.
- Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., et al. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α + conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 823–836.
- Eguíluz-Gracia, I., Bosco, A., Dollner, R., Melum, G.R., Lexberg, M.H., Jones, A.C., Dheyauldeen, S.A., Holt, P.G., Bækkevold, E.S., and Jahnsen, F.L. (2016). Rapid recruitment of CD14(+) monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* *137*, 1872–1881.e12.
- Elsen, S., Doussi re, J., Villiers, C.L., Faure, M., Berthier, R., Papaioannou, A., Grandvaux, N., Marche, P.N., and Vignais, P.V. (2004). Cryptic O₂- generating NADPH oxidase in dendritic cells. *J. Cell Sci.* *117*, 2215–2226.

- Firat, E., Saveanu, L., Aichele, P., Staeheli, P., Huai, J., Gaedicke, S., Nil, A., Besin, G., Kanzler, B., Endert, P. van, et al. (2007). The Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Aminopeptidase 1 in Immunity to Infection and in Cross-Presentation. *J. Immunol.* *178*, 2241–2248.
- Flinsenberg, T.W.H., Compeer, E.B., Koning, D., Klein, M., Amelung, F.J., van Baarle, D., Boelens, J.J., and Boes, M. (2012). Fc γ receptor antigen targeting potentiates cross-presentation by human blood and lymphoid tissue BDCA-3⁺ dendritic cells. *Blood* *120*, 5163–5172.
- da Fonseca, P.C.A., He, J., and Morris, E.P. (2012). Molecular model of the human 26S proteasome. *Mol. Cell* *46*, 54–66.
- Fonteneau, J.F., Kavanagh, D.G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T.L., Bhardwaj, N., and Larsson, M. (2003). Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* *102*, 4448–4455.
- van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. (1972). [Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line]. *Bull. World Health Organ.* *47*, 651–658.
- Gabriele, L., Borghi, P., Rozera, C., Sestili, P., Andreotti, M., Guarini, A., Montefusco, E., Foà, R., and Belardelli, F. (2004). IFN- α promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leukemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS treatment. *Blood* *103*, 980–987.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J.M., and Desjardins, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* *110*, 119–131.
- Gale, R.P., Sparkes, R.S., and Golde, D.W. (1978). Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science* *201*, 937–938.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* *13*, 1118–1128.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71–82.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656–661.

- GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., et al. (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin⁺CD11b⁻ but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *205*, 1621–1634.
- Giannini, S.L., Hanon, E., Moris, P., Van Mechelen, M., Morel, S., Dessy, F., Fourneau, M.A., Colau, B., Suzich, J., Losonksy, G., et al. (2006). Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* *24*, 5937–5949.
- Gil-Torregrosa, B.C., Lennon-Duménil, A.M., Kessler, B., Guermonprez, P., Ploegh, H.L., Fruci, D., van Endert, P., and Amigorena, S. (2004). Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* *34*, 398–407.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 392–404.
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., et al. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103⁺ DCs. *J. Exp. Med.* *206*, 3115–3130.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* *330*, 841–845.
- Giodini, A., and Cresswell, P. (2008). Hsp90-mediated cytosolic refolding of exogenous proteins internalized by dendritic cells. *EMBO J.* *27*, 201–211.
- Girotti, A.W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* *39*, 1529–1542.
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* *518*, 547–551.
- Gordon, S. (1998). The role of the macrophage in immune regulation. *Res. Immunol.* *149*, 685–688.
- Gosselin, D., Link, V., Romanoski, C.E., Fonseca, G.J., Eichenfield, D.Z., Spann, N.J., Stender, J.D., Chun, H.B., Garner, H., Geissmann, F., et al. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* *159*, 1327.

- Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.-C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.-L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* 47, 582–596.e6.
- Graham, D.B., Stephenson, L.M., Lam, S.K., Brim, K., Lee, H.M., Bautista, J., Gilfillan, S., Akilesh, S., Fujikawa, K., and Swat, W. (2007). An ITAM-signaling pathway controls cross-presentation of particulate but not soluble antigens in dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204, 2889–2897.
- Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kündig, T.M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., et al. (2012a). Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity* 37, 1050–1060.
- Greter, M., Helft, J., Chow, A., Hashimoto, D., Mortha, A., Agudo-Cantero, J., Bogunovic, M., Gautier, E.L., Miller, J., Leboeuf, M., et al. (2012b). GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* 36, 1031–1046.
- Grimm, M.C., Pullman, W.E., Bennett, G.M., Sullivan, P.J., Pavli, P., and Doe, W.F. (1995). Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 387–395.
- Grommé, M., Uytdehaag, F.G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R.S., Kenter, M.J., Tulp, A., Verwoerd, D., and Neefjes, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10326–10331.
- Grotzke, J.E., and Cresswell, P. (2015). Are ERAD components involved in cross-presentation? *Mol. Immunol.* 68, 112–115.
- Grotzke, J.E., Kozik, P., Morel, J.-D., Impens, F., Pietrosevoli, N., Cresswell, P., Amigorena, S., and Demangel, C. (2017). Sec61 blockade by mycolactone inhibits antigen cross-presentation independently of endosome-to-cytosol export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E5910–E5919.
- Grufman, P., and Kärre, K. (2000). Innate and adaptive immunity to tumors: IL-12 is required for optimal responses. *Eur. J. Immunol.* 30, 1088–1093.
- Guermónprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397–402.
- Guillerme, J.-B., Boisgerault, N., Roulois, D., Ménager, J., Combredet, C., Tangy, F., Fonteneau,

- J.-F., and Gregoire, M. (2013). Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 1147–1158.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 571–578.
- Guttman-Yassky, E., Lowes, M.A., Fuentes-Duculan, J., Whynot, J., Novitskaya, I., Cardinale, I., Haider, A., Khatcherian, A., Carucci, J.A., Bergman, R., et al. (2007). Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *119*, 1210–1217.
- Haan, J.M.M. den, Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). Cd8⁺ but Not Cd8⁻ Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *J. Exp. Med.* *192*, 1685–1696.
- den Haan, J.M.M., and Bevan, M.J. (2002). Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *196*, 817–827.
- Haldar, M., Kohyama, M., So, A.Y.-L., Kc, W., Wu, X., Briseño, C.G., Satpathy, A.T., Kretzer, N.M., Arase, H., Rajasekaran, N.S., et al. (2014). Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell* *156*, 1223–1234.
- Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, J., Bigley, V., Boisson-Dupuis, S., Azevedo, J., Fortin, A., Haniffa, M., Ceron-Gutierrez, L., Bacon, C.M., et al. (2011). IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* *365*, 127–138.
- Hammer, G.E., Gonzalez, F., Champsaur, M., Cado, D., and Shastri, N. (2006). The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat. Immunol.* *7*, 103–112.
- Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.-N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., Bullock, S., Grisotto, M., Booth, T., Taub, P., et al. (2009). Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* *206*, 371–385.
- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells.

Immunity 37, 60–73.

Hänsel, A., Günther, C., Ingwersen, J., Starke, J., Schmitz, M., Bachmann, M., Meurer, M., Rieber, E.P., and Schäkel, K. (2011). Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong Th17/Th1 T-cell responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 787–794.e9.

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38.

Heidkamp, G.F., Sander, J., Lehmann, C.H.K., Heger, L., Eissing, N., Baranska, A., Lühr, J.J., Hoffmann, A., Reimer, K.C., Lux, A., et al. (2016). Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Sci. Immunol.* 1, eaai7677.

Helft, J., Manicassamy, B., Guermonprez, P., Hashimoto, D., Silvin, A., Agudo, J., Brown, B.D., Schmolke, M., Miller, J.C., Leboeuf, M., et al. (2012). Cross-presenting CD103⁺ dendritic cells are protected from influenza virus infection. *J. Clin. Invest.* 122, 4037–4047.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., and Akira, S. (2003). The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 3059–3064.

Hendriks, J., Xiao, Y., and Borst, J. (2003). CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J. Exp. Med.* 198, 1369–1380.

Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guilliams, M., de Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., et al. (2010). CD207⁺ CD103⁺ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 207, 189–206.

Hervé, J., Dubreil, L., Tardif, V., Terme, M., Pogu, S., Anegon, I., Rozec, B., Gauthier, C., Bach, J.-M., and Blancou, P. (2013). β 2-Adrenoreceptor agonist inhibits antigen cross-presentation by dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 3163–3171.

Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* 14, 821–830.

- 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 CD8 α ⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097–1100.
- Hoeffel, G., Ripoche, A.-C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.-G., Gannagé, M., Caillat-Zucman, S., et al. (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27, 481–492.
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209, 1167–1181.
- Hofer, T.P., Zawada, A.M., Frankenberger, M., Skokann, K., Satz, A.A., Gesierich, W., Schubert, M., Levin, J., Danek, A., Rotter, B., et al. (2015). slan-defined subsets of CD16-positive monocytes: impact of granulomatous inflammation and M-CSF receptor mutation. *Blood* 126, 2601–2610.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9, 847–856.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402–406.
- Hunt, D.F., Michel, H., Dickinson, T.A., Shabanowitz, J., Cox, A.L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H.M., and Sette, A. (1992). Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* 256, 1817–1820.
- Hunzeker, J.T., Elftman, M.D., Mellinger, J.C., Princiotta, M.F., Bonneau, R.H., Truckenmiller, M.E., and Norbury, C.C. (2011). A marked reduction in priming of cytotoxic CD8⁺ T cells mediated by stress-induced glucocorticoids involves multiple deficiencies in cross-presentation by dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 183–194.
- Iannacone, M., Moseman, E.A., Tonti, E., Bosurgi, L., Junt, T., Henrickson, S.E., Whelan, S.P., Guidotti, L.G., and von Andrian, U.H. (2010). Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. *Nature* 465, 1079–1083.
- Iborra, S., Izquierdo, H.M., Martínez-López, M., Blanco-Menéndez, N., Reis e Sousa, C., and

- Sancho, D. (2012). The DC receptor DNCR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 1628–1643.
- Igyártó, B.Z., Haley, K., Ortner, D., Bobr, A., Gerami-Nejad, M., Edelson, B.T., Zurawski, S.M., Malissen, B., Zurawski, G., Berman, J., et al. (2011). Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity* *35*, 260–272.
- Imai, T., Kato, Y., Kajiwara, C., Mizukami, S., Ishige, I., Ichiyangi, T., Hikida, M., Wang, J.-Y., and Udono, H. (2011). Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16363–16368.
- Imler, J.-L., and Hoffmann, J.A. (2003). Toll signaling: the TIREless quest for specificity. *Nat. Immunol.* *4*, 105–106.
- Ingersoll, M.A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E.L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., et al. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* *115*, e10-19.
- Ippolito, G.C., Dekker, J.D., Wang, Y.-H., Lee, B.-K., Shaffer, A.L., Lin, J., Wall, J.K., Lee, B.-S., Staudt, L.M., Liu, Y.-J., et al. (2014). Dendritic cell fate is determined by BCL11A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E998-1006.
- Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2001). Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 2961–2969.
- Jancic, C., Savina, A., Wasmeier, C., Tolmachova, T., El-Benna, J., Dang, P.M.-C., Pascolo, S., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Raposo, G., Seabra, M.C., et al. (2007). Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat. Cell Biol.* *9*, 367–378.
- Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P. (2003). CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* *421*, 852–856.
- Jenner, W., Motwani, M., Veighey, K., Newson, J., Audzevich, T., Nicolaou, A., Murphy, S., Macallister, R., and Gilroy, D.W. (2014). Characterisation of leukocytes in a human skin blister model of acute inflammation and resolution. *PloS One* *9*, e89375.
- Ji, Q., Castelli, L., and Goverman, J.M. (2013). MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* *14*,

254–261.

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. *J. Exp. Med.* *207*, 1247–1260.

Joseph, S.B., Bradley, M.N., Castrillo, A., Bruhn, K.W., Mak, P.A., Pei, L., Hogenesch, J., O'connell, R.M., Cheng, G., Saez, E., et al. (2004). LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* *119*, 299–309.

Junt, T., Moseman, E.A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., et al. (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* *450*, 110–114.

Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M.T., Sugita, A., Koganei, K., et al. (2008). Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J. Clin. Invest.* *118*, 2269–2280.

Kamphorst, A.O., Guermonprez, P., Dudziak, D., and Nussenzweig, M.C. (2010). Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 3426–3435.

Karlsson, K.R., Cowley, S., Martinez, F.O., Shaw, M., Minger, S.L., and James, W. (2008). Homogeneous monocytes and macrophages from human embryonic stem cells following coculture-free differentiation in M-CSF and IL-3. *Exp. Hematol.* *36*, 1167–1175.

Kashiwada, M., Pham, N.-L.L., Pewe, L.L., Harty, J.T., and Rothman, P.B. (2011). NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 α^+ dendritic cell development. *Blood* *117*, 6193–6197.

Kastenmüller, W., Torabi-Parizi, P., Subramanian, N., Lämmermann, T., and Germain, R.N. (2012). A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread. *Cell* *150*, 1235–1248.

Kawamura, S., Onai, N., Miya, F., Sato, T., Tsunoda, T., Kurabayashi, K., Yotsumoto, S., Kuroda, S., Takenaka, K., Akashi, K., et al. (2017). Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs.

Immunity 46, 835–848.e4.

Klaas, M., and Crocker, P.R. (2012). Sialoadhesin in recognition of self and non-self. *Semin. Immunopathol.* 34, 353–364.

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

Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457, 318–321.

Kool, M., Soullié, T., van Nimwegen, M., Willart, M.A.M., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 869–882.

Kovacovics-Bankowski, M., and Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243–246.

Kretzer, N.M., Theisen, D.J., Tussiwand, R., Briseño, C.G., Grajales-Reyes, G.E., Wu, X., Durai, V., Albring, J., Bagadia, P., Murphy, T.L., et al. (2016). RAB43 facilitates cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 213, 2871–2883.

Kubiczkova, L., Pour, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., and Sevcikova, S. (2014). Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 947–961.

Kumaraguru, U., Banerjee, K., and Rouse, B.T. (2005). In vivo rescue of defective memory CD8⁺ T cells by cognate helper T cells. *J. Leukoc. Biol.* 78, 879–887.

Langlet, C., Tamoutounour, S., Henri, S., Luche, H., Ardouin, L., Grégoire, C., Malissen, B., and Guilliams, M. (2012). CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 1751–1760.

Laoui, D., Keirsse, J., Morias, Y., Van Overmeire, E., Geeraerts, X., Elkrim, Y., Kiss, M., Bolli, E., Lahmar, Q., Sichien, D., et al. (2016). The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat. Commun.* 7, 13720.

Lapenta, C., Santini, S.M., Spada, M., Donati, S., Urbani, F., Accapezzato, D., Franceschini, D.,

- Andreotti, M., Barnaba, V., and Belardelli, F. (2006). IFN- α -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2046–2060.
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell* *159*, 1312.
- Lavin, Y., Kobayashi, S., Leader, A., Amir, E.-A.D., Elefant, N., Bigenwald, C., Remark, R., Sweeney, R., Becker, C.D., Levine, J.H., et al. (2017). Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* *169*, 750–765.e17.
- Lawand, M., Abramova, A., Manceau, V., Springer, S., and van Endert, P. (2016). TAP-Dependent and -Independent Peptide Import into Dendritic Cell Phagosomes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *197*, 3454–3463.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* *4*, 1009–1015.
- Lee, B.O., Hartson, L., and Randall, T.D. (2003). CD40-deficient, influenza-specific CD8 memory T cells develop and function normally in a CD40-sufficient environment. *J. Exp. Med.* *198*, 1759–1764.
- Lee, H.K., Zamora, M., Linehan, M.M., Iijima, N., Gonzalez, D., Haberman, A., and Iwasaki, A. (2009). Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. *J. Exp. Med.* *206*, 359–370.
- Lee, J., Breton, G., Oliveira, T.Y.K., Zhou, Y.J., Aljoufi, A., Pühr, S., Cameron, M.J., Sékaly, R.-P., Nussenzweig, M.C., and Liu, K. (2015a). Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J. Exp. Med.* *212*, 385–399.
- Lee, S.-J., Song, L., Yang, M.-C., Mao, C.-P., Yang, B., Yang, A., Jeang, J., Peng, S., Wu, T.-C., and Hung, C.-F. (2015b). Local administration of granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces local accumulation of dendritic cells and antigen-specific CD8+ T cells and enhances dendritic cell cross-presentation. *Vaccine* *33*, 1549–1555.
- van Leeuwen-Kerkhoff, N., Lundberg, K., Westers, T.M., Kordasti, S., Bontkes, H.J., de Gruijl, T.D., Lindstedt, M., and van de Loosdrecht, A.A. (2017). Transcriptional profiling reveals functional dichotomy between human slan+ non-classical monocytes and myeloid dendritic cells.

J. Leukoc. Biol. *102*, 1055–1068.

Leibowitz, M.E., and Johnson, M.C. (1971). Relation of lipid peroxidation to loss of cations trapped in liposomes. *J. Lipid Res.* *12*, 662–670.

Lewis, K.L., Caton, M.L., Bogunovic, M., Greter, M., Grajkowska, L.T., Ng, D., Klinakis, A., Charo, I.F., Jung, S., Gommerman, J.L., et al. (2011). Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* *35*, 780–791.

Liao, C.-T., Andrews, R., Wallace, L.E., Khan, M.W.A., Kift-Morgan, A., Topley, N., Fraser, D.J., and Taylor, P.R. (2017). Peritoneal macrophage heterogeneity is associated with different peritoneal dialysis outcomes. *Kidney Int.* *91*, 1088–1103.

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

Liston, A., Carr, E.J., and Linterman, M.A. (2016). Shaping Variation in the Human Immune System. *Trends Immunol.* *37*, 637–646.

Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., and Nussenzweig, M. (2007). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat. Immunol.* *8*, 578–583.

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

Lizée, G., Basha, G., Tiong, J., Julien, J.-P., Tian, M., Biron, K.E., and Jefferies, W.A. (2003). Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol.* *4*, 1065–1073.

Ljunggren, H.G., Stam, N.J., Ohlén, C., Neefjes, J.J., Höglund, P., Heemels, M.T., Bastin, J., Schumacher, T.N., Townsend, A., and Kärre, K. (1990). Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* *346*, 476–480.

Lu, Z., Yuan, L., Zhou, X., Sotomayor, E., Levitsky, H.I., and Pardoll, D.M. (2000). CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *191*, 541–550.

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

One 4, e7111.

Ma, D.Y., and Clark, E.A. (2009). The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin. Immunol.* 21, 265–272.

Ma, W., Zhang, Y., Vigneron, N., Stroobant, V., Thielemans, K., Bruggen, P. van der, and Eynde, B.J.V. den (2016). Long-Peptide Cross-Presentation by Human Dendritic Cells Occurs in Vacuoles by Peptide Exchange on Nascent MHC Class I Molecules. *J. Immunol.* 196, 1711–1720.

Ma, Y., Adjemian, S., Mattarollo, S.R., Yamazaki, T., Aymeric, L., Yang, H., Portela Catani, J.P., Hannani, D., Duret, H., Steegh, K., et al. (2013). Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity* 38, 729–741.

MacLeod, M.K.L., McKee, A.S., David, A., Wang, J., Mason, R., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2011). Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7914–7919.

Macri, C., Dumont, C., Johnston, A.P., and Mintern, J.D. (2016). Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clin. Transl. Immunol.* 5, e66.

Mantegazza, A.R., Savina, A., Vermeulen, M., Pérez, L., Geffner, J., Hermine, O., Rosenzweig, S.D., Faure, F., and Amigorena, S. (2008). NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* 112, 4712–4722.

Marquet, F., Vu Manh, T.-P., Maisonnasse, P., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Bouguyon, E., Jouneau, L., Bourge, M., Simon, G., Ezquerra, A., et al. (2014). Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 5883–5893.

Martínez-Cingolani, C., Grandclaudon, M., Jeanmougin, M., Jouve, M., Zollinger, R., and Soumelis, V. (2014). Human blood BDCA-1 dendritic cells differentiate into Langerhans-like cells with thymic stromal lymphopoietin and TGF- β . *Blood* 124, 2411–2420.

Maschalidi, S., Nunes-Hasler, P., Nascimento, C.R., Sallent, I., Lannoy, V., Garfa-Traore, M., Cagnard, N., Sepulveda, F.E., Vargas, P., Lennon-Duménil, A.-M., et al. (2017). UNC93B1 interacts with the calcium sensor STIM1 for efficient antigen cross-presentation in dendritic cells. *Nat. Commun.* 8, 1640.

- Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Günther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C.E., Händler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., et al. (2016). Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353.
- Matheoud, D., Moradin, N., Bellemare-Pelletier, A., Shio, M.T., Hong, W.J., Olivier, M., Gagnon, E., Desjardins, M., and Descoteaux, A. (2013). Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe* 14, 15–25.
- Maurer, T., Heit, A., Hochrein, H., Ampenberger, F., O’Keeffe, M., Bauer, S., Lipford, G.B., Vabulas, R.M., and Wagner, H. (2002). CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32, 2356–2364.
- McGovern, N., Schlitzer, A., Gunawan, M., Jardine, L., Shin, A., Poyner, E., Green, K., Dickinson, R., Wang, X.-N., Low, D., et al. (2014). Human dermal CD14⁺ cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity* 41, 465–477.
- McIlroy, D., Troadec, C., Grassi, F., Samri, A., Barrou, B., Autran, B., Debré, P., Feuillard, J., and Hosmalin, A. (2001). Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood* 97, 3470–3477.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298–300.
- Ménager, J., Ebstein, F., Oger, R., Hulin, P., Nedellec, S., Duverger, E., Lehmann, A., Kloetzel, P.-M., Jotereau, F., and Guilloux, Y. (2014). Cross-presentation of synthetic long peptides by human dendritic cells: a process dependent on ERAD component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1. *PloS One* 9, e89897.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604.
- Mildner, A., Yona, S., and Jung, S. (2013). A close encounter of the third kind: monocyte-derived cells. *Adv. Immunol.* 120, 69–103.
- Mildner, A., Schönheit, J., Giladi, A., David, E., Lara-Astiaso, D., Lorenzo-Vivas, E., Paul, F., Chappell-Maor, L., Priller, J., Leutz, A., et al. (2017). Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP β Transcription Factor Dependence of Ly6C[–] Cells. *Immunity* 46, 849–862.e7.

- Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jovic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., et al. (2012). Deciphering the transcriptional network of the DC lineage. *Nat. Immunol.* *13*, 888.
- Milne, P., Bigley, V., Gunawan, M., Haniffa, M., and Collin, M. (2015). CD1c⁺ blood dendritic cells have Langerhans cell potential. *Blood* *125*, 470–473.
- Mittag, D., Proietto, A.I., Loudovaris, T., Mannering, S.I., Vremec, D., Shortman, K., Wu, L., and Harrison, L.C. (2011). Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 6207–6217.
- Miyara, M., Chader, D., Sage, E., Sugiyama, D., Nishikawa, H., Bouvry, D., Claër, L., Hingorani, R., Balderas, R., Rohrer, J., et al. (2015). Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3^{high} regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 7225–7230.
- Moffat, J.M., Segura, E., Khoury, G., Caminschi, I., Cameron, P.U., Lewin, S.R., Villadangos, J.A., and Mintern, J.D. (2013). Targeting antigen to bone marrow stromal cell-2 expressed by conventional and plasmacytoid dendritic cells elicits efficient antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* *43*, 595–605.
- Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P.K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Pinto, A.R., Klapproth, K., Henri, S., Malissen, B., et al. (2014). Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* *211*, 2151–2158.
- Morandi, B., Bonaccorsi, I., Mesiti, M., Conte, R., Carrega, P., Costa, G., Iemmo, R., Martini, S., Ferrone, S., Cantoni, C., et al. (2013). Characterization of human afferent lymph dendritic cells from seroma fluids. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 4858–4866.
- Mouriès, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G., and Leclerc, C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* *112*, 3713–3722.
- Müller-Taubenberger, A., Lupas, A.N., Li, H., Ecke, M., Simmeth, E., and Gerisch, G. (2001). Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J.* *20*, 6772–6782.
- Nagasawa, M., Schmidlin, H., Hazekamp, M.G., Schotte, R., and Blom, B. (2008). Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-

- helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B. *Eur. J. Immunol.* *38*, 2389–2400.
- Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O’Keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.* *7*, 663–671.
- Nair-Gupta, P., Baccarini, A., Tung, N., Seyffer, F., Florey, O., Huang, Y., Banerjee, M., Overholtzer, M., Roche, P.A., Tampé, R., et al. (2014). TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* *158*, 506–521.
- Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* *6*, 769–776.
- Neefjes, J., Jongasma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 823–836.
- Nestle, F.O., Zheng, X.G., Thompson, C.B., Turka, L.A., and Nickoloff, B.J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *151*, 6535–6545.
- Neubert, K., Lehmann, C.H.K., Heger, L., Baranska, A., Staedtler, A.M., Buchholz, V.R., Yamazaki, S., Heidkamp, G.F., Eissing, N., Zebroski, H., et al. (2014). Antigen delivery to CD11c+CD8- dendritic cells induces protective immune responses against experimental melanoma in mice in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 5830–5838.
- Nimanong, S., Ostroumov, D., Wingerath, J., Knocke, S., Woller, N., Gürlevik, E., Falk, C.S., Manns, M.P., Kühnel, F., and Wirth, T.C. (2017). CD40 Signaling Drives Potent Cellular Immune Responses in Heterologous Cancer Vaccinations. *Cancer Res.* *77*, 1918–1926.
- Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeldt, S., Facciotti, F., Gruarin, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013). Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* *122*, 932–942.
- Nopora, K., Bernhard, C.A., Ried, C., Castello, A.A., Murphy, K.M., Marconi, P., Koszinowski, U., and Brocker, T. (2012). MHC class I cross-presentation by dendritic cells counteracts viral immune evasion. *Front. Immunol.* *3*, 348.
- Norbury, C.C., Hewlett, L.J., Prescott, A.R., Shastri, N., and Watts, C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages.

Immunity 3, 783–791.

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

Norbury, C.C., Princiotta, M.F., Bacik, I., Brutkiewicz, R.R., Wood, P., Elliott, T., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2001). Multiple antigen-specific processing pathways for activating naive CD8⁺ T cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 4355–4362.

Nunes, P., Cornut, D., Bochet, V., Hasler, U., Oh-Hora, M., Waldburger, J.-M., and Demareux, N. (2012). STIM1 juxtaposes ER to phagosomes, generating Ca²⁺ hotspots that boost phagocytosis. *Curr. Biol. CB* 22, 1990–1997.

Oehen, S., Odermatt, B., Karrer, U., Hengartner, H., Zinkernagel, R., and López-Macías, C. (2002). Marginal zone macrophages and immune responses against viruses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 1453–1458.

Ogino, T., Nishimura, J., Barman, S., Kayama, H., Uematsu, S., Okuzaki, D., Osawa, H., Haraguchi, N., Uemura, M., Hata, T., et al. (2013). Increased Th17-inducing activity of CD14⁺CD163^{low} myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 145, 1380–1391.e1.

Oh, S., Perera, L.P., Terabe, M., Ni, L., Waldmann, T.A., and Berzofsky, J.A. (2008). IL-15 as a mediator of CD4⁺ help for CD8⁺ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5201–5206.

Okabe, Y., and Medzhitov, R. (2014). Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages. *Cell* 157, 832.

Okada, H., Kalinski, P., Ueda, R., Hoji, A., Kohanbash, G., Donegan, T.E., Mintz, A.H., Engh, J.A., Bartlett, D.L., Brown, C.K., et al. (2011). Induction of CD8⁺ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with α -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 330–336.

Palmowski, M.J., Gileadi, U., Salio, M., Gallimore, A., Millrain, M., James, E., Addey, C., Scott, D., Dyson, J., Simpson, E., et al. (2006). Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J.*

Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 983–990.

Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* *74*, 2527–2534.

Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., et al. (2017a). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* *214*, 1913–1923.

Patel, V.I., Booth, J.L., Duggan, E.S., Cate, S., White, V.L., Hutchings, D., Kovats, S., Burian, D.M., Dozmorov, M., and Metcalf, J.P. (2017b). Transcriptional Classification and Functional Characterization of Human Airway Macrophage and Dendritic Cell Subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *198*, 1183–1201.

Phan, T.G., Grigорова, I., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat. Immunol.* *8*, 992–1000.

Plantinga, M., Guilliams, M., Vanheerswyngheles, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., et al. (2013). Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* *38*, 322–335.

Polak, M.E., Newell, L., Taraban, V.Y., Pickard, C., Healy, E., Friedmann, P.S., Al-Shamkhani, A., and Ardern-Jones, M.R. (2012). CD70-CD27 interaction augments CD8⁺ T-cell activation by human epidermal Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 1636–1644.

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. Baltim. Md 1950* *166*, 5327–5330.

Prilliman, K.R., Lemmens, E.E., Palioungas, G., Wolfe, T.G., Allison, J.P., Sharpe, A.H., and Schoenberger, S.P. (2002). Cutting edge: a crucial role for B7-CD28 in transmitting T help from APC to CTL. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 4094–4097.

Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C., Davoust, J., Fay, J., et al. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 566–572.

Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder,

- L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475, 222–225.
- Ramachandra, L., Sramkoski, R.M., Canaday, D.H., Boom, W.H., and Harding, C.V. (1998). Flow analysis of MHC molecules and other membrane proteins in isolated phagosomes. *J. Immunol. Methods* 213, 53–71.
- Reynolds, G., and Haniffa, M. (2015). Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of Two Species? *Front. Immunol.* 6, 330.
- Ridge, J.P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474–478.
- del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Kremmer, E., and Förster, R. (2007). CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 6861–6866.
- Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., and Kelsall, B.L. (2012). Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J. Exp. Med.* 209, 139.
- Robbins, S.H., Walzer, T., Dembélé, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., et al. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9, R17.
- Rock, K.L. (1996). A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol. Today* 17, 131–137.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761–771.
- Rock, K.L., York, I.A., and Goldberg, A.L. (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* 5, 670–677.
- Rock, K.L., Farfán-Arribas, D.J., and Shen, L. (2010). Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 9–15.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 362–368.

- Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J., Strowig, T., Gearty, S.V., Teichmann, L.L., Saito, Y., Marches, F., Halene, S., Palucka, A.K., et al. (2014). Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat. Biotechnol.* *32*, 364–372.
- Roquilly, A., McWilliam, H.E.G., Jacqueline, C., Tian, Z., Cinotti, R., Rimbart, M., Wakim, L., Caminschi, I., Lahoud, M.H., Belz, G.T., et al. (2017). Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity* *47*, 135–147.e5.
- Rudensky AYu, null, Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A., and Janeway, C.A. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* *353*, 622–627.
- Saluja, S.S., Hanlon, D.J., Sharp, F.A., Hong, E., Khalil, D., Robinson, E., Tigelaar, R., Fahmy, T.M., and Edelson, R.L. (2014). Targeting human dendritic cells via DEC-205 using PLGA nanoparticles leads to enhanced cross-presentation of a melanoma-associated antigen. *Int. J. Nanomedicine* *9*, 5231–5246.
- Satpathy, A.T., Kc, W., Albring, J.C., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2012). Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J. Exp. Med.* *209*, 1135–1152.
- Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., Lopez, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., et al. (2005). Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* *6*, 689–697.
- Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M., Guermonprez, P., Firat, E., Lindo, V., Greer, F., Davoust, J., Kratzer, R., Keller, S.R., et al. (2009). IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* *325*, 213–217.
- Saveanu, L., Babbior, J., Lawand, M., and van Endert, P. (2013). Insulin-regulated aminopeptidase and its compartment in dendritic cells. *Mol. Immunol.* *55*, 153–155.
- Savina, A., and Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* *219*, 143–156.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Duménil, A.-M., Seabra, M.C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* *126*, 205–218.
- Savina, A., Peres, A., Cebrian, I., Carmo, N., Moita, C., Hacohen, N., Moita, L.F., and

- Amigorena, S. (2009). The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity* 30, 544–555.
- Schäkel, K., Kannagi, R., Kniep, B., Goto, Y., Mitsuoka, C., Zwirner, J., Soruri, A., von Kietzell, M., and Rieber, E. (2002). 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* 17, 289–301.
- Schiavoni, G., Mattei, F., and Gabriele, L. (2013). Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response. *Front. Immunol.* 4, 483.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., et al. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38, 970–983.
- Schlitzer, A., Sivakamasundari, V., Chen, J., Sumatoh, H.R.B., Schreuder, J., Lum, J., Malleret, B., Zhang, S., Larbi, A., Zolezzi, F., et al. (2015). Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat. Immunol.* 16, 718–728.
- Schnorrer, P., Behrens, G.M.N., Wilson, N.S., Pooley, J.L., Smith, C.M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., et al. (2006). The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10729–10734.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., and Melief, C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480–483.
- Schreibelt, G., Klinkenberg, L.J.J., Cruz, L.J., Tacke, P.J., Tel, J., Kreutz, M., Adema, G.J., Brown, G.D., Figdor, C.G., and de Vries, I.J.M. (2012). The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* 119, 2284–2292.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86–90.
- Scott, C.L., Bain, C.C., Wright, P.B., Sichien, D., Kotarsky, K., Persson, E.K., Luda, K., Williams, M., Lambrecht, B.N., Agace, W.W., et al. (2015). CCR2(+)CD103(-) intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T

cells. *Mucosal Immunol.* 8, 327–339.

See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356.

Segovia, M., Louvet, C., Charnet, P., Savina, A., Tilly, G., Gautreau, L., Carretero-Iglesia, L., Beriou, G., Cebrian, I., Cens, T., et al. (2014). Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 14, 1021–1031.

Segura, E., and Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 34, 440–445.

Segura, E., Albiston, A.L., Wicks, I.P., Chai, S.Y., and Villadangos, J.A. (2009). Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20377–20381.

Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 209, 653–660.

Segura, E., Durand, M., and Amigorena, S. (2013a). Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ–resident dendritic cells. *J. Exp. Med.* 210, 1035–1047.

Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013b). Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 38, 336–348.

Seiler, P., Aichele, P., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., and Schwendener, R.A. (1997). Crucial role of marginal zone macrophages and marginal zone metallophilic cells in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Eur. J. Immunol.* 27, 2626–2633.

Seneschal, J., Jiang, X., and Kupper, T.S. (2014). Langerin⁺ dermal DC, but not Langerhans cells, are required for effective CD8-mediated immune responses after skin scarification with vaccinia virus. *J. Invest. Dermatol.* 134, 686–694.

Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7, 311–317.

Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. (2002). ERAAP customizes

- peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480–483.
- Shand, F.H.W., Ueha, S., Otsuji, M., Koid, S.S., Shichino, S., Tsukui, T., Kosugi-Kanaya, M., Abe, J., Tomura, M., Ziogas, J., et al. (2014). Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 7771–7776.
- Shen, K.-Y., Song, Y.-C., Chen, I.-H., Leng, C.-H., Chen, H.-W., Li, H.-J., Chong, P., and Liu, S.-J. (2014). Molecular mechanisms of TLR2-mediated antigen cross-presentation in dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 4233–4241.
- Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., and Rock, K.L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155–165.
- Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., and Rock, K.L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* 158, 2723–2730.
- Shi, G.P., Munger, J.S., Meara, J.P., Rich, D.H., and Chapman, H.A. (1992). Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J. Biol. Chem.* 267, 7258–7262.
- Shi, Y., Evans, J.E., and Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516–521.
- Shortman, K., and Liu, Y.-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 151–161.
- Simon, A.K., Hollander, G.A., and McMichael, A. (2015). Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc. Biol. Sci.* 282, 20143085.
- Singh, R., and Cresswell, P. (2010). Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. *Science* 328, 1394–1398.
- Song, R., and Harding, C.V. (1996). Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156, 4182–4190.
- Soucie, E.L., Weng, Z., Geirsdóttir, L., Molawi, K., Maurizio, J., Fenouil, R., Mossadegh-Keller, N., Gimenez, G., VanHille, L., Beniazza, M., et al. (2016). Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science* 351, aad5510.
- Steiger, J., Nickerson, P.W., Steurer, W., Moscovitch-Lopatin, M., and Strom, T.B. (1995). IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 489–498.

- Steinman, R.M., and Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *311*, 17–58.
- Steinman, R.M., and Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 5132–5136.
- Steinman, R.M., Lustig, D.S., and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.* *139*, 1431–1445.
- Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D., and Cohn, Z.A. (1979). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J. Exp. Med.* *149*, 1–16.
- Stolz, A., and Wolf, D.H. (2010). Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 694–705.
- Suri, A., Lovitch, S.B., and Unanue, E.R. (2006). The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 70–77.
- Swiecki, M., Wang, Y., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2013). Plasmacytoid dendritic cells contribute to systemic but not local antiviral responses to HSV infections. *PLoS Pathog.* *9*, e1003728.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* *325*, 612–616.
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., et al. (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell* *3*, 889–901.
- Takeda, K., and Akira, S. (2001). Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *Jpn. J. Infect. Dis.* *54*, 209–219.
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* *39*, 925–938.
- Tel, J., Schreibelt, G., Sittig, S.P., Mathan, T.S.M., Buschow, S.I., Cruz, L.J., Lambeck, A.J.A.,

- Figdor, C.G., and de Vries, I.J.M. (2013). Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8⁺ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* *121*, 459–467.
- Thomas, E.D., Ramberg, R.E., Sale, G.E., Sparkes, R.S., and Golde, D.W. (1976). Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science* *192*, 1016–1018.
- Thomas, K., Dietze, K., Wehner, R., Metz, I., Tumani, H., Schultheiß, T., Günther, C., Schäkel, K., Reichmann, H., Brück, W., et al. (2014). Accumulation and therapeutic modulation of 6-sulfo LacNAc(+) dendritic cells in multiple sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* *1*, e33.
- Thompson, E.A., Liang, F., Lindgren, G., Sandgren, K.J., Quinn, K.M., Darrah, P.A., Koup, R.A., Seder, R.A., Kedl, R.M., and Loré, K. (2015). Correction: Human Anti-CD40 Antibody and Poly IC:LC Adjuvant Combination Induces Potent T Cell Responses in the Lung of Nonhuman Primates. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 3497–3498.
- Tiwari, N., Garbi, N., Reinheckel, T., Moldenhauer, G., Hämmerling, G.J., and Momburg, F. (2007). A Transporter Associated with Antigen-Processing Independent Vacuolar Pathway for the MHC Class I-Mediated Presentation of Endogenous Transmembrane Proteins. *J. Immunol.* *178*, 7932–7942.
- Toma, M., Wehner, R., Kloß, A., Hübner, L., Fodelianaki, G., Erdmann, K., Füssel, S., Zastrow, S., Meinhardt, M., Seliger, B., et al. (2015). Accumulation of tolerogenic human 6-sulfo LacNAc dendritic cells in renal cell carcinoma is associated with poor prognosis. *Oncoimmunology* *4*, e1008342.
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R.E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., et al. (2005). Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* *123*, 157–170.
- Trombetta, E.S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., and Mellman, I. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* *299*, 1400–1403.
- Ulvmar, M.H., Werth, K., Braun, A., Kelay, P., Hub, E., Eller, K., Chan, L., Lucas, B., Novitzky-Basso, I., Nakamura, K., et al. (2014). The atypical chemokine receptor CCRL1 shapes functional CCL21 gradients in lymph nodes. *Nat. Immunol.* *15*, 623–630.
- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.-D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets

have different origin and functions. *Immunity* 31, 502–512.

Veninga, H., Borg, E.G.F., Vreeman, K., Taylor, P.R., Kalay, H., van Kooyk, Y., Kraal, G., Martinez-Pomares, L., and den Haan, J.M.M. (2015). Antigen targeting reveals splenic CD169+ macrophages as promoters of germinal center B-cell responses. *Eur. J. Immunol.* 45, 747–757.

Vermi, W., Micheletti, A., Lonardi, S., Costantini, C., Calzetti, F., Nascimbeni, R., Bugatti, M., Codazzi, M., Pinter, P.C., Schäkel, K., et al. (2014). slanDCs selectively accumulate in carcinoma-draining lymph nodes and marginate metastatic cells. *Nat. Commun.* 5, 3029.

Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 543–555.

Villadangos, J.A., Bryant, R.A., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Duménil, A.M., Riese, R.J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G.P., Chapman, H.A., et al. (1999). Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* 172, 109–120.

Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356.

Vivar, O.I., Magalhaes, J.G., and Amigorena, S. (2016). Measurement of Export to the Cytosol in Dendritic Cells Using a Cytofluorimetry-Based Assay. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1423, 183–188.

Wagner, C.S., and Cresswell, P. (2012). TLR and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor signals differentially regulate exogenous antigen presentation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 686–693.

Wagner, C.S., Grotzke, J., and Cresswell, P. (2013). Intracellular regulation of cross-presentation during dendritic cell maturation. *PLoS One* 8, e76801.

Wakim, L.M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2008). Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* 319, 198–202.

Wan, Y., Lu, L., Bramson, J.L., Baral, S., Zhu, Q., Pilon, A., and Dayball, K. (2001). Dendritic cell-derived IL-12 is not required for the generation of cytotoxic, IFN-gamma-secreting, CD8(+) CTL in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 5027–5033.

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

- Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* *15*, 98–108.
- Weck, M.M., Grünebach, F., Werth, D., Sinzger, C., Bringmann, A., and Brossart, P. (2007). TLR ligands differentially affect uptake and presentation of cellular antigens. *Blood* *109*, 3890–3894.
- Weigert, R., Yeung, A.C., Li, J., and Donaldson, J.G. (2004). Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3758–3770.
- Weimershaus, M., Maschalidi, S., Sepulveda, F., Manoury, B., van Endert, P., and Saveanu, L. (2012). Conventional dendritic cells require IRAP-Rab14 endosomes for efficient cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 1840–1846.
- van Wilgenburg, B., Browne, C., Vowles, J., and Cowley, S.A. (2013). Efficient, long term production of monocyte-derived macrophages from human pluripotent stem cells under partly-defined and fully-defined conditions. *PloS One* *8*, e71098.
- Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* *441*, 890–893.
- Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., and Villadangos, J.A. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* *102*, 2187–2194.
- Wilson, N.S., Behrens, G.M.N., Lundie, R.J., Smith, C.M., Waithman, J., Young, L., Forehan, S.P., Mount, A., Steptoe, R.J., Shortman, K.D., et al. (2006). Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat. Immunol.* *7*, 165–172.
- Wilson, N.S., Young, L.J., Kupresanin, F., Naik, S.H., Vremec, D., Heath, W.R., Akira, S., Shortman, K., Boyle, J., Maraskovsky, E., et al. (2008). Normal proportion and expression of maturation markers in migratory dendritic cells in the absence of germs or Toll-like receptor signaling. *Immunol. Cell Biol.* *86*, 200–205.
- Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D., and Bieber, T. (1996). Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* *106*, 446–453.

- Wollenberg, A., Mommaas, M., Oppel, T., Schottdorf, E.-M., Günther, S., and Moderer, M. (2002). Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* *118*, 327–334.
- Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., and Wong, S.-C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* *118*, e16-31.
- Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Tieleman, D.P., and Monticelli, L. (2007). Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* *93*, 4225–4236.
- Woo, S.-R., Fuertes, M.B., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, M.J., Leung, M.Y.K., Duggan, R., Wang, Y., Barber, G.N., Fitzgerald, K.A., et al. (2014). STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* *41*, 830–842.
- Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K.D., Suter, M., Lo, D., and Shortman, K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* *9*, 839–847.
- Wu, S.J., Niknafs, Y.S., Kim, S.H., Oravec-Wilson, K., Zajac, C., Toubai, T., Sun, Y., Prasad, J., Peltier, D., Fujiwara, H., et al. (2017). A Critical Analysis of the Role of SNARE Protein SEC22B in Antigen Cross-Presentation. *Cell Rep.* *19*, 2645–2656.
- Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* *496*, 445–455.
- Yamazaki, C., Sugiyama, M., Ohta, T., Hemmi, H., Hamada, E., Sasaki, I., Fukuda, Y., Yano, T., Nobuoka, M., Hirashima, T., et al. (2013). Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 6071–6082.
- Yan, J., Parekh, V.V., Mendez-Fernandez, Y., Olivares-Villagómez, D., Dragovic, S., Hill, T., Roopenian, D.C., Joyce, S., and Kaer, L.V. (2006). In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *J. Exp. Med.* *203*, 647–659.
- Yates, R.M., and Russell, D.G. (2005). Phagosome Maturation Proceeds Independently of Stimulation of Toll-like Receptors 2 and 4. *Immunity* *23*, 409–417.
- Yates, S.P., Jørgensen, R., Andersen, G.R., and Merrill, A.R. (2006). Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 123–133.

- Yona, S., and Gordon, S. (2015). From the Reticuloendothelial to Mononuclear Phagocyte System - The Unaccounted Years. *Front. Immunol.* 6, 328.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.
- York, I.A., Chang, S.-C., Saric, T., Keys, J.A., Favreau, J.M., Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* 3, 1177–1184.
- Yu, C.I., Becker, C., Wang, Y., Marches, F., Helft, J., Leboeuf, M., Anguiano, E., Pourpe, S., Goller, K., Pascual, V., et al. (2013). Human CD1c⁺ dendritic cells drive the differentiation of CD103⁺ CD8⁺ mucosal effector T cells via the cytokine TGF- β . *Immunity* 38, 818–830.
- Zaba, L.C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N.J., Abello, M.V., Novitskaya, I., Pierson, K.C., Gonzalez, J., Krueger, J.G., and Lowes, M.A. (2009). Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 129, 79–88.
- Zehner, M., Chasan, A.I., Schuette, V., Embgenbroich, M., Quast, T., Kolanus, W., and Burgdorf, S. (2011). Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9933–9938.
- Zehner, M., Marschall, A.L., Bos, E., Schloetel, J.-G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A.J., et al. (2015). The translocon protein Sec61 mediates antigen transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8(+) T cells. *Immunity* 42, 850–863.
- Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J. Clin. Invest.* 122, 1615–1627.
- Zhang, X., Casartelli, N., Lemoine, S., Mozeleski, B., Azria, E., Le Ray, C., Schwartz, O., Launay, O., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2014). Plasmacytoid dendritic cells engagement by influenza vaccine as a surrogate strategy for driving T-helper type 1 responses in human neonatal settings. *J. Infect. Dis.* 210, 424–434.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* *116*, e74-80.

Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliah, E., Satpathy, A.T., Friedlander, G., Mack, M., Shpigel, N., Boneca, I.G., Murphy, K.M., et al. (2012). Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* *37*, 1076–1090.

Zou, L., Zhou, J., Zhang, J., Li, J., Liu, N., Chai, L., Li, N., Liu, T., Li, L., Xie, Z., et al. (2009). The GTPase Rab3b/3c-positive recycling vesicles are involved in cross-presentation in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15801–15806.

ANNEXES

ANNEXE 1

Liste des participations et présentations aux congrès

Sanofi assemblée générale 2016 Palais des congrès à Paris

Présentation de poster

CFCD : Club Francophones des Cellules Dendritiques 2015 Paris

SFI : Société Française d'Immunologie 2016 Paris

Assistante organisatrice

CFCD : Club Francophones des Cellules Dendritiques 2016 Paris

SFI : Société Française d'Immunologie 2017 Reims

Présentation de poster

CFCD : Club Francophones des Cellules Dendritiques 2017 Paris

Présentation orale (short talk) : Human inflammatory dendritic cells cross-present antigen using a non-cytosolic pathway

**Keystone Emerging Technologies in Vaccine Discovery and Development 2018 Canada
(28 Février 2018-1^{er} Février 2018)**

Présentation de poster

ANNEXE 2



Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages

Christel Goudot, Alice Coillard, Alexandra-Chloé Villani, Paul Gueguen, Adeline Cros, Siranush Sarkizova, Tsing-Lee Tang-Huau, Mylène Bohec, Sylvain Baulande, Nir Hacohen, et al.

► **To cite this version:**

Christel Goudot, Alice Coillard, Alexandra-Chloé Villani, Paul Gueguen, Adeline Cros, et al.. Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity*, Elsevier, 2017, 47 (3), pp.582 - 596.e6. <10.1016/j.immuni.2017.08.016>. <hal-01613828>

HAL Id: hal-01613828

Abdel Motal, U.M., Zhou, X., Joki, A., Siddiqi, A.R., Srinivasa, B.R., Stenvall, K., Dahmén, J., and Jondal, M. (1993). Major histocompatibility complex class I-binding peptides are recycled to the cell surface after internalization. *Eur. J. Immunol.* 23, 3224–3229.

Accapezzato, D., Visco, V., Francavilla, V., Molette, C., Donato, T., Paroli, M., Mondelli, M.U., Doria, M., Torrìsi, M.R., and Barnaba, V. (2005). Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 202, 817–828.

Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampé, R., and Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12889–12894.

Ackerman, A.L., Giodini, A., and Cresswell, P. (2006). A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25, 607–617.

- A-Gonzalez, N., Guillen, J.A., Gallardo, G., Diaz, M., de la Rosa, J.V., Hernandez, I.H., Casanova-Acebes, M., Lopez, F., Tabraue, C., Beceiro, S., et al. (2013). The nuclear receptor LXR α controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nat. Immunol.* *14*, 831–839.
- Ahrends, T., Spanjaard, A., Pilzecker, B., Bąbała, N., Bovens, A., Xiao, Y., Jacobs, H., and Borst, J. (2017). CD4⁺ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* *47*, 848–861.e5.
- Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R.A., Kaufmann, S.H.E., and Seiler, P. (2003). Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 1148–1155.
- Alatery, A., Siddiqui, S., Chan, M., Kus, A., Petrof, E.O., and Basta, S. (2010). Cross, but not direct, presentation of cell-associated virus antigens by spleen macrophages is influenced by their differentiation state. *Immunol. Cell Biol.* *88*, 3.
- Aldridge, J.R., Moseley, C.E., Boltz, D.A., Negovetich, N.J., Reynolds, C., Franks, J., Brown, S.A., Doherty, P.C., Webster, R.G., and Thomas, P.G. (2009). TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 5306–5311.
- Alloatti, A., Kotsias, F., Pauwels, A.-M., Carpier, J.-M., Jouve, M., Timmerman, E., Pace, L., Vargas, P., Maurin, M., Gehrman, U., et al. (2015). Toll-like Receptor 4 Engagement on Dendritic Cells Restrains Phago-Lysosome Fusion and Promotes Cross-Presentation of Antigens. *Immunity* *43*, 1087–1100.
- Alloatti, A., Rookhuizen, D.C., Joannas, L., Carpier, J.-M., Iborra, S., Magalhaes, J.G., Yatim, N., Kozik, P., Sancho, D., Albert, M.L., et al. (2017). Critical role for Sec22b-dependent antigen cross-presentation in antitumor immunity. *J. Exp. Med.* *214*, 2231–2241.
- Aoshi, T., Carrero, J.A., Konjufca, V., Koide, Y., Unanue, E.R., and Miller, M.J. (2009). The cellular niche of *Listeria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *Eur. J. Immunol.* *39*, 417–425.
- Arens, R., Schepers, K., Nolte, M.A., van Oosterwijk, M.F., van Lier, R.A.W., Schumacher, T.N.M., and van Oers, M.H.J. (2004). Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8⁺ T cell formation. *J. Exp. Med.* *199*, 1595–1605.
- Askenase, M.H., Han, S.-J., Byrd, A.L., Morais da Fonseca, D., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Konkell, J.E., Hand, T.W., Lacerda-Queiroz, N., Su, X., et al. (2015). Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity* *42*, 1130–1142.
- Aspord, C., Leloup, C., Reche, S., and Plumas, J. (2014). pDCs efficiently process synthetic long peptides to induce functional virus- and tumour-specific T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* *44*, 2880–2892.
- Backer, R., van Leeuwen, F., Kraal, G., and den Haan, J.M.M. (2008). CD8⁻ dendritic cells preferentially cross-present *Saccharomyces cerevisiae* antigens. *Eur. J. Immunol.* *38*, 370–380.
- Badrinath, S., Huyton, T., Blasczyk, R., and Bade-Doeding, C. (2014). HLA Class I Polymorphism and Tapasin Dependency.
- Baharom, F., Thomas, S., Rankin, G., Lepzien, R., Pourazar, J., Behndig, A.F., Ahlm, C., Blomberg, A., and Smed-Sörensen, A. (2016). Dendritic Cells and Monocytes with Distinct Inflammatory Responses

- Reside in Lung Mucosa of Healthy Humans. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *196*, 4498–4509.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* *15*, 929–937.
- Bakdash, G., Buschow, S.I., Gorris, M.A.J., Halilovic, A., Hato, S.V., Sköld, A.E., Schreiber, G., Sittig, S.P., Torensma, R., Duiveman-de Boer, T., et al. (2016). Expansion of a BDCA1+CD14+ Myeloid Cell Population in Melanoma Patients May Attenuate the Efficacy of Dendritic Cell Vaccines. *Cancer Res.* *76*, 4332–4346.
- 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. Baltim. Md* 1950 *193*, 1622–1635.
- Baleeiro, R.B., and Walden, P. (2017). Immature human DCs efficiently translocate endocytosed antigens into the cytosol for proteasomal processing. *Mol. Immunol.* *88*, 148–154.
- Baleeiro, R.B., Rietscher, R., Diedrich, A., Czaplewska, J.A., Lehr, C.-M., Scherließ, R., Hanefeld, A., Gottschaldt, M., and Walden, P. (2015). Spatial separation of the processing and MHC class I loading compartments for cross-presentation of the tumor-associated antigen HER2/neu by human dendritic cells. *Oncoimmunology* *4*, e1047585.
- Ballesteros-Tato, A., León, B., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2010). Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8(+) T cell responses to influenza. *Nat. Immunol.* *11*, 216–224.
- Basha, G., Lizée, G., Reinicke, A.T., Seipp, R.P., Omilusik, K.D., and Jefferies, W.A. (2008). MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS One* *3*, e3247.
- Basha, G., Omilusik, K., Chavez-Steenbock, A., Reinicke, A.T., Lack, N., Choi, K.B., and Jefferies, W.A. (2012). A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nat. Immunol.* *13*, 237–245.
- Beauchamp, N.M., Busick, R.Y., and Alexander-Miller, M.A. (2010). Functional divergence among CD103+ dendritic cell subpopulations following pulmonary poxvirus infection. *J. Virol.* *84*, 10191–10199.
- Becher, B., Schlitzer, A., Chen, J., Mair, F., Sumatoh, H.R., Teng, K.W.W., Low, D., Ruedl, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Poidinger, M., et al. (2014). High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nat. Immunol.* *15*, 1181–1189.
- Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., et al. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* *10*, 488–495.
- Belizaire, R., and Unanue, E.R. (2009). Targeting proteins to distinct subcellular compartments reveals unique requirements for MHC class I and II presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17463–

17468.

Belz, G.T., Smith, C.M., Eichner, D., Shortman, K., Karupiah, G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004). Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 1996–2000.

Belz, G.T., Shortman, K., Bevan, M.J., and Heath, W.R. (2005). CD8alpha+ dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 196–200.

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

Bernhard, C.A., Ried, C., Kochanek, S., and Brocker, T. (2015). CD169+ macrophages are sufficient for priming of CTLs with specificities left out by cross-priming dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 5461–5466.

Bertholet, S., Goldszmid, R., Morrot, A., Debrabant, A., Afrin, F., Collazo-Custodio, C., Houde, M., Desjardins, M., Sher, A., and Sacks, D. (2006). Leishmania Antigens Are Presented to CD8+ T Cells by a Transporter Associated with Antigen Processing-Independent Pathway In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* *177*, 3525–3533.

Bevan, M.J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* *143*, 1283–1288.

Bevan, M.J. (2010). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. 1976. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 1361–1366.

Bianchi, R., Grohmann, U., Vacca, C., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (1999). Autocrine IL-12 is involved in dendritic cell modulation via CD40 ligation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 2517–2521.

Bigley, V., and Collin, M. (2011). Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new GATA-2 dependent myelodysplastic syndrome. *Haematologica* *96*, 1081–1083.

Bigley, V., Haniffa, M., Doulatov, S., Wang, X.-N., Dickinson, R., McGovern, N., Jardine, L., Pagan, S., Dimmick, I., Chua, I., et al. (2011). The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J. Exp. Med.* *208*, 227–234.

Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 443–473.

Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., et al. (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* *31*, 513–525.

Boring, L., Gosling, J., Chensue, S.W., Kunkel, S.L., Farese, R.V., Broxmeyer, H.E., and Charo, I.F. (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* *100*, 2552–2561.

- Bougnères, L., Helft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B.H.-J., Chan, L., Campisi, L., Lauvau, G., Hugues, S., Kumar, P., et al. (2009). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* *31*, 232–244.
- Boyer, A., Andreu, G., Romet-Lemonne, J.L., Fridman, W.H., and Teillaud, J.L. (1999). Generation of phagocytic MAK and MAC-DC for therapeutic use: characterization and in vitro functional properties. *Exp. Hematol.* *27*, 751–761.
- Braun, A., Worbs, T., Moschovakis, G.L., Halle, S., Hoffmann, K., Bölter, J., Münk, A., and Förster, R. (2011). Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nat. Immunol.* *12*, 879–887.
- Breton, G., Lee, J., Zhou, Y.J., Schreiber, J.J., Keler, T., Puhr, S., Anandasabapathy, N., Schlesinger, S., Caskey, M., Liu, K., et al. (2015a). Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *212*, 401–413.
- Breton, G., Lee, J., Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2015b). Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry. *Nat. Protoc.* *10*, 1407.
- Breton, G., Zheng, S., Valieris, R., Tojal da Silva, I., Satija, R., and Nussenzweig, M.C. (2016). Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c+ or CD141+ DCs. *J. Exp. Med.* *213*, 2861–2870.
- Brodin, P., and Davis, M.M. (2017). Human immune system variation. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 21–29.
- Bsat, M., Chapuy, L., Baba, N., Rubio, M., Panzini, B., Wassef, R., Richard, C., Soucy, G., Mehta, H., and Sarfati, M. (2015). Differential accumulation and function of proinflammatory 6-sulfo LacNAc dendritic cells in lymph node and colon of Crohn's versus ulcerative colitis patients. *J. Leukoc. Biol.* *98*, 671–681.
- Buchrieser, J., James, W., and Moore, M.D. (2017). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Macrophages Share Ontogeny with MYB-Independent Tissue-Resident Macrophages. *Stem Cell Rep.* *8*, 334–345.
- Buhlmann, J.E., Gonzalez, M., Ginther, B., Panoskaltsis-Mortari, A., Blazar, B.R., Greiner, D.L., Rossini, A.A., Flavell, R., and Noelle, R.J. (1999). Cutting edge: sustained expansion of CD8+ T cells requires CD154 expression by Th cells in acute graft versus host disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 4373–4376.
- Bullock, T.N.J., and Yagita, H. (2005). Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 710–717.
- Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., and Kurts, C. (2006). The Mannose Receptor Mediates Uptake of Soluble but Not of Cell-Associated Antigen for Cross-Presentation. *J. Immunol.* *176*, 6770–6776.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* *316*, 612–616.
- Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R., and Kurts, C. (2008). Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol.* *9*, 558–566.

- Bursch, L.S., Rich, B.E., and Hogquist, K.A. (2009). Langerhans cells are not required for the CD8 T cell response to epidermal self-antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 4657–4664.
- Buseyne, F., Le Gall, S., Boccaccio, C., Abastado, J.P., Lifson, J.D., Arthur, L.O., Rivière, Y., Heard, J.M., and Schwartz, O. (2001). MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nat. Med.* *7*, 344–349.
- Calabro, S., Tortoli, M., Baudner, B.C., Pacitto, A., Cortese, M., O'Hagan, D.T., De Gregorio, E., Seubert, A., and Wack, A. (2011). Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* *29*, 1812–1823.
- Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (2001). 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* *20*, 2357–2366.
- Cebrian, I., Visentin, G., Blanchard, N., Jouve, M., Bobard, A., Moita, C., Enninga, J., Moita, L.F., Amigorena, S., and Savina, A. (2011). Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* *147*, 1355–1368.
- Cebrian, I., Croce, C., Guerrero, N.A., Blanchard, N., and Mayorga, L.S. (2016). Rab22a controls MHC-I intracellular trafficking and antigen cross-presentation by dendritic cells. *EMBO Rep.* *17*, 1753–1765.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* *5*, 919–923.
- Cepika, A.-M., Banchereau, R., Segura, E., Ohouo, M., Cantarel, B., Goller, K., Cantrell, V., Ruchaud, E., Gatewood, E., Nguyen, P., et al. (2017). A multidimensional blood stimulation assay reveals immune alterations underlying systemic juvenile idiopathic arthritis. *J. Exp. Med.* *214*, 3449–3466.
- Cerovic, V., Houston, S.A., Westlund, J., Utriainen, L., Davison, E.S., Scott, C.L., Bain, C.C., Joeris, T., Agace, W.W., Kroczeck, R.A., et al. (2015). Lymph-borne CD8 α ⁺ dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8⁺ T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol.* *8*, 38–48.
- Cervantes-Barragan, L., Lewis, K.L., Firner, S., Thiel, V., Hugues, S., Reith, W., Ludewig, B., and Reizis, B. (2012). Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3012–3017.
- Chang, Y.-H., Wang, K.C., Chu, K.-L., Clouthier, D.L., Tran, A.T., Torres Perez, M.S., Zhou, A.C., Abdul-Sater, A.A., and Watts, T.H. (2017). Dichotomous Expression of TNF Superfamily Ligands on Antigen-Presenting Cells Controls Post-priming Anti-viral CD4⁺ T Cell Immunity. *Immunity* *47*, 943–958.e9.
- Chapman, H.A., Riese, R.J., and Shi, G.P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* *59*, 63–88.
- Chen, L., and Jondal, M. (2008). Brefeldin A inhibits vesicular MHC class I processing in resting but not in CpG- and disruption-activated DC. *Mol. Immunol.* *46*, 158–165.

- Chiang, M.-C., Tullett, K.M., Lee, Y.S., Idris, A., Ding, Y., McDonald, K.J., Kassianos, A., Leal Rojas, I.M., Jeet, V., Lahoud, M.H., et al. (2016). Differential uptake and cross-presentation of soluble and necrotic cell antigen by human DC subsets. *Eur. J. Immunol.* *46*, 329–339.
- Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A., Lane, W.S., and Strominger, J.L. (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* *178*, 27–47.
- Ciechanover, A., Hod, Y., and Hershko, A. (2012). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. 1978. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *425*, 565–570.
- Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N.S., Kant, S.G., et al. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* *135*, 37–48.
- Contreras, V., Urien, C., Guiton, R., Alexandre, Y., Manh, T.-P.V., Andrieu, T., Crozat, K., Jouneau, L., Bertho, N., Epardaud, M., et al. (2010). Existence of CD8 α -Like Dendritic Cells with a Conserved Functional Specialization and a Common Molecular Signature in Distant Mammalian Species. *J. Immunol.* *185*, 3313–3325.
- Crespo, M.I., Zacca, E.R., Núñez, N.G., Ranocchia, R.P., Maccioni, M., Maletto, B.A., Pistoiresi-Palencia, M.C., and Morón, G. (2013). TLR7 triggering with polyuridylic acid promotes cross-presentation in CD8 α ⁺ conventional dendritic cells by enhancing antigen preservation and MHC class I antigen permanence on the dendritic cell surface. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 948–960.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., and Diedrich, G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* *172*, 21–28.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., et al. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* *33*, 375–386.
- Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.-P., Fossum, E., Luche, H., Ardouin, L., Guilliams, M., Azukizawa, H., Bogen, B., Malissen, B., et al. (2011). Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8 α ⁺ type. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 4411–4415.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J. Exp. Med.* *197*, 1141–1151.
- Cwiklik, L., and Jungwirth, P. (2010). Massive oxidation of phospholipid membranes leads to pore creation and bilayer disintegration. *Chem. Phys. Lett.* *486*, 99–103.
- Datta, S.K., Redecke, V., Prilliman, K.R., Takabayashi, K., Corr, M., Tallant, T., DiDonato, J., Dziarski, R., Akira, S., Schoenberger, S.P., et al. (2003). A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4102–4110.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* *14*, 986–995.

- De Jager, P.L., Hacohen, N., Mathis, D., Regev, A., Stranger, B.E., and Benoist, C. (2015). ImmVar project: Insights and design considerations for future studies of “healthy” immune variation. *Semin. Immunol.* *27*, 51–57.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* *307*, 1630–1634.
- Desch, A.N., Randolph, G.J., Murphy, K., Gautier, E.L., Kedl, R.M., Lahoud, M.H., Caminschi, I., Shortman, K., Henson, P.M., and Jakubzick, C.V. (2011). CD103⁺ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *J. Exp. Med.* *208*, 1789–1797.
- Desch, A.N., Gibbings, S.L., Clambey, E.T., Janssen, W.J., Slansky, J.E., Kedl, R.M., Henson, P.M., and Jakubzick, C. (2014). Dendritic cell subsets require cis-activation for cytotoxic CD8 T-cell induction. *Nat. Commun.* *5*, 4674.
- Desch, A.N., Gibbings, S.L., Goyal, R., Kolde, R., Bednarek, J., Bruno, T., Slansky, J.E., Jacobelli, J., Mason, R., Ito, Y., et al. (2016). Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Phagocytes in Nondiseased Human Lung and Lung-Draining Lymph Nodes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *193*, 614–626.
- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sørensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., and Connolly, J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol.* *9*, 551–557.
- Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., et al. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.* *208*, 1989–2003.
- Didierlaurent, A.M., Morel, S., Lockman, L., Giannini, S.L., Bisteau, M., Carlsen, H., Kielland, A., Vosters, O., Vanderheyde, N., Schiavetti, F., et al. (2009). AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 6186–6197.
- Diehl, L., van Mierlo, G.J.D., den Boer, A.T., van der Voort, E., Fransen, M., van Bostelen, L., Krimpenfort, P., Melief, C.J.M., Mittler, R., Toes, R.E.M., et al. (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 3755–3762.
- Ding, Y., Guo, Z., Liu, Y., Li, X., Zhang, Q., Xu, X., Gu, Y., Zhang, Y., Zhao, D., and Cao, X. (2016). The lectin Siglec-G inhibits dendritic cell cross-presentation by impairing MHC class I-peptide complex formation. *Nat. Immunol.* *17*, 1167–1175.
- Dingjan, I., Verboogen, D.R., Paardekooper, L.M., Revelo, N.H., Sittig, S.P., Visser, L.J., Mollard, G.F. von, Henriët, S.S., Figdor, C.G., Ter Beest, M., et al. (2016). Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation. *Sci. Rep.* *6*, 22064.
- Dinter, J., Duong, E., Lai, N.Y., Berberich, M.J., Kourjian, G., Bracho-Sanchez, E., Chu, D., Su, H., Zhang, S.C., and Gall, S.L. (2015). Variable Processing and Cross-presentation of HIV by Dendritic Cells

- and Macrophages Shapes CTL Immunodominance and Immune Escape. *PLoS Pathog.* *11*.
- Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.-W., Park, C.G., et al. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* *315*, 107–111.
- Duluc, D., Gannevat, J., Anguiano, E., Zurawski, S., Carley, M., Boreham, M., Stecher, J., Dullaers, M., Banchereau, J., and Oh, S. (2013). Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T-cell responses. *Mucosal Immunol.* *6*, 626–638.
- Dutertre, C.-A., Jourdain, J.-P., Rancez, M., Amraoui, S., Fossum, E., Bogen, B., Sanchez, C., Couëdel-Courteille, A., Richard, Y., Dalod, M., et al. (2014). TLR3-responsive, XCR1+, CD141(BDCA-3)+/CD8 α + equivalent dendritic cells uncovered in healthy and simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 4697–4708.
- Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., et al. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α + conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 823–836.
- Eguíluz-Gracia, I., Bosco, A., Dollner, R., Melum, G.R., Lexberg, M.H., Jones, A.C., Dheyauldeen, S.A., Holt, P.G., Bækkevold, E.S., and Jahnsen, F.L. (2016). Rapid recruitment of CD14(+) monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* *137*, 1872–1881.e12.
- Elsen, S., Doussière, J., Villiers, C.L., Faure, M., Berthier, R., Papaioannou, A., Grandvaux, N., Marche, P.N., and Vignais, P.V. (2004). Cryptic O₂-generating NADPH oxidase in dendritic cells. *J. Cell Sci.* *117*, 2215–2226.
- Firat, E., Saveanu, L., Aichele, P., Staeheli, P., Huai, J., Gaedicke, S., Nil, A., Besin, G., Kanzler, B., Endert, P. van, et al. (2007). The Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Aminopeptidase 1 in Immunity to Infection and in Cross-Presentation. *J. Immunol.* *178*, 2241–2248.
- Flinsenberg, T.W.H., Compeer, E.B., Koning, D., Klein, M., Amelung, F.J., van Baarle, D., Boelens, J.J., and Boes, M. (2012). Fc γ receptor antigen targeting potentiates cross-presentation by human blood and lymphoid tissue BDCA-3+ dendritic cells. *Blood* *120*, 5163–5172.
- da Fonseca, P.C.A., He, J., and Morris, E.P. (2012). Molecular model of the human 26S proteasome. *Mol. Cell* *46*, 54–66.
- Fonteneau, J.F., Kavanagh, D.G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T.L., Bhardwaj, N., and Larsson, M. (2003). Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* *102*, 4448–4455.
- van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. (1972). [Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line]. *Bull. World Health Organ.* *47*, 651–658.
- Gabriele, L., Borghi, P., Rozera, C., Sestili, P., Andreotti, M., Guarini, A., Montefusco, E., Foà, R., and Belardelli, F. (2004). IFN-alpha promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leukemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS

treatment. *Blood* 103, 980–987.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J.M., and Desjardins, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119–131.

Gale, R.P., Sparkes, R.S., and Golde, D.W. (1978). Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science* 201, 937–938.

Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* 13, 1118–1128.

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

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656–661.

GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., et al. (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 1621–1634.

Giannini, S.L., Hanon, E., Moris, P., Van Mechelen, M., Morel, S., Dessy, F., Fourneau, M.A., Colau, B., Suzich, J., Losonksy, G., et al. (2006). Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 24, 5937–5949.

Gil-Torregrosa, B.C., Lennon-Duménil, A.M., Kessler, B., Guermonprez, P., Ploegh, H.L., Fruci, D., van Endert, P., and Amigorena, S. (2004). Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 34, 398–407.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404.

Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., et al. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* 206, 3115–3130.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845.

Giodini, A., and Cresswell, P. (2008). Hsp90-mediated cytosolic refolding of exogenous proteins internalized by dendritic cells. *EMBO J.* 27, 201–211.

Girotti, A.W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529–1542.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet,

- C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* *518*, 547–551.
- Gordon, S. (1998). The role of the macrophage in immune regulation. *Res. Immunol.* *149*, 685–688.
- Gosselin, D., Link, V., Romanoski, C.E., Fonseca, G.J., Eichenfield, D.Z., Spann, N.J., Stender, J.D., Chun, H.B., Garner, H., Geissmann, F., et al. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* *159*, 1327.
- Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.-C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.-L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* *47*, 582–596.e6.
- Graham, D.B., Stephenson, L.M., Lam, S.K., Brim, K., Lee, H.M., Bautista, J., Gilfillan, S., Akilesh, S., Fujikawa, K., and Swat, W. (2007). An ITAM-signaling pathway controls cross-presentation of particulate but not soluble antigens in dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 2889–2897.
- Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kündig, T.M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., et al. (2012a). Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity* *37*, 1050–1060.
- Greter, M., Helft, J., Chow, A., Hashimoto, D., Mortha, A., Agudo-Cantero, J., Bogunovic, M., Gautier, E.L., Miller, J., Leboeuf, M., et al. (2012b). GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* *36*, 1031–1046.
- Grimm, M.C., Pullman, W.E., Bennett, G.M., Sullivan, P.J., Pavli, P., and Doe, W.F. (1995). Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 387–395.
- Grommé, M., Uytdehaag, F.G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R.S., Kenter, M.J., Tulp, A., Verwoerd, D., and Neefjes, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 10326–10331.
- Grotzke, J.E., and Cresswell, P. (2015). Are ERAD components involved in cross-presentation? *Mol. Immunol.* *68*, 112–115.
- Grotzke, J.E., Kozik, P., Morel, J.-D., Impens, F., Pietrosevoli, N., Cresswell, P., Amigorena, S., and Demangel, C. (2017). Sec61 blockade by mycolactone inhibits antigen cross-presentation independently of endosome-to-cytosol export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E5910–E5919.
- Grufman, P., and Kärre, K. (2000). Innate and adaptive immunity to tumors: IL-12 is required for optimal responses. *Eur. J. Immunol.* *30*, 1088–1093.
- Guermonez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* *425*, 397–402.
- Guillerme, J.-B., Boisgerault, N., Roulois, D., Ménager, J., Combredet, C., Tangy, F., Fonteneau, J.-F., and Gregoire, M. (2013). Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-

- presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 1147–1158.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 571–578.
- Guttman-Yassky, E., Lowes, M.A., Fuentes-Duculan, J., Whynot, J., Novitskaya, I., Cardinale, I., Haider, A., Khatcherian, A., Carucci, J.A., Bergman, R., et al. (2007). Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *119*, 1210–1217.
- Haan, J.M.M. den, Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). Cd8⁺ but Not Cd8⁻ Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *J. Exp. Med.* *192*, 1685–1696.
- den Haan, J.M.M., and Bevan, M.J. (2002). Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *196*, 817–827.
- Haldar, M., Kohyama, M., So, A.Y.-L., Kc, W., Wu, X., Briseño, C.G., Satpathy, A.T., Kretzer, N.M., Arase, H., Rajasekaran, N.S., et al. (2014). Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell* *156*, 1223–1234.
- Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, J., Bigley, V., Boisson-Dupuis, S., Azevedo, J., Fortin, A., Haniffa, M., Ceron-Gutierrez, L., Bacon, C.M., et al. (2011). IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* *365*, 127–138.
- Hammer, G.E., Gonzalez, F., Champsaur, M., Cado, D., and Shastri, N. (2006). The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat. Immunol.* *7*, 103–112.
- Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.-N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., Bullock, S., Grisotto, M., Booth, T., Taub, P., et al. (2009). Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* *206*, 371–385.
- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* *37*, 60–73.
- Hänsel, A., Günther, C., Ingwersen, J., Starke, J., Schmitz, M., Bachmann, M., Meurer, M., Rieber, E.P., and Schäkel, K. (2011). Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong Th17/Th1 T-cell responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* *127*, 787–794.e9.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* *38*.
- Heidkamp, G.F., Sander, J., Lehmann, C.H.K., Heger, L., Eissing, N., Baranska, A., Lühr, J.J., Hoffmann, A., Reimer, K.C., Lux, A., et al. (2016). Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Sci. Immunol.* *1*, eaai7677.

- Helft, J., Manicassamy, B., Guernonprez, P., Hashimoto, D., Silvin, A., Agudo, J., Brown, B.D., Schmolke, M., Miller, J.C., Leboeuf, M., et al. (2012). Cross-presenting CD103⁺ dendritic cells are protected from influenza virus infection. *J. Clin. Invest.* *122*, 4037–4047.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., and Akira, S. (2003). The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 3059–3064.
- Hendriks, J., Xiao, Y., and Borst, J. (2003). CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J. Exp. Med.* *198*, 1369–1380.
- Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guilliams, M., de Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., et al. (2010). CD207⁺ CD103⁺ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* *207*, 189–206.
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* *14*, 821–830.
- 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 CD8 α ⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* *322*, 1097–1100.
- Hoeffel, G., Ripoche, A.-C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.-G., Gannagé, M., Caillat-Zucman, S., et al. (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* *27*, 481–492.
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* *209*, 1167–1181.
- Hofer, T.P., Zawada, A.M., Frankenberger, M., Skokann, K., Satz, A.A., Gesierich, W., Schuberth, M., Levin, J., Danek, A., Rotter, B., et al. (2015). slan-defined subsets of CD16-positive monocytes: impact of granulomatous inflammation and M-CSF receptor mutation. *Blood* *126*, 2601–2610.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* *9*, 847–856.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* *425*, 402–406.
- Hunt, D.F., Michel, H., Dickinson, T.A., Shabanowitz, J., Cox, A.L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H.M., and Sette, A. (1992). Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* *256*, 1817–1820.
- Iannaccone, M., Moseman, E.A., Tonti, E., Bosurgi, L., Junt, T., Henrickson, S.E., Whelan, S.P., Guidotti, L.G., and von Andrian, U.H. (2010). Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. *Nature* *465*, 1079–1083.

- Iborra, S., Izquierdo, H.M., Martínez-López, M., Blanco-Menéndez, N., Reis e Sousa, C., and Sancho, D. (2012). The DC receptor DNNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 1628–1643.
- Igyártó, B.Z., Haley, K., Ortner, D., Bobr, A., Gerami-Nejad, M., Edelson, B.T., Zurawski, S.M., Malissen, B., Zurawski, G., Berman, J., et al. (2011). Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity* *35*, 260–272.
- Imai, T., Kato, Y., Kajiwara, C., Mizukami, S., Ishige, I., Ichiyanagi, T., Hikida, M., Wang, J.-Y., and Udono, H. (2011). Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16363–16368.
- Imler, J.-L., and Hoffmann, J.A. (2003). Toll signaling: the TIREless quest for specificity. *Nat. Immunol.* *4*, 105–106.
- Ingersoll, M.A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E.L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., et al. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* *115*, e10-19.
- Ippolito, G.C., Dekker, J.D., Wang, Y.-H., Lee, B.-K., Shaffer, A.L., Lin, J., Wall, J.K., Lee, B.-S., Staudt, L.M., Liu, Y.-J., et al. (2014). Dendritic cell fate is determined by BCL11A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E998-1006.
- Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2001). Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 2961–2969.
- Jancic, C., Savina, A., Wasmeier, C., Tolmachova, T., El-Benna, J., Dang, P.M.-C., Pascolo, S., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Raposo, G., Seabra, M.C., et al. (2007). Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat. Cell Biol.* *9*, 367–378.
- Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P. (2003). CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* *421*, 852–856.
- Jenner, W., Motwani, M., Veighey, K., Newson, J., Audzevich, T., Nicolaou, A., Murphy, S., Macallister, R., and Gilroy, D.W. (2014). Characterisation of leukocytes in a human skin blister model of acute inflammation and resolution. *PloS One* *9*, e89375.
- Ji, Q., Castelli, L., and Goverman, J.M. (2013). MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* *14*, 254–261.
- 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. *J. Exp. Med.* *207*, 1247–1260.
- Joseph, S.B., Bradley, M.N., Castrillo, A., Bruhn, K.W., Mak, P.A., Pei, L., Hogenesch, J., O'connell, R.M., Cheng, G., Saez, E., et al. (2004). LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* *119*, 299–309.
- Junt, T., Moseman, E.A., Iannaccone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E.,

- Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., et al. (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* *450*, 110–114.
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M.T., Sugita, A., Koganei, K., et al. (2008). Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J. Clin. Invest.* *118*, 2269–2280.
- Kamphorst, A.O., Guermonprez, P., Dudziak, D., and Nussenzweig, M.C. (2010). Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 3426–3435.
- Karlsson, K.R., Cowley, S., Martinez, F.O., Shaw, M., Minger, S.L., and James, W. (2008). Homogeneous monocytes and macrophages from human embryonic stem cells following coculture-free differentiation in M-CSF and IL-3. *Exp. Hematol.* *36*, 1167–1175.
- Kashiwada, M., Pham, N.-L.L., Pewe, L.L., Harty, J.T., and Rothman, P.B. (2011). NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 α ⁺ dendritic cell development. *Blood* *117*, 6193–6197.
- Kastenmüller, W., Torabi-Parizi, P., Subramanian, N., Lämmermann, T., and Germain, R.N. (2012). A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread. *Cell* *150*, 1235–1248.
- Kawamura, S., Onai, N., Miya, F., Sato, T., Tsunoda, T., Kurabayashi, K., Yotsumoto, S., Kuroda, S., Takenaka, K., Akashi, K., et al. (2017). Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs. *Immunity* *46*, 835–848.e4.
- Klaas, M., and Crocker, P.R. (2012). Sialoadhesin in recognition of self and non-self. *Semin. Immunopathol.* *34*, 353–364.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., et al. (2008). Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity* *29*, 497–510.
- Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* *457*, 318–321.
- Kool, M., Soullié, T., van Nimwegen, M., Willart, M.A.M., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* *205*, 869–882.
- Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* *267*, 243–246.
- Kretzer, N.M., Theisen, D.J., Tussiwand, R., Briseño, C.G., Grajales-Reyes, G.E., Wu, X., Durai, V., Albring, J., Bagadia, P., Murphy, T.L., et al. (2016). RAB43 facilitates cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *213*, 2871–2883.
- Kubiczkova, L., Pour, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., and Sevcikova, S. (2014). Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J. Cell. Mol. Med.* *18*, 947–961.

- Kumaraguru, U., Banerjee, K., and Rouse, B.T. (2005). In vivo rescue of defective memory CD8⁺ T cells by cognate helper T cells. *J. Leukoc. Biol.* *78*, 879–887.
- Langlet, C., Tamoutounour, S., Henri, S., Luche, H., Ardouin, L., Grégoire, C., Malissen, B., and Guillemins, M. (2012). CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 1751–1760.
- Laoui, D., Keirsse, J., Morias, Y., Van Overmeire, E., Geeraerts, X., Elkrim, Y., Kiss, M., Bolli, E., Lahmar, Q., Sichien, D., et al. (2016). The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat. Commun.* *7*, 13720.
- Lapenta, C., Santini, S.M., Spada, M., Donati, S., Urbani, F., Accapezzato, D., Franceschini, D., Andreotti, M., Barnaba, V., and Belardelli, F. (2006). IFN- α -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2046–2060.
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell* *159*, 1312.
- Lavin, Y., Kobayashi, S., Leader, A., Amir, E.-A.D., Elefant, N., Bigenwald, C., Remark, R., Sweeney, R., Becker, C.D., Levine, J.H., et al. (2017). Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* *169*, 750–765.e17.
- Lawand, M., Abramova, A., Manceau, V., Springer, S., and van Endert, P. (2016). TAP-Dependent and -Independent Peptide Import into Dendritic Cell Phagosomes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *197*, 3454–3463.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* *4*, 1009–1015.
- Lee, B.O., Hartson, L., and Randall, T.D. (2003). CD40-deficient, influenza-specific CD8 memory T cells develop and function normally in a CD40-sufficient environment. *J. Exp. Med.* *198*, 1759–1764.
- Lee, H.K., Zamora, M., Linehan, M.M., Iijima, N., Gonzalez, D., Haberman, A., and Iwasaki, A. (2009). Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. *J. Exp. Med.* *206*, 359–370.
- Lee, J., Breton, G., Oliveira, T.Y.K., Zhou, Y.J., Aljoufi, A., Pühr, S., Cameron, M.J., Sékaly, R.-P., Nussenzweig, M.C., and Liu, K. (2015). Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J. Exp. Med.* *212*, 385–399.
- van Leeuwen-Kerkhoff, N., Lundberg, K., Westers, T.M., Kordasti, S., Bontkes, H.J., de Gruijl, T.D., Lindstedt, M., and van de Loosdrecht, A.A. (2017). Transcriptional profiling reveals functional dichotomy between human slan⁺ non-classical monocytes and myeloid dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* *102*, 1055–1068.
- Leibowitz, M.E., and Johnson, M.C. (1971). Relation of lipid peroxidation to loss of cations trapped in

liposomes. *J. Lipid Res.* *12*, 662–670.

Lewis, K.L., Caton, M.L., Bogunovic, M., Greter, M., Grajkowska, L.T., Ng, D., Klinakis, A., Charo, I.F., Jung, S., Gommerman, J.L., et al. (2011). Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* *35*, 780–791.

Liao, C.-T., Andrews, R., Wallace, L.E., Khan, M.W.A., Kift-Morgan, A., Topley, N., Fraser, D.J., and Taylor, P.R. (2017). Peritoneal macrophage heterogeneity is associated with different peritoneal dialysis outcomes. *Kidney Int.* *91*, 1088–1103.

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

Liston, A., Carr, E.J., and Linterman, M.A. (2016). Shaping Variation in the Human Immune System. *Trends Immunol.* *37*, 637–646.

Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., and Nussenzweig, M. (2007). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat. Immunol.* *8*, 578–583.

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

Lizée, G., Basha, G., Tiong, J., Julien, J.-P., Tian, M., Biron, K.E., and Jefferies, W.A. (2003). Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol.* *4*, 1065–1073.

Ljunggren, H.G., Stam, N.J., Ohlén, C., Neefjes, J.J., Höglund, P., Heemels, M.T., Bastin, J., Schumacher, T.N., Townsend, A., and Kärre, K. (1990). Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* *346*, 476–480.

Lu, Z., Yuan, L., Zhou, X., Sotomayor, E., Levitsky, H.I., and Pardoll, D.M. (2000). CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8⁽⁺⁾ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *191*, 541–550.

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

Ma, W., Zhang, Y., Vigneron, N., Stroobant, V., Thielemans, K., Bruggen, P. van der, and Eynde, B.J.V. den (2016). Long-Peptide Cross-Presentation by Human Dendritic Cells Occurs in Vacuoles by Peptide Exchange on Nascent MHC Class I Molecules. *J. Immunol.* *196*, 1711–1720.

Ma, Y., Adjemian, S., Mattarollo, S.R., Yamazaki, T., Aymeric, L., Yang, H., Portela Catani, J.P., Hannani, D., Duret, H., Steegh, K., et al. (2013). Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity* *38*, 729–741.

MacLeod, M.K.L., McKee, A.S., David, A., Wang, J., Mason, R., Kappler, J.W., and Murrack, P. (2011). Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7914–7919.

Mantegazza, A.R., Savina, A., Vermeulen, M., Pérez, L., Geffner, J., Hermine, O., Rosenzweig, S.D.,

- Faure, F., and Amigorena, S. (2008). NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* 112, 4712–4722.
- Marquet, F., Vu Manh, T.-P., Maisonnasse, P., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Bouguyon, E., Jouneau, L., Bourge, M., Simon, G., Ezquerra, A., et al. (2014). Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 5883–5893.
- Martínez-Cingolani, C., Grandclaudon, M., Jeanmougin, M., Jouve, M., Zollinger, R., and Soumelis, V. (2014). Human blood BDCA-1 dendritic cells differentiate into Langerhans-like cells with thymic stromal lymphopoietin and TGF- β . *Blood* 124, 2411–2420.
- Maschalidi, S., Nunes-Hasler, P., Nascimento, C.R., Sallent, I., Lannoy, V., Garfa-Traore, M., Cagnard, N., Sepulveda, F.E., Vargas, P., Lennon-Duménil, A.-M., et al. (2017). UNC93B1 interacts with the calcium sensor STIM1 for efficient antigen cross-presentation in dendritic cells. *Nat. Commun.* 8, 1640.
- Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Günther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C.E., Händler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., et al. (2016). Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353.
- Matheoud, D., Moradin, N., Bellemare-Pelletier, A., Shio, M.T., Hong, W.J., Olivier, M., Gagnon, E., Desjardins, M., and Descoteaux, A. (2013). Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe* 14, 15–25.
- Maurer, T., Heit, A., Hochrein, H., Ampenberger, F., O’Keeffe, M., Bauer, S., Lipford, G.B., Vabulas, R.M., and Wagner, H. (2002). CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32, 2356–2364.
- McGovern, N., Schlitzer, A., Gunawan, M., Jardine, L., Shin, A., Poyner, E., Green, K., Dickinson, R., Wang, X.-N., Low, D., et al. (2014). Human dermal CD14⁺ cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity* 41, 465–477.
- McIlroy, D., Troadec, C., Grassi, F., Samri, A., Barrou, B., Autran, B., Debré, P., Feuillard, J., and Hosmalin, A. (2001). Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood* 97, 3470–3477.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298–300.
- Ménager, J., Ebstein, F., Oger, R., Hulin, P., Nedellec, S., Duverger, E., Lehmann, A., Kloetzel, P.-M., Jotereau, F., and Guilloux, Y. (2014). Cross-presentation of synthetic long peptides by human dendritic cells: a process dependent on ERAD component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1. *PloS One* 9, e89897.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604.
- Mildner, A., Yona, S., and Jung, S. (2013). A close encounter of the third kind: monocyte-derived cells.

Adv. Immunol. *120*, 69–103.

Mildner, A., Schönheit, J., Giladi, A., David, E., Lara-Astiaso, D., Lorenzo-Vivas, E., Paul, F., Chappell-Maor, L., Priller, J., Leutz, A., et al. (2017). Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP β Transcription Factor Dependence of Ly6C⁻ Cells. *Immunity* *46*, 849–862.e7.

Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jovic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., et al. (2012). Deciphering the transcriptional network of the DC lineage. *Nat. Immunol.* *13*, 888.

Milne, P., Bigley, V., Gunawan, M., Haniffa, M., and Collin, M. (2015). CD1c⁺ blood dendritic cells have Langerhans cell potential. *Blood* *125*, 470–473.

Mittag, D., Proietto, A.I., Loudovaris, T., Mannering, S.I., Vremec, D., Shortman, K., Wu, L., and Harrison, L.C. (2011). Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 6207–6217.

Miyara, M., Chader, D., Sage, E., Sugiyama, D., Nishikawa, H., Bouvry, D., Claër, L., Hingorani, R., Balderas, R., Rohrer, J., et al. (2015). Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3^{high} regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 7225–7230.

Moffat, J.M., Segura, E., Khoury, G., Caminschi, I., Cameron, P.U., Lewin, S.R., Villadangos, J.A., and Mintern, J.D. (2013). Targeting antigen to bone marrow stromal cell-2 expressed by conventional and plasmacytoid dendritic cells elicits efficient antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* *43*, 595–605.

Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P.K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Pinto, A.R., Klapproth, K., Henri, S., Malissen, B., et al. (2014). Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* *211*, 2151–2158.

Morandi, B., Bonaccorsi, I., Mesiti, M., Conte, R., Carrega, P., Costa, G., Iemmo, R., Martini, S., Ferrone, S., Cantoni, C., et al. (2013). Characterization of human afferent lymph dendritic cells from seroma fluids. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 4858–4866.

Mouriès, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G., and Leclerc, C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* *112*, 3713–3722.

Müller-Taubenberger, A., Lupas, A.N., Li, H., Ecke, M., Simmeth, E., and Gerisch, G. (2001). Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J.* *20*, 6772–6782.

Nagasawa, M., Schmidlin, H., Hazekamp, M.G., Schotte, R., and Blom, B. (2008). Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B. *Eur. J. Immunol.* *38*, 2389–2400.

Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O’Keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.* *7*, 663–671.

Nair-Gupta, P., Baccarini, A., Tung, N., Seyffer, F., Florey, O., Huang, Y., Banerjee, M., Overholtzer, M., Roche, P.A., Tampé, R., et al. (2014). TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* *158*, 506–521.

- Neefjes, J., Jongasma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 823–836.
- Nestle, F.O., Zheng, X.G., Thompson, C.B., Turka, L.A., and Nickoloff, B.J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *151*, 6535–6545.
- Neubert, K., Lehmann, C.H.K., Heger, L., Baranska, A., Staedtler, A.M., Buchholz, V.R., Yamazaki, S., Heidkamp, G.F., Eissing, N., Zebroski, H., et al. (2014). Antigen delivery to CD11c+CD8- dendritic cells induces protective immune responses against experimental melanoma in mice in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 5830–5838.
- Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeldt, S., Facciotti, F., Gruarin, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013). Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* *122*, 932–942.
- Nopora, K., Bernhard, C.A., Ried, C., Castello, A.A., Murphy, K.M., Marconi, P., Koszinowski, U., and Brocker, T. (2012). MHC class I cross-presentation by dendritic cells counteracts viral immune evasion. *Front. Immunol.* *3*, 348.
- Norbury, C.C., Hewlett, L.J., Prescott, A.R., Shastri, N., and Watts, C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* *3*, 783–791.
- Norbury, C.C., Chambers, B.J., Prescott, A.R., Ljunggren, H.G., and Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *27*, 280–288.
- Norbury, C.C., Princiotta, M.F., Bacik, I., Brutkiewicz, R.R., Wood, P., Elliott, T., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2001). Multiple antigen-specific processing pathways for activating naive CD8+ T cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 4355–4362.
- Nunes, P., Cornut, D., Bochet, V., Hasler, U., Oh-Hora, M., Waldburger, J.-M., and Demaurex, N. (2012). STIM1 juxtaposes ER to phagosomes, generating Ca²⁺ hotspots that boost phagocytosis. *Curr. Biol. CB* *22*, 1990–1997.
- Oehen, S., Odermatt, B., Karrer, U., Hengartner, H., Zinkernagel, R., and López-Macías, C. (2002). Marginal zone macrophages and immune responses against viruses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 1453–1458.
- Ogino, T., Nishimura, J., Barman, S., Kayama, H., Uematsu, S., Okuzaki, D., Osawa, H., Haraguchi, N., Uemura, M., Hata, T., et al. (2013). Increased Th17-inducing activity of CD14+ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* *145*, 1380–1391.e1.
- Oh, S., Perera, L.P., Terabe, M., Ni, L., Waldmann, T.A., and Berzofsky, J.A. (2008). IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5201–5206.
- Okabe, Y., and Medzhitov, R. (2014). Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages. *Cell* *157*, 832.

- Palmowski, M.J., Gileadi, U., Salio, M., Gallimore, A., Millrain, M., James, E., Addey, C., Scott, D., Dyson, J., Simpson, E., et al. (2006). Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 983–990.
- Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* *74*, 2527–2534.
- Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., et al. (2017a). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* *214*, 1913–1923.
- Patel, V.I., Booth, J.L., Duggan, E.S., Cate, S., White, V.L., Hutchings, D., Kovats, S., Burian, D.M., Dozmorov, M., and Metcalf, J.P. (2017b). Transcriptional Classification and Functional Characterization of Human Airway Macrophage and Dendritic Cell Subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *198*, 1183–1201.
- Phan, T.G., Grigorova, I., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat. Immunol.* *8*, 992–1000.
- Plantinga, M., Guilliams, M., Vanheerswyngheles, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., et al. (2013). Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* *38*, 322–335.
- Polak, M.E., Newell, L., Taraban, V.Y., Pickard, C., Healy, E., Friedmann, P.S., Al-Shamkhani, A., and Arden-Jones, M.R. (2012). CD70-CD27 interaction augments CD8+ T-cell activation by human epidermal Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 1636–1644.
- 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. Baltim. Md 1950* *166*, 5327–5330.
- Prilliman, K.R., Lemmens, E.E., Palioungas, G., Wolfe, T.G., Allison, J.P., Sharpe, A.H., and Schoenberger, S.P. (2002). Cutting edge: a crucial role for B7-CD28 in transmitting T help from APC to CTL. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 4094–4097.
- Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C., Davoust, J., Fay, J., et al. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 566–572.
- Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* *475*, 222–225.
- Ramachandra, L., Sramkoski, R.M., Canaday, D.H., Boom, W.H., and Harding, C.V. (1998). Flow analysis of MHC molecules and other membrane proteins in isolated phagosomes. *J. Immunol. Methods* *213*, 53–71.
- Reynolds, G., and Haniffa, M. (2015). Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of

Two Species? *Front. Immunol.* 6, 330.

Ridge, J.P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474–478.

del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Kremmer, E., and Förster, R. (2007). CD103⁻ and CD103⁺ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 6861–6866.

Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., and Kelsall, B.L. (2012). Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J. Exp. Med.* 209, 139.

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

Rock, K.L. (1996). A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol. Today* 17, 131–137.

Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761–771.

Rock, K.L., York, I.A., and Goldberg, A.L. (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* 5, 670–677.

Rock, K.L., Farfán-Arribas, D.J., and Shen, L. (2010). Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 9–15.

Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 362–368.

Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J., Strowig, T., Gearty, S.V., Teichmann, L.L., Saito, Y., Marches, F., Halene, S., Palucka, A.K., et al. (2014). Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat. Biotechnol.* 32, 364–372.

Roquilly, A., McWilliam, H.E.G., Jacqueline, C., Tian, Z., Cinotti, R., Rimbart, M., Wakim, L., Caminschi, I., Lahoud, M.H., Belz, G.T., et al. (2017). Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity* 47, 135–147.e5.

Rudensky AYu, null, Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A., and Janeway, C.A. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622–627.

Satpathy, A.T., Kc, W., Albring, J.C., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2012). Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J. Exp. Med.* 209, 1135–1152.

Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., Lopez, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L.,

- Fruci, D., Niedermann, G., et al. (2005). Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* *6*, 689–697.
- Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M., Guermontprez, P., Firat, E., Lindo, V., Greer, F., Davoust, J., Kratzer, R., Keller, S.R., et al. (2009). IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* *325*, 213–217.
- Saveanu, L., Babbior, J., Lawand, M., and van Endert, P. (2013). Insulin-regulated aminopeptidase and its compartment in dendritic cells. *Mol. Immunol.* *55*, 153–155.
- Savina, A., and Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* *219*, 143–156.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermontprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Duménil, A.-M., Seabra, M.C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* *126*, 205–218.
- Savina, A., Peres, A., Cebrian, I., Carmo, N., Moita, C., Hacohen, N., Moita, L.F., and Amigorena, S. (2009). The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity* *30*, 544–555.
- Schäkel, K., Kannagi, R., Kniep, B., Goto, Y., Mitsuoka, C., Zwirner, J., Soruri, A., von Kietzell, M., and Rieber, E. (2002). 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* *17*, 289–301.
- Schiavoni, G., Mattei, F., and Gabriele, L. (2013). Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response. *Front. Immunol.* *4*, 483.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., et al. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* *38*, 970–983.
- Schlitzer, A., Sivakamasundari, V., Chen, J., Sumatoh, H.R.B., Schreuder, J., Lum, J., Malleret, B., Zhang, S., Larbi, A., Zolezzi, F., et al. (2015). Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat. Immunol.* *16*, 718–728.
- Schnorrer, P., Behrens, G.M.N., Wilson, N.S., Pooley, J.L., Smith, C.M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., et al. (2006). The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10729–10734.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., and Melief, C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* *393*, 480–483.
- Schreibelt, G., Klinkenberg, L.J.J., Cruz, L.J., Tacken, P.J., Tel, J., Kreutz, M., Adema, G.J., Brown, G.D., Figdor, C.G., and de Vries, I.J.M. (2012). The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* *119*, 2284–2292.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and

hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86–90.

Scott, C.L., Bain, C.C., Wright, P.B., Sichien, D., Kotarsky, K., Persson, E.K., Luda, K., Williams, M., Lambrecht, B.N., Agace, W.W., et al. (2015). CCR2(+)CD103(-) intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells. *Mucosal Immunol.* 8, 327–339.

See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356.

Segovia, M., Louvet, C., Charnet, P., Savina, A., Tilly, G., Gautreau, L., Carretero-Iglesia, L., Beriou, G., Cebrian, I., Cens, T., et al. (2014). Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 14, 1021–1031.

Segura, E., and Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 34, 440–445.

Segura, E., Albiston, A.L., Wicks, I.P., Chai, S.Y., and Villadangos, J.A. (2009). Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20377–20381.

Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 209, 653–660.

Segura, E., Durand, M., and Amigorena, S. (2013a). Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ–resident dendritic cells. *J. Exp. Med.* 210, 1035–1047.

Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013b). Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 38, 336–348.

Seiler, P., Aichele, P., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., and Schwendener, R.A. (1997). Crucial role of marginal zone macrophages and marginal zone metallophilic cells in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Eur. J. Immunol.* 27, 2626–2633.

Seneschal, J., Jiang, X., and Kupper, T.S. (2014). Langerin+ dermal DC, but not Langerhans cells, are required for effective CD8-mediated immune responses after skin scarification with vaccinia virus. *J. Invest. Dermatol.* 134, 686–694.

Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7, 311–317.

Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480–483.

Shand, F.H.W., Ueha, S., Otsuji, M., Koid, S.S., Shichino, S., Tsukui, T., Kosugi-Kanaya, M., Abe, J., Tomura, M., Ziogas, J., et al. (2014). Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-

- infiltrating monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 7771–7776.
- Shen, K.-Y., Song, Y.-C., Chen, I.-H., Leng, C.-H., Chen, H.-W., Li, H.-J., Chong, P., and Liu, S.-J. (2014). Molecular mechanisms of TLR2-mediated antigen cross-presentation in dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 4233–4241.
- Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., and Rock, K.L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* *21*, 155–165.
- Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., and Rock, K.L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* *158*, 2723–2730.
- Shi, G.P., Munger, J.S., Meara, J.P., Rich, D.H., and Chapman, H.A. (1992). Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J. Biol. Chem.* *267*, 7258–7262.
- Shi, Y., Evans, J.E., and Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* *425*, 516–521.
- Shortman, K., and Liu, Y.-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 151–161.
- Simon, A.K., Hollander, G.A., and McMichael, A. (2015). Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc. Biol. Sci.* *282*, 20143085.
- Singh, R., and Cresswell, P. (2010). Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. *Science* *328*, 1394–1398.
- Song, R., and Harding, C.V. (1996). Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 4182–4190.
- Soucie, E.L., Weng, Z., Geirsdóttir, L., Molawi, K., Maurizio, J., Fenouil, R., Mossadegh-Keller, N., Gimenez, G., VanHille, L., Beniazza, M., et al. (2016). Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science* *351*, aad5510.
- Steiger, J., Nickerson, P.W., Steurer, W., Moscovitch-Lopatin, M., and Strom, T.B. (1995). IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *155*, 489–498.
- Steinman, R.M., and Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *311*, 17–58.
- Steinman, R.M., and Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 5132–5136.
- Steinman, R.M., Lustig, D.S., and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.* *139*, 1431–1445.
- Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D., and Cohn, Z.A. (1979). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J. Exp. Med.* *149*, 1–16.
- Stolz, A., and Wolf, D.H. (2010). Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone

assisted journey to hell. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 694–705.

Suri, A., Lovitch, S.B., and Unanue, E.R. (2006). The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 70–77.

Swiecki, M., Wang, Y., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2013). Plasmacytoid dendritic cells contribute to systemic but not local antiviral responses to HSV infections. *PLoS Pathog.* 9, e1003728.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612–616.

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., et al. (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell* 3, 889–901.

Takeda, K., and Akira, S. (2001). Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54, 209–219.

Tamoutounour, S., Guillemins, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925–938.

Tel, J., Schreiber, G., Sittig, S.P., Mathan, T.S.M., Buschow, S.I., Cruz, L.J., Lambeck, A.J.A., Figdor, C.G., and de Vries, I.J.M. (2013). Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8⁺ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* 121, 459–467.

Thomas, E.D., Ramberg, R.E., Sale, G.E., Sparkes, R.S., and Golde, D.W. (1976). Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science* 192, 1016–1018.

Thomas, K., Dietze, K., Wehner, R., Metz, I., Tumani, H., Schultheiß, T., Günther, C., Schäkel, K., Reichmann, H., Brück, W., et al. (2014). Accumulation and therapeutic modulation of 6-sulfo LacNAc(+) dendritic cells in multiple sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 1, e33.

Tiwari, N., Garbi, N., Reinheckel, T., Moldenhauer, G., Hämmerling, G.J., and Momburg, F. (2007). A Transporter Associated with Antigen-Processing Independent Vacuolar Pathway for the MHC Class I-Mediated Presentation of Endogenous Transmembrane Proteins. *J. Immunol.* 178, 7932–7942.

Toma, M., Wehner, R., Kloß, A., Hübner, L., Fodelianaki, G., Erdmann, K., Füssel, S., Zastrow, S., Meinhardt, M., Seliger, B., et al. (2015). Accumulation of tolerogenic human 6-sulfo LacNAc dendritic cells in renal cell carcinoma is associated with poor prognosis. *Oncoimmunology* 4, e1008342.

Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R.E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., et al. (2005). Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123, 157–170.

Trombetta, E.S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., and Mellman, I. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299, 1400–1403.

Ulvmar, M.H., Werth, K., Braun, A., Kelay, P., Hub, E., Eller, K., Chan, L., Lucas, B., Novitzky-Basso, I., Nakamura, K., et al. (2014). The atypical chemokine receptor CCRL1 shapes functional CCL21 gradients

in lymph nodes. *Nat. Immunol.* *15*, 623–630.

Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.-D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* *31*, 502–512.

Veninga, H., Borg, E.G.F., Vreeman, K., Taylor, P.R., Kalay, H., van Kooyk, Y., Kraal, G., Martinez-Pomares, L., and den Haan, J.M.M. (2015). Antigen targeting reveals splenic CD169⁺ macrophages as promoters of germinal center B-cell responses. *Eur. J. Immunol.* *45*, 747–757.

Vermi, W., Micheletti, A., Lonardi, S., Costantini, C., Calzetti, F., Nascimbeni, R., Bugatti, M., Codazzi, M., Pinter, P.C., Schäkel, K., et al. (2014). slanDCs selectively accumulate in carcinoma-draining lymph nodes and marginate metastatic cells. *Nat. Commun.* *5*, 3029.

Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 543–555.

Villadangos, J.A., Bryant, R.A., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Duménil, A.M., Riese, R.J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G.P., Chapman, H.A., et al. (1999). Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* *172*, 109–120.

Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* *356*.

Vivar, O.I., Magalhaes, J.G., and Amigorena, S. (2016). Measurement of Export to the Cytosol in Dendritic Cells Using a Cytofluorimetry-Based Assay. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1423*, 183–188.

Wagner, C.S., and Cresswell, P. (2012). TLR and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor signals differentially regulate exogenous antigen presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 686–693.

Wagner, C.S., Grotzke, J., and Cresswell, P. (2013). Intracellular regulation of cross-presentation during dendritic cell maturation. *PloS One* *8*, e76801.

Wakim, L.M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2008). Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* *319*, 198–202.

Wan, Y., Lu, L., Bramson, J.L., Baral, S., Zhu, Q., Pilon, A., and Dayball, K. (2001). Dendritic cell-derived IL-12 is not required for the generation of cytotoxic, IFN-gamma-secreting, CD8(+) CTL in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 5027–5033.

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

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

Weck, M.M., Grünebach, F., Werth, D., Sinzger, C., Bringmann, A., and Brossart, P. (2007). TLR ligands

- differentially affect uptake and presentation of cellular antigens. *Blood* *109*, 3890–3894.
- Weigert, R., Yeung, A.C., Li, J., and Donaldson, J.G. (2004). Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3758–3770.
- Weimershaus, M., Maschalidi, S., Sepulveda, F., Manoury, B., van Endert, P., and Saveanu, L. (2012). Conventional dendritic cells require IRAP-Rab14 endosomes for efficient cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 1840–1846.
- van Wilgenburg, B., Browne, C., Vowles, J., and Cowley, S.A. (2013). Efficient, long term production of monocyte-derived macrophages from human pluripotent stem cells under partly-defined and fully-defined conditions. *PloS One* *8*, e71098.
- Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* *441*, 890–893.
- Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., and Villadangos, J.A. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* *102*, 2187–2194.
- Wilson, N.S., Behrens, G.M.N., Lundie, R.J., Smith, C.M., Waithman, J., Young, L., Forehan, S.P., Mount, A., Steptoe, R.J., Shortman, K.D., et al. (2006). Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat. Immunol.* *7*, 165–172.
- Wilson, N.S., Young, L.J., Kupresanin, F., Naik, S.H., Vremec, D., Heath, W.R., Akira, S., Shortman, K., Boyle, J., Maraskovsky, E., et al. (2008). Normal proportion and expression of maturation markers in migratory dendritic cells in the absence of germs or Toll-like receptor signaling. *Immunol. Cell Biol.* *86*, 200–205.
- Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D., and Bieber, T. (1996). Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* *106*, 446–453.
- Wollenberg, A., Mommaas, M., Oppel, T., Schottdorf, E.-M., Günther, S., and Moderer, M. (2002). Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* *118*, 327–334.
- Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., and Wong, S.-C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* *118*, e16-31.
- Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Tieleman, D.P., and Monticelli, L. (2007). Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* *93*, 4225–4236.
- Woo, S.-R., Fuertes, M.B., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, M.J., Leung, M.Y.K., Duggan, R., Wang, Y., Barber, G.N., Fitzgerald, K.A., et al. (2014). STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* *41*, 830–842.

- Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K.D., Suter, M., Lo, D., and Shortman, K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* 9, 839–847.
- Wu, S.J., Niknafs, Y.S., Kim, S.H., Oravec-Wilson, K., Zajac, C., Toubai, T., Sun, Y., Prasad, J., Peltier, D., Fujiwara, H., et al. (2017). A Critical Analysis of the Role of SNARE Protein SEC22B in Antigen Cross-Presentation. *Cell Rep.* 19, 2645–2656.
- Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.
- Yamazaki, C., Sugiyama, M., Ohta, T., Hemmi, H., Hamada, E., Sasaki, I., Fukuda, Y., Yano, T., Nobuoka, M., Hirashima, T., et al. (2013). Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 6071–6082.
- Yan, J., Parekh, V.V., Mendez-Fernandez, Y., Olivares-Villagómez, D., Dragovic, S., Hill, T., Roopenian, D.C., Joyce, S., and Kaer, L.V. (2006). In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *J. Exp. Med.* 203, 647–659.
- Yates, R.M., and Russell, D.G. (2005). Phagosome Maturation Proceeds Independently of Stimulation of Toll-like Receptors 2 and 4. *Immunity* 23, 409–417.
- Yates, S.P., Jørgensen, R., Andersen, G.R., and Merrill, A.R. (2006). Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. *Trends Biochem. Sci.* 31, 123–133.
- Yona, S., and Gordon, S. (2015). From the Reticuloendothelial to Mononuclear Phagocyte System - The Unaccounted Years. *Front. Immunol.* 6, 328.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.
- York, I.A., Chang, S.-C., Saric, T., Keys, J.A., Favreau, J.M., Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* 3, 1177–1184.
- Yu, C.I., Becker, C., Wang, Y., Marches, F., Helft, J., Leboeuf, M., Anguiano, E., Pourpe, S., Goller, K., Pascual, V., et al. (2013). Human CD1c+ dendritic cells drive the differentiation of CD103+ CD8+ mucosal effector T cells via the cytokine TGF- β . *Immunity* 38, 818–830.
- Zaba, L.C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N.J., Abello, M.V., Novitskaya, I., Pierson, K.C., Gonzalez, J., Krueger, J.G., and Lowes, M.A. (2009). Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 129, 79–88.
- Zehner, M., Chasan, A.I., Schuette, V., Embgenbroich, M., Quast, T., Kolanus, W., and Burgdorf, S. (2011). Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9933–9938.
- Zehner, M., Marschall, A.L., Bos, E., Schloetel, J.-G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A.J., et al. (2015). The translocon protein Sec61 mediates antigen

- transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8(+) T cells. *Immunity* *42*, 850–863.
- Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). The dendritic cell receptor DNCR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 1615–1627.
- Zhang, X., Casartelli, N., Lemoine, S., Mozeleski, B., Azria, E., Le Ray, C., Schwartz, O., Launay, O., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2014). Plasmacytoid dendritic cells engagement by influenza vaccine as a surrogate strategy for driving T-helper type 1 responses in human neonatal settings. *J. Infect. Dis.* *210*, 424–434.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* *116*, e74-80.
- Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliah, E., Satpathy, A.T., Friedlander, G., Mack, M., Shpigel, N., Boneca, I.G., Murphy, K.M., et al. (2012). Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* *37*, 1076–1090.
- Zou, L., Zhou, J., Zhang, J., Li, J., Liu, N., Chai, L., Li, N., Liu, T., Li, L., Xie, Z., et al. (2009). The GTPase Rab3b/3c-positive recycling vesicles are involved in cross-presentation in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15801–15806.

Submitted on 10 Oct 2017

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.

Aryl Hydrocarbon Receptor controls monocyte differentiation into dendritic cells versus macrophages

Authors: Christel Goudot¹, Alice Coillard¹, Alexandra-Chloé Villani^{2,3}, Paul Gueguen¹, Adeline Cros¹, Siranush Sarkizova⁴, Tsing-Lee Tang-Huau^{1,5}, Mylène Bohec⁶, Sylvain Baulande⁶, Nir Hacohen^{2,3}, Sebastian Amigorena¹, Elodie Segura^{1*}.

Affiliations:

¹ Institut Curie, PSL Research University, INSERM, U932, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

² Broad Institute of Harvard University and MIT, Cambridge, MA 02142, USA

³ Center for Cancer Research, Massachusetts General Hospital, Department of Medicine, Charlestown, MA 02129, USA

⁴ Department of Biomedical Informatics, Harvard Medical School, Boston, MA 02142, USA

⁵ Sanofi, Breakthrough Laboratory, 1 impasse des ateliers, 94400 Vitry-sur-Seine, France

⁶ Institut Curie, PSL Research University, NGS platform, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

*Correspondence to: elodie.segura@curie.fr

Summary

After entering tissues, monocytes differentiate into cells that share functional features with either macrophages or dendritic cells (DC). How monocyte fate is directed towards monocyte-derived macrophages (mo-Mac) or monocyte-derived DC (mo-DC) and which transcription factors control these differentiation pathways remains unknown. Using a novel *in*

vitro culture model, yielding human mo-DC and mo-Mac closely resembling those found *in vivo* in ascites, we show that IRF4 and MAFB are critical regulators of monocyte differentiation into mo-DC and mo-Mac, respectively. Activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) promotes mo-DC differentiation through the induction of BLIMP-1, while impairing differentiation into mo-Mac. AhR deficiency also impairs the *in vivo* differentiation of mouse mo-DC. Finally, AHR activation correlates with mo-DC infiltration in leprosy lesions. These results establish that mo-DC and mo-Mac are controlled by distinct transcription factors, and show that AHR acts as a molecular switch for monocyte fate specification in response to micro-environmental factors.

Introduction

Mononuclear phagocytes are divided into three groups: macrophages, monocytes and DC. Macrophages derive from embryonic precursors whose differentiation is strongly imprinted by the micro-environment (Gosselin et al., 2014; Haldar et al., 2014; Lavin et al., 2014; Okabe and Medzhitov, 2014). By contrast, classical DC derive from pre-committed precursors that follow a pre-determined developmental program primed at an early stage, independently of their tissue of residence (Breton et al., 2016; Schlitzer et al., 2015). When entering tissues, monocytes can differentiate into either macrophages or DC (Mildner et al., 2013; Segura and Amigorena, 2013). Whether mo-DC and mo-Mac represent variations of one highly plastic cell type or distinct *bona fide* lineages remains unclear (Guilliams et al., 2014). In addition, what environmental cues drive monocyte fate towards mo-Mac versus mo-DC and what molecular regulators orchestrate this process remains to be established.

In mouse models, mo-DC and mo-Mac appear during inflammation but are also found in the steady-state at mucosal sites such as intestine and skin (Bain et al., 2014; Mildner et al.,

2013; Segura and Amigorena, 2013; Tamoutounour et al., 2013). There is strong experimental evidence that the same scheme applies to humans. Monocyte-derived cells are found in the steady-state in human skin (McGovern et al., 2014). In inflammatory conditions, monocyte recruitment was observed in the gut of inflammatory bowel disease patients (Grimm et al., 1995), in cantharidin-induced skin blisters (Jenner et al., 2014) and in the nasal mucosa of subjects with induced allergic rhinitis (Eguiluz-Gracia et al., 2016). Inflammatory macrophages and DC have been described in atopic dermatitis (Wollenberg et al., 1996), Crohn's disease (Bain et al., 2013; Kamada et al., 2008), psoriasis (Zaba et al., 2009), allergic rhinitis (Eguiluz-Gracia et al., 2016), rheumatoid arthritis and tumor ascites (Segura et al., 2013). Transcriptomic analysis showed that ascites DC share gene signatures with *in vitro*-generated monocyte-derived cells, supporting the idea that these DC represent tissue mo-DC (Segura et al., 2013).

We hypothesized that transcription factors differentially expressed between human mo-DC and mo-Mac may be involved in their differentiation from monocytes. We identified candidate transcription factors by comparative transcriptomic analysis, and established a new model of human monocyte differentiation to test the role of these candidates. We found that *IRF4* and *MAFB* are required for mo-DC and mo-Mac differentiation, respectively. We also show that AHR is essential for driving monocyte differentiation towards mo-DC. Finally, we validated the role of AHR in mo-DC differentiation *in vivo* in a mouse model and by analyzing clinical data from leprosy patients.

Results

Establishment of a culture model for human monocyte differentiation

To address the ontogeny of human monocyte-derived cells, we first searched for transcription factors that are differentially expressed between monocytes, ascites mo-DC and ascites mo-Mac. Using our transcriptomic data (Segura et al., 2013), we established a list of candidates (table S1). To test their role, we turned to an *in vitro* model of monocyte differentiation. Current culture models yield either mo-DC or mo-Mac depending on cytokines used. By contrast, we needed a model that would mimic the differentiation of monocytes into mo-DC and mo-Mac in the same environment. We therefore established a new *in vitro* system enabling the differentiation of both mo-DC and mo-Mac in the same culture.

M-CSF and its receptor are essential for mo-DC and mo-Mac differentiation *in vivo* during inflammation in mice (Davies et al., 2013; Greter et al., 2012), and M-CSFR is highly expressed on human mo-DC and mo-Mac found *in vivo* (McGovern et al., 2014; Segura et al., 2013). Therefore, we designed a cytokine cocktail based on M-CSF or IL-34, the two ligands of M-CSFR. We also included IL-4, a cytokine known to induce the expression by cultured monocytes of CD1 molecules, which are highly expressed on ascites mo-DC (Segura et al., 2013). Finally, we added TNF α , a major mediator of inflammation. Culturing human blood CD14⁺ monocytes with M-CSF, IL-4 and TNF α or IL-34, IL-4 and TNF α yielded in the same culture two main populations expressing CD16 or CD1a, and displaying a typical macrophage or DC morphology, respectively (fig.1A and fig.S1A). Only CD1a⁺ cells could efficiently induce allogeneic naive CD4⁺ T cell proliferation (fig.1B and fig.S1B), confirming that they were *bona fide* DC. We then characterized the properties of cultured mo-DC and mo-Mac compared to that of ascites mo-DC and mo-Mac. Both mo-DC and mo-Mac secreted IL-6 after stimulation with CD40L, but only mo-DC secreted IL-23 (fig.1C and fig.S1C), similar to what we observed with ascites cells (Segura et al., 2013). Phenotypic comparison of mo-DC and mo-Mac differentiated

with M-CSF, or IL-34, IL-4 and TNF α with ascites mo-DC and mo-Mac showed similar expression for various surface markers (fig.1D and fig.S1D), except for CD14 which is down-regulated upon culture. CD14⁺ monocytes were routinely isolated by positive selection using magnetic beads with 90-95% purity, contaminating cells being CD14⁺CD16⁺ monocytes. To address whether the presence of CD14⁺CD16⁺ monocytes could influence the culture outcome, we isolated highly pure CD14⁺ monocytes by cell sorting. The absence of contaminating CD14⁺CD16⁺ monocytes did not impact monocyte differentiation into both mo-DC and mo-Mac (fig.S1E). In addition, CD16⁺ monocytes (isolated using magnetic beads) had a low survival rate and did not maintain CD16 expression in culture (fig.S1F), suggesting that potential contaminating CD16⁺ monocytes had a negligible effect on the final proportions of mo-DC and mo-Mac. Of note, monocytes differentiated with GM-CSF and IL-4, a widely used culture system, yielded only CD1a⁺ mo-DC (fig.S1G). The phenotype of mo-DC derived with GM-CSF and IL-4, with or without TNF α (fig.1D and fig.S1H), was less similar to that of ascites mo-DC. When stimulated with a TLR7/8 ligand (R848) and an endogenous danger signal (uric acid crystals), mo-DC differentiated with M-CSF, or IL-34, IL-4 and TNF α secreted high levels of inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) (fig.S1I), consistent with the secretory ability of ascites mo-DC (Segura et al., 2013). Of note, mo-DC differentiated with GM-CSF and IL-4 were less efficient for the secretion of IL-1 β and IL-6, although they secreted TNF α and CXCL10 at similar levels as mo-DC differentiated with M-CSF, or IL-34, IL-4 and TNF α (fig.S1I).

To determine whether these populations had a stable phenotype over time, we sorted CD1a⁻CD16⁻ cells, mo-DC and mo-Mac after 5 days of culture and re-cultured them separately with M-CSF, IL-4 and TNF α (fig.1E). After 2 days of re-culture, the phenotype of CD1a⁻CD16⁻ cells, mo-DC or mo-Mac remained stable based on the expression of CD16, CD163 and CD1a.

After 4 days of re-culture, only CD1a⁻CD16⁻ cells and mo-Mac were still viable, and their phenotype was largely unchanged (fig.S1J). These results show that mo-DC and mo-Mac are maintained as stable populations over the course of the culture, and that mo-DC or mo-Mac do not emerge from CD1a⁻CD16⁻ cells at later time points. To address whether a single monocyte could give rise to both mo-DC and mo-Mac in our culture model, we stained monocytes with a proliferation dye and analyzed cell proliferation after 5 days. As a positive control, we stimulated monocytes with the mitogen phytohaemagglutinin-L (PHA-L), which induced the proliferation of a portion of monocytes. Monocytes did not proliferate in the culture (fig.1F), suggesting that there is a precursor-product relationship between a single monocyte and a single mo-DC, or mo-Mac, progeny.

Finally, to complete the characterization of our culture model, we compared the transcriptome of cell-sorted mo-DC and mo-Mac differentiated with M-CSF, or IL-34, IL-4 and TNF α with that of cell-sorted ascites mo-DC and mo-Mac, blood CD14⁺ monocytes, blood CD1c⁺ DC and mo-DC differentiated with GM-CSF and IL-4. Supervised analysis of the microarray data showed differential expression for selected phenotypic markers as expected (fig.S2A). Comparative transcriptomic analysis showed that mo-Mac and mo-DC differentiated with M-CSF, IL-4 and TNF α were highly similar to those differentiated with IL-34, IL-4 and TNF α (fig.1G). In addition, these *in vitro*-generated mo-Mac and mo-DC clustered close to ascites mo-Mac and mo-DC respectively, while the transcriptome of mo-DC differentiated with GM-CSF and IL-4 was closer to that of blood CD1c⁺ DC (fig.1G). These results show that our culture system yields mo-DC and mo-Mac populations that closely resemble mo-DC and mo-Mac present in human tumor ascites. For the rest of the study, we used monocytes cultured with M-CSF, IL-4 and TNF α as a model to analyze monocyte-derived cell differentiatio

***IRF4* and *MAFB* are essential for the development of mo-DC and mo-Mac**

To refine our list of candidates for the differentiation of monocyte-derived cells (table S1), we removed transcription factors that are not expressed or not differentially expressed in *in vitro*-derived mo-DC versus *in vitro*-derived mo-Mac (fig.2A). We selected for further validation two candidates, *IRF4* and *MAFB*, previously proposed to be involved in the development of a subset of mouse classical DC (Murphy et al., 2015), and in macrophage differentiation (Kelly et al., 2000) respectively. *IRF4* and *MAFB* were differentially expressed in mo-DC versus mo-Mac, both *in vitro* and *in vivo* (fig.S2B). In addition, we confirmed the differential expression of *IRF4* and *MAFB* in blood monocytes, ascites mo-DC and ascites mo-Mac at the protein level (fig.2B). *IRF4* and *MAFB* were expressed early during the culture both at the mRNA (fig.2C) and protein levels (fig.2D), consistent with their possible role as master regulator transcription factors. To address the role of *IRF4*, we silenced its expression by infecting monocytes at the start of the culture with lentiviral vectors containing shRNA against *IRF4*, or control shRNA (fig.2E). Inhibition of *IRF4* expression induced a dramatic reduction of mo-DC while maintaining the mo-Mac population (fig.2F). We used a similar strategy to analyze the role of *MAFB* (fig.2G). Silencing of *MAFB* resulted in a strong decrease in mo-Mac and an increase in mo-DC differentiation (fig.2H). Analysis of additional phenotypic markers confirmed the disappearance of mo-DC or mo-Mac from the culture, rather than the mere down-regulation of CD1a or CD16 expression (fig.S2C-D). These results show that *IRF4* and *MAFB* are essential for mo-DC and mo-Mac development, respectively.

Monocytes are not heterogeneous for the expression of mo-DC gene signatures

These results could be explained either by the presence of two distinct precursor populations or by the existence among blood CD14⁺ monocytes of two transcriptionally primed populations that would be pre-committed to become mo-DC or mo-Mac (Schlitzer et al., 2015). To address the heterogeneity of CD14⁺ monocytes, we performed single-cell RNA-seq on CD14⁺ monocytes from 2 donors isolated using magnetic beads. Cell purity as assessed by flow cytometry was 93% and 95% respectively (fig.S3A). We generated single-cell transcriptomes using a droplet-based method enabling 3' mRNA counting (Zheng et al., 2017). To evaluate the heterogeneity of CD14⁺ monocytes, we clustered cells using a graph-based approach with the Seurat package, which combines dimensionality reduction and graph-based partitioning algorithms for unsupervised clustering (Satija et al., 2015). For visualization of the cell clusters, we used t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (*t*-SNE) (fig.3A and fig.S3B). We found two clusters, one of which represents around 25% of total cells and corresponds to cells expressing *FCGR3A* (encoding CD16), higher levels of MHC class II molecules and several genes preferentially expressed in CD14⁺CD16⁺ and CD16⁺ monocytes including *IFITM2* and *IFITM3* (fig.S3C) (Villani et al., 2017; Wong et al., 2011). In addition to contaminating CD14⁺CD16⁺ monocytes, some of these cells may correspond to CD14⁺ monocytes *en route* to differentiating into CD14⁺CD16⁺ monocytes (Patel et al., 2017). To address the potential heterogeneity of the CD16⁻ cluster, we performed a second analysis excluding cells from the CD16⁺ cluster (fig.3B and fig.S3B). We did not detect subgroups of transcriptionally distinct cells within the CD16⁻ cluster, confirming that the CD14⁺ monocyte population is likely homogeneous, as previously reported (Villani et al., 2017). To confirm these results, we sought to address whether subpopulations of monocytes displayed transcriptional similarity with mo-DC or mo-Mac. Because of the limited number of genes detected per cell in our analysis (average of

1185), we interrogated published single-cell RNA-seq data obtained using the Smart-seq2 approach (Villani et al., 2017), characterized by a lower number of cells analyzed but a higher number of genes per cell (average of 5326). We defined gene signatures for mo-DC and mo-Mac using our transcriptomic data by identifying genes that were (i) more expressed in ascites mo-DC than in blood monocytes, (ii) more expressed in ascites mo-DC than in ascites mo-Mac, and (iii) more expressed in *in vitro*-derived mo-DC than in *in vitro*-derived mo-Mac (and vice-versa for mo-Mac) (Table S2). We then queried genes with at least a 2-fold change. Among these, 35 genes for mo-DC and 35 genes for mo-Mac were expressed in the single-cell RNA-seq data set. While none of the monocytes expressed the mo-DC signature, the mo-Mac signature was partially expressed by all monocyte subsets (fig.3C for the classical subset definition and fig.S3D for the revised subset definition (Villani et al., 2017)). We also assessed the expression of selected genes that could be involved in determining monocyte fate, including receptors for the cytokines used in our model (*CSF1R*, *IL4R*, *TNFRSF1A*), candidate transcription factors (*IRF4*, *MAFB*, *AHR*) or genes recently proposed to distinguish “DC-biased” monocytes in the mouse (*FLT3*, *SPI1*) (Menezes et al., 2016) (fig.3D for the classical subset definition and fig.S3E for the revised subset definition). While *IRF4* was not expressed by monocytes, *MAFB* was detected in all monocyte subsets. We conclude that human CD14⁺ monocytes are not heterogeneous in their expression of mo-DC transcriptional signature. While monocytes do not contain a subpopulation that would be pre-committed towards mo-DC differentiation, they all express a partial mo-Mac gene signature, including *MAFB*, suggesting a default differentiation pathway towards mo-Mac if no other environmental triggers are encountered.

AHR is a molecular switch for monocyte fate

Given that monocytes do not seem to be transcriptionally primed, we then hypothesized that environmental signals play a major role in driving monocyte fate. Among candidate transcription factors (fig.2A), we identified *AHR*, a ligand-activated transcription factor sensing tryptophan catabolites and metabolites generated by dietary intake, UV exposure, or microbiota (Stockinger et al., 2014). *AHR* was differentially expressed by mo-DC and mo-Mac at the mRNA (fig.S2B) and protein levels (fig.2B).

To address the role of *AHR*, we first inhibited its expression by targeted knock-down using lentiviral vectors (fig.4A). *AHR* silencing reduced mo-DC differentiation while slightly increasing mo-Mac (fig.4B). Because culture medium contains small amounts of *AHR* ligands (Veldhoen et al., 2009) and *AHR* knock-down was incomplete (fig.4A), we sought to confirm these results using a different approach. We cultured monocytes in the presence of various doses of a natural *AHR* agonist (6-Formylindolo(3,2-b)carbazole, FICZ) or an *AHR* inhibitor (stemregenin-1, SR1) and assessed mo-DC and mo-Mac differentiation. *AHR* activation by FICZ increased mo-DC while decreasing mo-Mac development (fig.4C). Conversely, *AHR* inhibition by SR1 increased mo-Mac while decreasing mo-DC proportions (fig.4C). Of note, the phenotype of FICZ-treated mo-DC or SR1-treated mo-Mac was similar to that of untreated cells (fig.S4A-B), while the phenotype of CD1a⁺CD16⁻ cells remained unchanged (fig.S4C). These results suggest that *AHR* is a molecular switch for mo-DC versus mo-Mac differentiation.

To decipher how *AHR* shapes monocyte fate, we assessed *IRF4* and *MAFB* expression in monocytes after 3h of culture with various combinations of M-CSF, IL-4, TNF α , SR1 and FICZ (fig.4D and fig.S5A). We also analyzed the expression of *CYP1A1*, a known direct target of *AHR* (Stockinger et al., 2014), as a control for *AHR* activation (fig.S5A). IL-4 induced *IRF4* expression, as previously reported (Lehtonen et al., 2005). This induction was inhibited in the

presence of SR1, indicating that *IRF4* expression is dependent on AHR signaling, presumably in response to small amounts of AHR ligand from the culture medium. However, *IRF4* is not induced in the presence of FICZ alone. The expression of IL-4-induced *IRF4* was further increased in the presence of TNF α and with FICZ. By contrast, *MAFB* expression was induced by culture medium alone, and further increased by M-CSF (fig.4D). AHR signaling had no significant impact on *MAFB* expression at this time point. To address whether quantities of mRNA expressed per cell or proportions of expressing cells were regulated by these signals, we analyzed the expression of *IRF4* and *MAFB* mRNA at the single-cell level using fluorescent *in situ* hybridization coupled to flow cytometry (fig.4E). After 3h of culture, monocytes upregulated *MAFB* in response to M-CSF, but in the presence of IL-4 and TNF- α , the proportion of *MAFB*-expressing monocytes was dramatically reduced while a distinct population of *IRF4*-expressing monocytes appeared, which was further increased in the presence of FICZ. These results show that external signals polarize monocytes towards mo-DC versus mo-Mac differentiation. In line with this, increasing concentrations in the culture of IL-4 (fig.S5B) or TNF α (fig.S5C) increased the proportion of mo-DC while reducing that of mo-Mac. In addition, the effect of FICZ on the culture outcome was strongly diminished in the absence of TNF α (fig.S5D). These results indicate that IL-4, TNF α and AHR signaling synergize for *IRF4* induction and mo-DC differentiation. Collectively, these results suggest the existence of a default differentiation pathway into mo-Mac, which can be switched to mo-DC differentiation in response to IL-4, TNF α and AHR ligands.

AHR acts through BLIMP-1

AHR activation triggers an autoregulatory feedback loop that restricts AHR signaling to a short timeframe (Stockinger et al., 2014). Therefore, we hypothesized that the effect of AHR activation on monocyte differentiation may be mediated by additional molecular regulators. In our differential transcriptomic analysis, we looked for transcription factors that could be induced by AHR activation based on literature (table S1). We identified *PRDMI* (encoding BLIMP-1) as a candidate. Studies on cell lines have suggested that *PRDMI* is a target of AHR (De Abrew et al., 2010; Ikuta et al., 2010). To analyze whether *PRDMI* was induced by AHR signaling in monocytes, we measured *PRDMI* expression during the early stages of monocyte culture in the presence or absence of FICZ or SR1 (fig.5A). We found that *PRDMI* was rapidly induced upon AHR activation within 3 hours, suggesting that *PRDMI* is a target of AHR. At the protein level, BLIMP-1 expression peaked during the first 24h of the culture then decreased (fig.5B). To address whether *PRDMI* was involved in monocyte differentiation, we knocked-down *PRDMI* expression using shRNA (fig.5C). *PRDMI* silencing significantly decreased mo-DC differentiation, while increasing the proportion of mo-Mac (fig.5D). To confirm that the effect of *AHR* was mediated by *PRDMI*, we silenced its expression in monocytes cultured in the presence or absence of FICZ (fig.5E). *PRDMI* silencing abolished the promotion of mo-DC differentiation by FICZ, while the proportion of mo-Mac was not fully restored to the level observed in control cells in the absence of FICZ. These results suggest that BLIMP-1 is essential for AHR-induced mo-DC differentiation.

AHR is involved in mo-DC differentiation *in vivo* in the mouse

To address the physiological relevance of our findings, we analyzed the role of AhR in mo-DC and mo-Mac differentiation *in vivo* in the mouse. In the steady-state dermis, mo-DC and

mo-Mac continuously differentiate *in situ* from monocytes recruited to the skin (Tamoutounour et al., 2013). Five populations of macrophage/monocyte-related cells have been described in mouse skin: dermal monocytes, mo-DC at an early stage of differentiation, fully differentiated mo-DC, MHC class II⁺ macrophages (which contain a majority of mo-Mac) and resident MHC class II⁻ macrophages (Tamoutounour et al., 2013). Transcriptomic analysis showed that *Ahr* and *Irf4* are more expressed in mo-DC than in macrophages, while *MafB* was more expressed in macrophages (fig.S6A, GEO accession code GSE49358), consistent with our findings in human monocyte-derived cells. In AhR-deficient mice, the proportion of skin mo-DC was decreased as compared to wild type (WT) littermates, while the proportion of MHC class II⁺ macrophages were increased (fig.6A-B and fig.S6B). Proportions of other skin DC subsets and of monocyte subsets in the spleen were similar between AhR-deficient and WT mice (fig.S6C-D). To confirm these findings, we increased AhR ligand availability *in vivo* by feeding mice with an experimental diet enriched for indole-3-carbinole (I3C), which is converted into an AhR ligand by stomach acids (Bjeldanes et al., 1991). In mice fed with I3C-supplemented diet, mo-DC were significantly increased and MHC class II⁺ macrophages were decreased in the skin compared to mice fed with a control diet (fig.6C). These results show that AhR is involved in the *in vivo* differentiation of dermal mo-DC.

Recently, *Irf4* was shown in the mouse to be involved in the differentiation of a population of peritoneal and pleural MHC II⁺CD226⁺ monocyte-derived cells, proposed to be mo-Mac (Kim et al., 2016). However, our results identify CD226 as a marker of human mo-DC, both *in vitro* and in ascites (fig.1D). To determine the identity of mouse MHC II⁺CD226⁺ monocyte-derived cells, we isolated them from the peritoneal lavage of C57BL/6 mice, and compared their morphology to that of ICAM2⁺ peritoneal macrophages (fig.6D). MHC

II⁺CD226⁺ cells display a typical DC morphology, distinct from that of *bona fide* ICAM2⁺ macrophages. Consistent with this, MHC II⁺CD226⁺ cells do not express the macrophage marker MerTK (fig.S6E) and CD226 is highly expressed by dermal mo-DC, but not by dermal macrophages (fig.S6A). These results identify Irf4-dependent MHC II⁺CD226⁺ cells as mo-DC. As previously reported (Kim et al., 2016), this population of peritoneal mo-DC is decreased upon antibiotics treatment (fig.6E). Antibiotics induce the loss of intestinal bacteria species that are a major source of endogenous AhR ligand (Zelante et al., 2013). To address whether the decrease of peritoneal mo-DC upon antibiotics treatment was AhR-dependent, we fed antibiotics-treated mice with a I3C-supplemented or control diet, and analyzed cells from the peritoneal lavage (fig.6E). Supplementation in AhR ligand restored mo-DC differentiation in antibiotics-treated mice almost up to normal levels.

Collectively, these results show that AhR activation in response to environmental stimuli has a key role in driving monocyte fate towards mo-DC *in vivo*.

AHR activation correlates with the presence of mo-DC in leprosy lesions

Finally, to put these findings in the context of human disease, we assessed AHR signaling and monocyte-derived cells presence in leprosy lesions, that contain granulomas in which monocytes are constantly recruited (Russell et al., 2009; Schreiber and Sandor, 2010). We analyzed published micro-array data from lepromatous (L-lep) and tuberculoid (T-lep) leprosy lesions (GEO accession code GSE17763). Patients with L-lep lesions display poor immunological responses against *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy, while patients with T-lep lesions have strong anti-*M. leprae* T cell responses. We first defined “AHR agonist” and “AHR antagonist” gene signatures based on publicly available transcriptomic data

(Di Meglio et al., 2014) (table S3). To assess whether AHR signaling was active in leprosy lesions, we performed Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (fig.7A and fig.S7A). We found that the “AHR agonist” signature was enriched in T-lep lesions, while the “AHR antagonist” signature was enriched in L-lep lesions. Consistent with this, *AHRR* and *CYP1A1*, which are upregulated upon AHR activation (Stockinger et al., 2014), were highly expressed in T-lep lesions while *IFIT1*, which is down-regulated by AHR (Di Meglio et al., 2014), was more expressed in L-lep lesions (fig.S7B). These results suggest that the AHR pathway was preferentially activated in T-lep lesions. To address the presence of mo-Mac and mo-DC, we performed GSEA using our gene signatures (table S2). The mo-DC signature was enriched in T-lep lesions, while the mo-Mac signature was enriched in L-lep lesions (fig.7A-B). By contrast, gene signatures of human Langerhans cells, skin CD1c⁺ DC or dermal macrophages (from (Carpentier et al., 2016)) were not enriched in either dataset (fig.S7A). Consistent with these results, *MERTK*, *CD163* and *FCGR3A* (encoding CD16) were more expressed in L-lep lesions and *CD1A*, *CD1B* and *FCERIA* were more expressed in T-lep lesions (fig.S7B). These results suggest that mo-DC are more abundant in T-lep lesions while mo-Mac are more numerous in L-lep lesions. This is in line with previous work showing the absence of CD1a⁺CD1b⁺CD1c⁺ DC in L-lep lesions (Sieling et al., 1999) and the increased presence of CD163⁺ macrophages in L-lep lesions (Montoya et al., 2009). Collectively, these results show that AHR activation correlates with the selective presence of mo-DC in L-lep lesions.

Discussion

In this work, we identify transcription factors involved in the differentiation of monocytes either into mo-Mac (MAFB) or into mo-DC (IRF4, AHR, BLIMP-1). These results

show that mo-DC and mo-Mac do not represent different states of polarized monocytes, but rather are distinct lineages controlled by two different sets of molecular regulators. Several studies have evidenced that monocyte differentiation into mo-DC or mo-Mac is context-dependent (Bain et al., 2013; Zigmond et al., 2012). Here we identify micro-environmental cues that shape monocyte fate. Our results suggest that, in the presence of M-CSF, monocytes differentiate into mo-Mac by default, unless they are exposed to certain cytokines (IL-4 and TNF α) in conjunction with AHR ligands, promoting mo-DC differentiation.

Our conclusions are primarily based on the use of an *in vitro* human monocyte differentiation model, but are reinforced by the validation of our main finding *in vivo* in a mouse model and the correlation between AHR activation and mo-DC presence in leprosy lesions. In addition, BLIMP-1 and IRF4 were identified in both mouse and human as preferentially expressed in intestinal CD103⁺CD11b⁺ DC (a proposed mo-DC population), and mice deficient for Blimp-1 in DC displayed a strongly reduced population of CD103⁺CD11b⁺ DC in the intestine (Watchmaker et al., 2014), further supporting the physiological relevance of our findings.

It was suggested that mouse monocytes can be separated into two subpopulations that are pre-committed to become mo-Mac in response to pathogens or mo-DC in response to GM-CSF (Menezes et al., 2016). Using two different datasets of single-cell RNA-seq, we could not identify distinct subpopulations of mo-DC and mo-Mac precursors within human CD14⁺ monocytes. This is consistent with a recent single-cell RNA-seq analysis showing that mouse Ly6C⁺ and Ly6C⁻ monocytes are not heterogeneous at the transcriptomic level (Mildner et al., 2017). Our results show that all monocyte subsets express a partial mo-Mac transcriptomic signature, but cues from the micro-environment can drive monocyte fate towards mo-DC or mo-

Mac. One hypothesis to explain how the same signals can induce different outcomes within a transcriptionally homogeneous population could be the stochastic heterogeneity in chromatin accessibility (Buenrostro et al., 2015).

MafB is highly expressed by all mouse macrophage populations except for lung macrophages (Gautier et al., 2012). Based on *in vitro* over-expression in myeloid progenitor cells, MafB has been proposed to induce macrophage differentiation (Bakri et al., 2005; Kelly et al., 2000). However, subsequent work showed that MafB is dispensable both *in vivo* and *in vitro* for murine macrophage differentiation from fetal progenitors (Aziz et al., 2006), suggesting that MafB is not essential for the initial stages of differentiation of embryonic-derived macrophages. MafB is rather involved in their terminal differentiation by repressing self-renewal genes (Aziz et al., 2009). Whether MafB is important for the differentiation of mouse macrophages in an inflammatory setting remains to be addressed.

Irf4 is preferentially expressed by mouse CD11b⁺ DC. Whether it is required for their development, or rather their migration and survival, remains unclear (Murphy et al., 2015). We show that *IRF4* is essential for human mo-DC differentiation, and its expression in human monocytes is induced by IL-4 in an AHR-dependent way. This is consistent with previous work showing *IRF4* expression upon culture with IL-4 in human and mouse monocytes (Briseno et al., 2016; Lehtonen et al., 2005). In addition, *Irf4*^{-/-} mouse monocytes cultured with GM-CSF and IL-4 fail to differentiate into mo-DC, but rather become mo-Mac (Briseno et al., 2016), supporting the idea of a default differentiation pathway into mo-Mac. We also show that mouse *Irf4*-dependent peritoneal monocyte-derived cells, initially described as mo-Mac (Kim et al., 2016), actually correspond to mo-DC, based on their morphology and phenotype.

Previous evidence suggests a major role for AhR in the control of inflammatory responses, in particular through its action on Th17 cell development and innate lymphoid cells homeostasis (Stockinger et al., 2014). Our work highlights an additional level of control by AhR ligands, by switching monocyte differentiation towards mo-DC, which are major producers of IL-23 and inducers of Th17 cells (Segura et al., 2013). Natural AhR ligands are derived from dietary intake (Bjeldanes et al., 1991) or produced through tryptophan catabolism at mucosal barriers (Fritsche et al., 2007; Zelante et al., 2013). AhR ligands can circulate throughout the body as evidenced by the regulation of astrocyte activity by microbiota-derived AhR ligands (Zelante et al., 2013), or the presence in milk of AhR ligands derived from the maternal microbiota (Gomez de Agüero et al., 2016).

Several studies have evidenced a deleterious role of monocyte-derived cells in pathological situations. mo-DC induce pathogenic T cells that mediate tissue damage in mice models of autoimmune or inflammatory diseases such as experimental autoimmune encephalomyelitis (Croxford et al., 2015) and colitis (Zigmond et al., 2012). Human “inflammatory” mo-DC likely contribute to the pathogenesis in Crohn's disease, rheumatoid arthritis and psoriasis through the secretion of high levels of IL-23 and the induction of Th17 cells (Kamada et al., 2008; Segura et al., 2013; Zaba et al., 2009), two major players in the pathogenesis of these diseases. In tumors, mo-Mac play a central role in the suppression of anti-tumoral immune responses (Noy and Pollard, 2014). Monocyte-derived cells have therefore emerged in the past few years as attractive therapeutic targets (Getts et al., 2014; Leuschner et al., 2011). By enabling a better understanding of the molecular ontogeny of human monocyte-derived cells, our results should provide new opportunities for the therapeutic manipulation of monocyte differentiation.

Author contributions. CG, ACV, NH, SA and ES designed experiments. ACo, ACV, ACr, TLTH, MB and ES performed experiments. CG, ACo, ACV, PG, SS and ES analyzed the data and prepared the figures. SB provided expertise on sequencing. CG, ACV, SA and ES wrote the manuscript, with input from PG, SS, MB, SB and NH. ES supervised the project.

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments

This work was supported by the program «Investissements d’Avenir» from Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LABX-0043 and ANR-10-IDEX-0001-02 PSL), the European Research Council (2013-AdG N° 340046 DCBIOX) (SA), La Ligue Nationale contre le Cancer (EL2014.LNCC/SA) (SA), Fondation Bristol-Myers Squibb pour la Recherche en Immunologie (ES), the National Human Genome Research Institute Centers of Excellence in Genomics Science P50 HG006193 (NH), the National Human Genome Research Institute NIH T32 HG002295 (SS) and the Banting Postdoctoral Fellowship (ACV). T-L Tang-Huau is supported by an industry-funded PhD fellowship at Université Paris Descartes. High-throughput sequencing performed by the ICGex NGS platform of the Institut Curie was supported by grants ANR-10-EQPX-03 (Equipex) and ANR-10-INBS-09-08 (France Génomique Consortium), by Cancéropôle Ile-de-France, by SESAME program from Région Ile-de-France and by SiRIC-Curie program (SiRIC Grant «INCa-DGOS- 4654»).

The authors wish to thank S.Dogniaux, M.Sieweke, S.Henri and B.Malissen for helpful discussions, X.Coumoul and L.Juricek for providing AhR^{-/-} mice and WT littermates, and the Flow Cytometry Platform of Institut Curie for cell sorting.

References

- Aziz, A., Soucie, E., Sarrazin, S., and Sieweke, M.H. (2009). MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* 326, 867-871.
- Aziz, A., Vanhille, L., Mohideen, P., Kelly, L.M., Otto, C., Bakri, Y., Mossadegh, N., Sarrazin, S., and Sieweke, M.H. (2006). Development of macrophages with altered actin organization in the absence of MafB. *Mol Cell Biol* 26, 6808-6818.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* 15, 929-937.
- Bain, C.C., Scott, C.L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Williams, M., Malissen, B., Agace, W.W., and Mowat, A.M. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C(hi) monocyte precursors. *Mucosal immunology* 6, 498-510.
- Bakri, Y., Sarrazin, S., Mayer, U.P., Tillmanns, S., Nerlov, C., Boned, A., and Sieweke, M.H. (2005). Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood* 105, 2707-2716.
- Bjeldanes, L.F., Kim, J.Y., Grose, K.R., Bartholomew, J.C., and Bradfield, C.A. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9543-9547.

Breton, G., Zheng, S., Valieris, R., Tojal da Silva, I., Satija, R., and Nussenzweig, M.C. (2016).

Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c⁺ or CD141⁺ DCs. *J Exp Med*.

Briseno, C.G., Haldar, M., Kretzer, N.M., Wu, X., Theisen, D.J., Kc, W., Durai, V., Grajales-Reyes, G.E., Iwata, A., Bagadia, P., *et al.* (2016). Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cell Rep* 15, 2462-2474.

Buenrostro, J.D., Wu, B., Litzenburger, U.M., Ruff, D., Gonzales, M.L., Snyder, M.P., Chang, H.Y., and Greenleaf, W.J. (2015). Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature* 523, 486-490.

Carpentier, S., Vu Manh, T.P., Chelbi, R., Henri, S., Malissen, B., Haniffa, M., Ginhoux, F., and Dalod, M. (2016). Comparative genomics analysis of mononuclear phagocyte subsets confirms homology between lymphoid tissue-resident and dermal XCR1(+) DCs in mouse and human and distinguishes them from Langerhans cells. *Journal of immunological methods* 432, 35-49.

Carvalho, B.S., and Irizarry, R.A. (2010). A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* 26, 2363-2367.

Chessel, D., Dufour, A.B., and Thioulouse, J. (2004). The ade4 package-I- One-table methods. *R News* 4.

Croxford, A.L., Lanzinger, M., Hartmann, F.J., Schreiner, B., Mair, F., Pelczar, P., Clausen, B.E., Jung, S., Greter, M., and Becher, B. (2015). The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2 Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity*.

Davies, L.C., Rosas, M., Jenkins, S.J., Liao, C.T., Scurr, M.J., Brombacher, F., Fraser, D.J., Allen, J.E., Jones, S.A., and Taylor, P.R. (2013). Distinct bone marrow-derived and tissue-

resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nature communications* *4*, 1886.

De Abrew, K.N., Kaminski, N.E., and Thomas, R.S. (2010). An integrated genomic analysis of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of B-cell differentiation. *Toxicol Sci* *118*, 454-469.

Di Meglio, P., Duarte, J.H., Ahlfors, H., Owens, N.D., Li, Y., Villanova, F., Tosi, I., Hirota, K., Nestle, F.O., Mrowietz, U., *et al.* (2014). Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity* *40*, 989-1001.

Eguiluz-Gracia, I., Bosco, A., Dollner, R., Melum, G.R., Lexberg, M.H., Jones, A.C., Dheyauldeen, S.A., Holt, P.G., Bækkevold, E.S., and Jahnsen, F.L. (2016). Rapid recruitment of CD14(+) monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* *137*, 1872-1881 e1812.

Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* *268*, 722-726.

Fritsche, E., Schafer, C., Calles, C., Bernsmann, T., Bernshausen, T., Wurm, M., Hubenthal, U., Cline, J.E., Hajimiragha, H., Schroeder, P., *et al.* (2007). Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 8851-8856.

Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., *et al.* (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* *13*, 1118-1128.

- Getts, D.R., Terry, R.L., Getts, M.T., Deffrasnes, C., Muller, M., van Vreden, C., Ashhurst, T.M., Chami, B., McCarthy, D., Wu, H., *et al.* (2014). Therapeutic inflammatory monocyte modulation using immune-modifying microparticles. *Science translational medicine* 6, 219ra217.
- Gomez de Agüero, M., Ganal-Vonarburg, S.C., Fuhrer, T., Rupp, S., Uchimura, Y., Li, H., Steinert, A., Heikenwalder, M., Hapfelmeier, S., Sauer, U., *et al.* (2016). The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* 351, 1296-1302.
- Gosselin, D., Link, V.M., Romanoski, C.E., Fonseca, G.J., Eichenfield, D.Z., Spann, N.J., Stender, J.D., Chun, H.B., Garner, H., Geissmann, F., and Glass, C.K. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* 159, 1327-1340.
- Greter, M., Helft, J., Chow, A., Hashimoto, D., Mortha, A., Agudo-Cantero, J., Bogunovic, M., Gautier, E.L., Miller, J., Leboeuf, M., *et al.* (2012). GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* 36, 1031-1046.
- Grimm, M.C., Pullman, W.E., Bennett, G.M., Sullivan, P.J., Pavli, P., and Doe, W.F. (1995). Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 10, 387-395.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14, 571-578.
- Haldar, M., Kohyama, M., So, A.Y., Kc, W., Wu, X., Briseno, C.G., Satpathy, A.T., Kretzer, N.M., Arase, H., Rajasekaran, N.S., *et al.* (2014). Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell* 156, 1223-1234.

- Ikuta, T., Ohba, M., Zouboulis, C.C., Fujii-Kuriyama, Y., and Kawajiri, K. (2010). B lymphocyte-induced maturation protein 1 is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *J Dermatol Sci* 58, 211-216.
- Jenner, W., Motwani, M., Veighey, K., Newson, J., Audzevich, T., Nicolaou, A., Murphy, S., Macallister, R., and Gilroy, D.W. (2014). Characterisation of leukocytes in a human skin blister model of acute inflammation and resolution. *PLoS One* 9, e89375.
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M.T., Sugita, A., Koganei, K., *et al.* (2008). Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest* 118, 2269-2280.
- Kauffmann, A., Gentleman, R., and Huber, W. (2009). arrayQualityMetrics--a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics* 25, 415-416.
- Kelly, L.M., Englmeier, U., Lafon, I., Sieweke, M.H., and Graf, T. (2000). MafB is an inducer of monocytic differentiation. *The EMBO journal* 19, 1987-1997.
- Kim, K.W., Williams, J.W., Wang, Y.T., Ivanov, S., Gilfillan, S., Colonna, M., Virgin, H.W., Gautier, E.L., and Randolph, G.J. (2016). MHC II+ resident peritoneal and pleural macrophages rely on IRF4 for development from circulating monocytes. *J Exp Med* 213, 1951-1959.
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* 159, 1312-1326.
- Lehtonen, A., Veckman, V., Nikula, T., Lahesmaa, R., Kinnunen, L., Matikainen, S., and Julkunen, I. (2005). Differential expression of IFN regulatory factor 4 gene in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 175, 6570-6579.

- Leuschner, F., Dutta, P., Gorbatov, R., Novobrantseva, T.I., Donahoe, J.S., Courties, G., Lee, K.M., Kim, J.I., Markmann, J.F., Marinelli, B., *et al.* (2011). Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol* 29, 1005-1010.
- McGovern, N., Schlitzer, A., Gunawan, M., Jardine, L., Shin, A., Poyner, E., Green, K., Dickinson, R., Wang, X.N., Low, D., *et al.* (2014). Human Dermal CD14(+) Cells Are a Transient Population of Monocyte-Derived Macrophages. *Immunity* 41, 465-477.
- Menezes, S., Melandri, D., Anselmi, G., Perchet, T., Loschko, J., Dubrot, J., Patel, R., Gautier, E.L., Hugues, S., Longhi, M.P., *et al.* (2016). The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS+ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity* 45, 1205-1218.
- Mildner, A., Schonheit, J., Giladi, A., David, E., Lara-Astiaso, D., Lorenzo-Vivas, E., Paul, F., Chappell-Maor, L., Priller, J., Leutz, A., *et al.* (2017). Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBPbeta Transcription Factor Dependence of Ly6C- Cells. *Immunity* 46, 849-862 e847.
- Mildner, A., Yona, S., and Jung, S. (2013). A close encounter of the third kind: monocyte-derived cells. *Advances in immunology* 120, 69-103.
- Montoya, D., Cruz, D., Teles, R.M., Lee, D.J., Ochoa, M.T., Krutzik, S.R., Chun, R., Schenk, M., Zhang, X., Ferguson, B.G., *et al.* (2009). Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe* 6, 343-353.
- Murphy, T.L., Grajales-Reyes, G.E., Wu, X., Tussiwand, R., Briseno, C.G., Iwata, A., Kretzer, N.M., Durai, V., and Murphy, K.M. (2015). Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. *Annu Rev Immunol*.

- Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* *41*, 49-61.
- Okabe, Y., and Medzhitov, R. (2014). Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* *157*, 832-844.
- Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., *et al.* (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med*.
- Russell, D.G., Cardona, P.J., Kim, M.J., Allain, S., and Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* *10*, 943-948.
- Satija, R., Farrell, J.A., Gennert, D., Schier, A.F., and Regev, A. (2015). Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol* *33*, 495-502.
- Schlitzer, A., Sivakamasundari, V., Chen, J., Sumatoh, H.R., Schreuder, J., Lum, J., Malleret, B., Zhang, S., Larbi, A., Zolezzi, F., *et al.* (2015). Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat Immunol* *16*, 718-728.
- Schreiber, H.A., and Sandor, M. (2010). The role of dendritic cells in mycobacterium-induced granulomas. *Immunology letters* *130*, 26-31.
- Segura, E., and Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* *34*, 440-445.
- Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiochia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013). Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* *38*, 336-348.

Servant, N., Gravier, E., Gestraud, P., Laurent, C., Paccard, C., Biton, A., Brito, I., Mandel, J., Asselain, B., Barillot, E., and Hupe, P. (2010). EMA - A R package for Easy Microarray data analysis. *BMC Res Notes* 3, 277.

Sieling, P.A., Jullien, D., Dahlem, M., Tedder, T.F., Rea, T.H., Modlin, R.L., and Porcelli, S.A. (1999). CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol* 162, 1851-1858.

Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3.

Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., and Duarte, J.H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu Rev Immunol* 32, 403-432.

Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., *et al.* (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925-938.

van der Maaten, L. (2013). Barnes-Hut-SNE. *Proceedings of the International Conference on Learning Representations*.

Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A., and Stockinger, B. (2009). Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J Exp Med* 206, 43-49.

Villani, A.C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., *et al.* (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356.

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

Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D., and Bieber, T. (1996). Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* *106*, 446-453.

Wong, K.L., Tai, J.J., Wong, W.C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.H., Kourilsky, P., and Wong, S.C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* *118*, e16-31.

Zaba, L.C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N.J., Abello, M.V., Novitskaya, I., Pierson, K.C., Gonzalez, J., Krueger, J.G., and Lowes, M.A. (2009). Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol* *129*, 79-88.

Zelante, T., Iannitti, R.G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., Zecchi, R., D'Angelo, C., Massi-Benedetti, C., Fallarino, F., *et al.* (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* *39*, 372-385.

Zheng, G.X., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Ziraldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., *et al.* (2017). Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nature communications* *8*, 14049.

Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliah, E., Satpathy, A.T., Friedlander, G., Mack, M., Shpigel, N., Boneca, I.G., Murphy, K.M., *et al.* (2012). Ly6C(hi) Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells. *Immunity* 37, 1076-1090.

Figure legends

Fig. 1. Monocytes cultured with MCSF, IL-4 and TNF α yield DC and macrophages that closely resemble inflammatory DC and macrophages found *in vivo*. (A-F) CD14⁺ monocytes isolated by positive selection using magnetic beads were cultured with MCSF, IL-4 and TNF α for 5 days. (A) Cell-sorted CD1a⁺ and CD16⁺ cells were analyzed after cytopsin and Giemsa/May-Grünwald staining. Bar=10 μ m. N=5. (B) Cell-sorted CD1a⁺ and CD16⁺ cells were cultured with allogeneic naive CD4 T cells for 6 days. Number of T cells having divided is shown. Mean +/- SEM (n=5). (C) Cell-sorted mo-DC (CD1a⁺ cells) and mo-Mac (CD16⁺ cells) were cultured for 24 hours with or without dimerized CD40-L. IL-23 secretion was analyzed by ELISA and IL-6 secretion by CBA. Each symbol represents an individual donor (n=14). (D) CD14⁺ monocytes were cultured with MCSF, IL-4 and TNF α , or GM-CSF and IL-4. Cells were analyzed by flow cytometry and compared to ascites mo-DC and mo-Mac. Grey shaded histograms represent isotype control stainings. N=6. (E) Cell-sorted CD1a⁻CD16⁻ cells, mo-DC and mo-Mac were re-cultured with MCSF, IL-4 and TNF α , and analyzed by flow cytometry after 2 days. Grey shaded histograms represent isotype control stainings. N=8. (F) Monocytes were stained with a proliferation dye and cultured with or without phytohaemagglutinin-L (PHA-L). Percentage of cells having divided. N=6. (G) Transcriptomic analysis of cell-sorted DC and macrophages differentiated in MCSF, IL-4 and TNF α (n=6), in IL-34, IL-4 and TNF α (n=6), DC differentiated in GM-CSF and IL-4 (n=6), DC and macrophages from tumor ascites (n=5), blood CD14⁺ monocytes (n=4) and blood CD1c⁺ DC (n=4). Principal component analysis on the 1000 most variant genes. *See also Figure S1.*

Fig. 2. IRF4 and MafB are essential for mo-DC and mo-Mac differentiation. (A) Volcano plot showing the fold change and significance of transcription factor genes between ascites mo-DC and mo-Mac. Genes not expressed in *in vitro*-generated mo-DC or mo-Mac were filtered out. Adjusted p values determined by differential expression analysis. (B) Cell-sorted ascites mo-DC and mo-Mac, and blood CD14⁺ monocytes (Mono) were analyzed by Western Blot. N=4. (C) CD14⁺ monocytes were cultured with MCSF, IL-4 and TNF α for 3h, 6h, 12h or 24h, or processed directly after isolation (0). *IRF4* and *MAFB* expression were analyzed by RT-qPCR in total cells. Each color represents an individual donor (n=5). (D) CD14⁺ monocytes were cultured with MCSF, IL-4 and TNF α for 5 days. Total cells were lysed at different days and analyzed by Western Blot. N=5. (E-H) Monocytes were infected at day 0 with lentivirus containing sh RNA against *IRF4* (E-F), or *MAFB* (G-H), or control sh RNA. After 5 days of culture, cells were analyzed by Western Blot (E and G), or by flow cytometry (F and H). (E and G) Silencing quantified based on Western Blot stainings. (F and H) Proportions of DC and macrophages in the culture at day 5. Each symbol represents an individual donor (F n=6, H n=8). *p<0.05, **p<0.01. See also Figure S2.

Fig. 3. Monocytes are not heterogeneous for the expression of mo-DC and mo-Mac gene signatures. (A-B) CD14⁺ monocytes isolated by positive selection using magnetic beads were analyzed by single-cell RNA-seq using a drop-seq approach. Colors represent unbiased clustering from graph-based clustering. Each dot represents an individual cell from one donor. T-SNE analysis of individual cells for (A) total cells (n=424) or (B) CD16⁻ cells only (n=320). (C-D) Cell-sorted monocyte and DC populations from blood were analyzed by single-cell RNA-seq using a Smart-seq2 approach. (C-D) Heat map of scaled expression (log values of transcripts per

million) of signature genes for mo-DC and mo-Mac (C) and selected genes (D). *See also Figure S3.*

Fig. 4. AHR is a molecular switch for mo-DC versus mo-Mac differentiation. (A-B) CD14⁺ monocytes were infected at day 0 with lentivirus containing sh RNA against *AHR*, or control sh RNA. After 5 days of culture, cells were analyzed by Western Blot (A) or by flow cytometry (B). (A) Silencing quantified based on Western Blot stainings. (B) Proportions of DC and macrophages in the culture at day 5. Each symbol represents an individual donor (n=6). *p<0.05. (C) Monocytes were cultured with MCSF, IL-4 and TNF α for 5 days, in the presence of various concentrations of FICZ (AHR agonist) or SR1 (AHR inhibitor). Proportions of DC and macrophages at day 5. Each symbol represents an individual donor (n=10 for FICZ and n=8 for SR1). (D-E) CD14⁺ monocytes were analyzed directly after isolation, or were cultured for 3h in medium alone or with various combinations of MCSF, IL-4, TNF α , FICZ or SR1. (D) Relative expression of *IRF4* and *MAFB* measured by RT-qPCR. Box plots representing the 5-95 percentile (n=6). (E) Expression of *IRF4* and *MAFB* at the single cell level was measured by fluorescent *in situ* hybridization coupled to flow cytometry. Proportions of *IRF4*⁺ and *MAFB*⁺ cells. Each symbol represents an individual donor (n=6). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. *See also Figure S4 and S5.*

Fig. 5. AHR acts on mo-DC differentiation through BLIMP-1. (A) CD14⁺ monocytes were cultured with MCSF, IL-4 and TNF α for 3h, 6h, 12h or 24h in the presence or absence of FICZ or SR1, or processed directly after isolation (0). *PRDMI* expression measured by RT-qPCR. Each color represents an individual donor (n=5). (B) Monocytes were cultured with MCSF, IL-4

and TNFa for 5 days. Total cells were lysed at different days and analyzed by Western Blot. N=4. (C-E) Monocytes were infected at day 0 with lentivirus containing sh RNA against *PRDMI*, or control sh RNA. After 5 days of culture, cells were analyzed by Western Blot (C) or by flow cytometry (D-E). (C) Silencing quantified based on Western Blot stainings. (D) Proportions of DC and macrophages in the culture at day 5. Each symbol represents an individual donor (n=8). *p<0.05. **p<0.01. (E) Cells were cultured in presence or absence of 62 pM FICZ. Proportions of DC and macrophages in the culture at day 5. Each symbol represents an individual donor (n=6). *p<0.05.

Fig. 6. AhR is involved in mo-DC differentiation *in vivo* in the mouse. (A-C) Ear skin from individual AhR^{-/-} mice or WT littermates (A-B), or C57BL/6 mice fed with an experimental diet supplemented or not with indole-3-carbinol (I3C) (C), was digested to prepare single-cell suspensions. After gating on live CD45⁺CD3⁻NK1.1⁻CD19⁻Ly6G⁻CD24⁻CD11b⁺ cells, cells were separated into 5 subsets based on the expression of Ly6C, CD64, MHC II and CCR2. (A) One representative AhR^{-/-} and WT mouse is shown. (B-C) Proportions of monocytes, early mo-DC, mo-DC, MHC II⁺ macrophages and resident MHC II⁻ macrophages among Ly6C⁺ or CD64⁺ cells. Each symbol represents an individual mouse (B n=9 in 2 independent experiments, C n=12 in 2 independent experiments). *p<0.05, **p<0.01. (D-E) Cells from the peritoneal lavage were analyzed by flow cytometry. After gating on live CD115⁺CD11b⁺ cells, cells were separated into MHCII⁺CD226⁺ cells and ICAM2⁺MHCII⁻ cells. (D) Cell-sorted cells were analyzed after cyospin and Giemsa/May-Grünwald staining. Bar=10 μm. Representative of 2 independent experiments. (E) C57BL/6 mice fed with an experimental diet supplemented or not with I3C, and treated or not with a cocktail of antibiotics. Percentage of MHCII⁺CD226⁺ mo-DC among

CD115⁺CD11b⁺ cells is shown. Each symbol represents an individual mouse (n=6 in 2 independent experiments). *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001. *See also Figure S6.*

Fig. 7. AHR activation correlates with high expression of mo-DC signature genes in leprosy lesions. Gene expression data from lepromatous (L-lep, n=7) or tuberculoid (T-lep, n=10) leprosy lesions was extracted from publicly available micro-array data (GSE17763). Gene set enrichment analysis (GSEA) analysis was performed on comparisons of L-lep versus T-lep for selected gene signatures. (A) Schematic BubbleGUM map of GSEA analysis. Red bubbles indicate enrichment in L-lep and blue bubbles enrichment in T-lep data sets. Strength of enrichment is represented by normalized enrichment score (NES). Significance of enrichment is represented by the false discovery rate (FDR). ns=not significant. (B) Gene set enrichment plot for mo-DC and mo-Mac gene signatures. *See also Figure S7.*

STAR Methods

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Elodie Segura (elodie.segura@curie.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Human samples. Samples of ovarian or breast tumor ascites from untreated patients were obtained from Hôpital de l'Institut Curie (Paris) in accordance with hospital guidelines. Ovarian cancer ascites were used for transcriptomic analysis, and both ovarian and breast cancer ascites were used for flow cytometry. Buffy coats from healthy donors were obtained from Etablissement Français du Sang (Paris) in accordance with INSERM ethical guidelines. According to French Public Health Law (art L 1121-1-1, art L 1121-1-2), written consent and IRB approval are not required for human non-interventional studies.

Mice. AhR^{-/-} mice (B6.129-Ahr^{tm1Gonz/Nci}) have been described previously (Fernandez-Salguero et al., 1995), and were kindly provided by X.Coumoul (INSERM UMR_S1124, Université René Descartes, Paris, France). AhR^{-/-} mice and WT littermates were maintained under specific pathogen-free conditions at the animal facility of INSERM UMR_S1124 in accordance with institutional guidelines. AhR^{-/-} female mice and WT female littermates were sacrificed at age 7-9 weeks. C57BL/6 female mice were maintained under specific pathogen-free conditions at the animal facility of Institut Curie in accordance with institutional guidelines. In some experiments, C57BL/6 mice were maintained on a purified diet (AIN-93M, Safe diets) supplemented or not with 200 p.p.m. indole-3-carbinol (Sigma) for at least 4 weeks, starting when the mice were 3 weeks-old. In some experiments, C57BL/6 mice were treated orally during 2-3 weeks with

antibiotics (Sigma) in drinking water: vancomycin (0.5 g/L), neomycin (1 g/L), ampicillin (1 g/L) and metronidazole (1 g/L). Antibiotics activity was confirmed by macroscopic changes observed at the level of caecum. All animal procedures were in accordance with the guidelines and regulations of the French Veterinary Department.

METHOD DETAILS

Monocyte isolation and culture. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were prepared by centrifugation on a Ficoll gradient (Lymphoprep, Greiner Bio-One). Blood CD14⁺ monocytes were isolated from healthy donors' PBMC by positive selection using magnetic beads (Miltenyi). Monocytes were 95-98% CD14⁺CD16⁻ as assessed by flow cytometry. In some experiments, monocytes were isolated on a cell sorter (Aria, BD Biosciences) after staining PBMC with APC-eFluor780 anti-HLA-DR (eBioscience, clone LN3), Pe/Cy7 anti-CD11c (Biolegend, clone Bu15), PE anti-CD14 (BD Biosciences, clone M5E2) and APC anti-CD16 (Biolegend, clone 3G8). In some experiments, CD16⁺ monocytes were isolated from PBMC using CD16⁺ monocytes selection kit (Miltenyi). Monocytes (1×10^6 cells/mL) were cultured for 5 days in RPMI-Glutamax medium (Gibco) supplemented with antibiotics (penicillin and streptomycin) and 10% Fetal Calf Serum in the presence or absence of 100 ng/mL M-CSF (Miltenyi), 100 ng/mL IL-34 (R&D Biotechne), 100 ng/mL GM-CSF (Miltenyi), 40 ng/mL IL-4 (Miltenyi) and 5 ng/mL TNF- α (R&D Biotechne). Cytokines were added only at the start of the culture, and medium was not refreshed during the course of the culture. Cell populations were isolated by cell sorting on a FACSAria instrument (BD Biosciences). In some experiments, monocytes were cultured in the presence of various concentrations of Stemregen-1 (Cayman chemicals) or 6-Formylindolo(3,2-b)carbazole (FICZ) (Enzo Life Sciences). In some experiments, monocytes

were stained with Cell Trace Violet (Thermo Fisher Scientific) prior to culture, and cultured in the presence or absence of 2 µg/mL PHA-L (Sigma).

Flow cytometry. Cells were stained in PBS containing 0.5% human serum and 2mM EDTA with APC anti-CD1a (Biolegend, clone HI149) or APC-Vio770 anti-CD1a (Miltenyi, clone HI149) or PE-Vio770 anti-CD1a (Miltenyi, clone HI149), FITC or APC anti-CD16 (Biolegend, clone 3G8), APC-eFluor780 anti-HLA-DR (eBioscience, clone LN3), Pe/Cy7 anti-CD11c (Biolegend, clone Bu15), PerCP-eFluor710 anti-CD1c (eBioscience, clone L161) or APC anti-CD1c (Biolegend, clone L161), PE anti-CD11b (BD Biosciences, clone M1/70), PE anti-FcεRI (eBioscience, clone AER-37), Alexa647 anti-CD206 (Biolegend, clone 15-2), PE anti-CD163 (Biolegend, clone GHI/61), APC anti-CD226 (Miltenyi, clone DX11), APC anti-MerTK (R&D Biotechne, clone 125518), PE anti-CD141 (Miltenyi, clone AD5-14H12), PE anti-CD88 (Biolegend, clone S5/1), APC anti-CD1b (eBioscience, clone eBioSN13), PE anti-CD64 (Biolegend, clone 10.1), PE anti-CD14 (BD Biosciences, clone M5E2), biotinylated anti-CD172a (Biolegend, clone SE5A5) followed by staining with APC streptavidin (eBioscience), or isotype-matched control antibodies. Cells were analyzed on a FACSVerse (BD Biosciences) or MACSQuant (Miltenyi) instrument. Data was analyzed with FlowJo (FlowJo LLC).

Morphological analysis. Cells were subjected to cytopspin and colored with May-Grunwald/Giemsa staining (Sigma). Pictures were taken with a CFW-1308C color digital camera (Scion Corporation) on a Leica DM 4000 B microscope.

MLR. Allogeneic CD4⁺ T cells were isolated from healthy donors' PBMC by negative selection using a naive CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi). CD4⁺ T cells were stained with Cell Trace CFSE (Thermo Fisher Scientific) and cultured (5×10^4 cells/well) with different numbers of antigen-presenting cells. After 6 days, T cell proliferation was assessed by flow cytometry.

Affymetrix micro-array hybridization. RNA was extracted using the RNAsasy Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. For each condition, 100 ng of polysomal-bound RNA were employed to synthesize double-stranded cDNA using two successive reverse-transcription reactions according to the standard Affymetrix protocol. Labelled DNA was hybridized on the Affymetrix human Gene ST1.1, an oligonucleotide 28,000-gene microarray processed on an Affymetrix GeneTitan device.

Affymetrix Microarray Data Analysis. Microarray data were carried out with R (version 3.1.0) using packages from the Bioconductor. Raw data CEL files were used and the quality control analysis was performed using *ArrayQualityMetrics* package (Kauffmann et al., 2009). The raw data were preprocessed using the RMA (Robust Multi-array Average) method available in *oligo* package (Carvalho and Irizarry, 2010). Gene expression levels were analyzed on a base-2 logarithmic scale. Moderated t-tests were performed using the *limma* package (Smyth, 2004) and the p-values were corrected for multiple testing with the Benjamini Hochberg method. Probeset were considered as statistically differentially expressed if associated adjusted p-value was lower than 5%.

PCA. The analysis was performed in two steps. First, samples were grouped in "in vitro" (IL34 mo-Mac, IL34 mo-DC, M-CSF mo-Mac, M-CSF mo-DC, GM-CSF mo-DC) or "ex vivo" (monocytes, ascites mo-Mac, ascites mo-DC, CD1c+ DC) datasets, and genes which were only expressed in one group were excluded from the analysis. In the second step, the Principal Component Analysis (PCA) was performed using *Ade4* package (Chessel et al., 2004) of the R software (version 3.1.0) using 1000 genes expression profiles with the highest interquartile range (IQR) values obtained with EMA package (Servant et al., 2010). The two first components of the PCA represent 41% of the total variance. The barycenters were calculated in each condition and

indicated into the PCA plot. The 95% confidence ellipses were also drawn around the barycenters.

Identification of transcription factors. To identify genes involved in monocyte differentiation into mo-DC, we have implemented a strategy of analysis that identified the genes that are concomitantly (i) up-regulated genes in ascites mo-DC compared to monocytes, (ii) up-regulated genes in ascites mo-DC compared to ascites mo-Mac, (iii) up-regulated genes in IL34 mo-DC compared to IL34 mo-Mac and (iv) up-regulated genes in M-CSF mo-DC compared to M-CSF mo-Mac. After running this pipeline, a list of genes was obtained and we extracted only genes coding for transcription factors. The list of transcription factors was downloaded from AnimalTFDB website (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/AnimalTFDB/>). The exact same approach was used to identify candidate genes involved in differentiation into mo-Mac.

Single cell RNA-seq library preparation. Cellular suspensions (1700 cells) were loaded on a 10X Chromium instrument (10X Genomics) according to manufacturer's protocol based on the 10X GEMCode proprietary technology. Single-cell RNA-Seq libraries were prepared using Chromium Single Cell 3' v2 Reagent Kit (10X Genomics) according to manufacturer's protocol. Briefly, the initial step consisted in performing an emulsion where individual cells were isolated into droplets together with gel beads coated with unique primers bearing 10X cell barcodes, UMI (unique molecular identifiers) and poly(dT) sequences. Reverse transcription reactions were engaged to generate barcoded full-length cDNA followed by the disruption of emulsions using the recovery agent and cDNA clean up with DynaBeads MyOne Silane Beads (Thermo Fisher Scientific). Bulk cDNA was amplified using a GeneAmp PCR System 9700 with 96-Well Gold Sample Block Module (Applied Biosystems) (98 °C for 3 min; cycled 14 × : 98 °C for 15 s, 67 °C for 20 s, and 72 °C for 1 min; 72 °C for 1 min; held at 4 °C). Amplified cDNA product was

cleaned up with the SPRI select Reagent Kit (Beckman Coulter). Indexed sequencing libraries were constructed using the reagents from the Chromium Single Cell 3' v2 Reagent Kit, following these steps: (1) fragmentation, end repair and A-tailing; (2) size selection with SPRI select; (3) adaptor ligation; (4) post ligation cleanup with SPRI select; (5) sample index PCR and cleanup with SPRI select beads. Library quantification and quality assessment was performed using Qubit fluorometric assay (Invitrogen) with dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit and Bioanalyzer Agilent 2100 using a High Sensitivity DNA chip (Agilent Genomics). Indexed libraries were equimolarly pooled and sequenced on an Illumina HiSeq2500 using paired-end 26x98bp as sequencing mode. Using a full Rapid flow cell, a coverage around 100M reads per sample (around 1000 cells) were obtained corresponding to 100,000 reads/cell.

Single-cell RNA-seq data analysis. Single-cell expression data used in figures 3 A-B and S3 A-C was analyzed using the Cell Ranger Single Cell Software Suite (v1.3.1) to perform quality control, sample de-multiplexing, barcode processing, and single-cell 3' gene counting (Zheng et al., 2017). Sequencing reads were aligned to the UCSC hg19 transcriptome using the Cell Ranger suite with default parameters. A total of 856 single cells were analyzed, from two different donors. The samples consisted of 425 and 431 cells. Each sample was normalized separately. Mean raw reads per cell were 289,807 and 320,866 respectively. Further analysis was performed in R (v3.3) using the Seurat package (v1.4.0.14) (Satija et al., 2015). The gene-cell-barcode matrix of the samples was log-transformed and filtered based on the number of genes detected per cell (any cell with less than 400 genes per cell was filtered out). Regression in gene expression was performed based on the number of unique molecular identifiers (UMI) and the percentage of mitochondrial genes. Only genes detected in at least 10 cells were included. Cells were then scaled to a total of 10^4 molecules. Any cell with more than 10% of mitochondrial UMI

counts was filtered out. Altogether, 424 and 429 cells were kept for statistical analysis. To reduce data dimensionality, 2089 and 2127 variable genes were selected based on their expression and dispersion (expression cut-off=0.0125, and dispersion cut-off=0.5). PCA was run on the normalized gene-barcode matrix. Barnes-hut approximation to *t*-SNE (van der Maaten, 2013) was then performed on the first 30 principal components to visualize cells in a two-dimensional space. The first 30 principal components were used for the *t*-SNE projection and clustering analysis using the Elbow Plot approach. Clusters were identified using the “Find_Clusters” function in Seurat with a resolution parameter of 0.6. This graph-based clustering method relies on a clustering algorithm based on shared nearest neighbor (SNN) modularity optimization. Unique cluster-specific genes were identified by running the Seurat « Find_All_Markers » function using default parameters. Names for Cluster 1 and 2 were assigned based on *FCGR3A* (encoding CD16) expression levels. Heatmaps were plotted using Seurat.

Single-cell expression data used in figures 3 C-D and S3 D-E was obtained from GEO GSE94820 (supplementary file: GSE94820_raw.expMatrix_DCnMono.discovery.set.submission.txt.gz) and analysis was performed with the Seurat R package following the methodology described in (Villani et al., 2017). Briefly, (1) low-quality cells (requiring a minimum of 3000 expressed genes, where a gene is considered expressed if it has non-zero read count in at least 3 cells) and contaminating cells (basophils detected as in (Villani et al., 2017)) were filtered out, and DoubleNeg cells were excluded from the analysis in 3 C-D; (2) heatmaps were used to visualize scaled (*z*-score) gene expression level ($\log_2(\text{TPM}+1)$) of gene sets of interest, either grouping cells according to the classical subset definitions (fig.3C-D) or according to the revised subset definition (fig.S4 D-E)

(Villani et al., 2017), where the purple-yellow color scheme corresponds to z -score distribution, from -2.5 to 2.5 .

GSEA analysis. GSEA analysis were performed using published gene signatures for Langerhans cells, skin CD1c⁺ DC and dermal macrophages (Carpentier et al., 2016), AHR agonist and antagonist signatures from (Di Meglio et al., 2014), and has been performed with the default parameters except for the number of permutations that we fixed at $n = 10000$ and the number of min gene at $n = 8$.

Western blot. Cells were lysed in RIPA buffer (Thermo Scientific) supplemented with cOmplete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). Post-nuclear lysates were resolved by SDS-PAGE using 4-12% BisTris NuPAGE gels (Invitrogen) and proteins were transferred to membranes (Immunoblot PVDF membranes, Bio-Rad). Membranes were stained with primary antibodies against IRF4 (Cell Signaling, #4964), AhR (Enzo Life Science, BML-SA210), Blimp-1 (NovusBio, clone 3H2-E8), MafB (NovusBio, NBP1-81342), hsp70 (Enzo Life Science, clone C92F3A-5) or actin (Millipore, clone C4), followed by HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch). Some membranes were incubated with "Re-blot Plus" buffer (Millipore).

Cytokine secretion. Cells (2.5×10^4 cells/well) were incubated during 24 hours in Yssel medium in the presence or absence of $1 \mu\text{g/mL}$ R848 (Invivogen), $1 \mu\text{g/mL}$ dimerized CD40-ligand (Alexis) and $100 \mu\text{g/mL}$ Uric Acid (Invivogen). Supernatants were collected and kept at -20°C . Cytokine secretion was assessed by CBA (BD Biosciences) or ELISA (for IL-23, eBioscience).

Fluorescent *in situ* hybridization coupled to flow cytometry. Purified monocytes were kept on ice or cultured during 3 hours in the presence or absence of M-CSF, IL-4, TNF- α or 62 pM

FICZ. Dead cells were identified using LIVE/DEAD fixable Aqua dye (Thermo Fischer Scientific). Cells were analyzed using PrimeFlow RNA Assay (eBioscience) according to the manufacturer's protocol with Alexa647-IRF4 and Alexa488-MAFB probes. Cells were analyzed on a FACS Verse instrument (BD Biosciences).

shRNA interference. shRNA (all from Sigma) against *IRF4* (sh1: NM_002460-TRCN0000014764, sh2: NM_002460-TRCN0000014767), *AHR* (sh1: NM_001621-TRCN0000021254, sh2: NM_001621-TRCN0000021256), *MAFB* (sh1: NM_005461-TRCN0000017680, sh2: NM_005461-TRCN0000017681), *PRDMI* (sh1: NM_001198-TRCN0000013608, sh2: NM_001198-TRCN0000013609) or nontargeting control shRNA (MISSION shRNA SHC002) were in the LKO.1-puro vector (Sigma). Viral particles were produced by transfection of 293FT cells in 6-well plates with 3 µg DNA and 8 µl TransIT-293 (Mirus Bio) per well: for VSV-G pseudotyped SIVmac VLPs, 0.4 µg CMV-VSVG and 2.6 µg pSIV3⁺; for shRNA vectors, 0.4 µg CMV-VSV-G, 1 µg psPAX2 and 1.6 µg LKO1puro-derived shRNA vector. One day after 293FT cells transfection, culture medium was replaced by fresh medium. Viral supernatants were harvested 1 day later and filtered through 0.45 µm filters. Freshly isolated CD14⁺ monocytes were infected with viral particles containing the control vector or individual shRNA vectors, and cultured as above. Puromycin (InvivoGen) was added 2 days later (2 µg/mL). At day 5, cells were harvested for analysis.

PCR. Cells were harvested and lysed in RLT buffer (Qiagen). RNA extraction was carried out using the RNeasy micro kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Total RNA was retro-transcribed using the superscript II polymerase (Invitrogen), in combination with random hexamers, oligo dT and dNTPs (Promega). Transcripts were quantified by real time PCR on a 480 LightCycler instrument (Roche). Reactions were carried out in 10 µL, using a master mix

(Eurogentec), with the following Taqman Assays primers (Thermo Fisher Scientific): B2M (Hs99999907_m1), RPL34 (Hs00241560_m1), HPRT1 (Hs02800695_m1), IRF4 (Hs01056533_m1), CYP1A1 (Hs01054797_g1), MAFB (Hs00271378_s1), PRMD1 (Hs00153357_m1). Cp from each analyte were obtained using the second derivative maximum method, and the transcripts were quantified as fold changes in comparison to the mean of the three housekeeping genes (B2M, HPRT1 and RPL34).

Analysis of mouse skin cells. Skin cells were isolated from ear skin. Ears were split into ventral and dorsal parts, and incubated overnight at 4°C in PBS containing 2.5 mg/mL dispase II (Roche). Ears were then cut into small pieces using scalpels, and incubated for 90 min at 37°C in RPMI-Glutamax medium containing 0.5 mg/mL DNase (Roche) and 1 mg/mL collagenase 4 (Roche). Cell suspensions were filtered through a 40 µm cell strainer and washed in PBS containing 2% Fetal Calf Serum and 2mM EDTA. Cells were stained with FITC anti-Ly6C (BD Biosciences, clone AL-21), PE anti-CCR2 (R&D Biotechne, clone 475301), PeCy5 anti-CD24 (Biolegend, clone M1/69), PerCPCy5.5 anti-CD45 (eBioscience, clone 30-F11), PeCy7 anti-CD11b (BD Biosciences, clone M1/70), Alexa647 anti-CD64 (BD Biosciences, clone X54-5/7.1), Alexa700 anti-IA^b (eBioscience, clone M5/114.15.2), APCCy7 anti-CD45R (clone RA3-6B2), APCCy7 anti-NK1.1 (clone PK136), APCCy7 anti-CD3 (clone 145-2C11), APCCy7 anti-Ly6G (clone 1a8) (all from Biolegend). Cells were analysed on a LSR II instrument (BD Biosciences).

Analysis of mouse peritoneal cells. Peritoneal lavage was obtained after injection of 5 mL of PBS into the peritoneal space of sacrificed mice. Cell suspensions were filtered through a 40 µm cell strainer and washed in PBS containing 2% Fetal Calf Serum and 2mM EDTA. Cells were stained with FITC anti-ICAM2 (Biolegend, clone MIC2/4), PE anti-CD226 (Biolegend, clone

10E5), APC anti-CD115 (eBioscience, clone AFS98), PerCPCy5.5 anti CD11b (BD Biosciences, clone M1/70), APCCy7 anti-MHCII (Biolegend, clone M5/114.15.2) and PeCy7 anti-MerTK (eBioscience, clone DS5MMER) or PeCy7 isotype control. Cells were analyzed on a FACS Verse instrument (BD Biosciences) or sorted on an Astrios cell sorter (Beckman Coulter).

Analysis of mouse spleen cells. Mouse spleens were cut into small pieces using scalpels, and incubated for 30 min at room temperature in RPMI-Glutamax medium containing 0.5 mg/mL DNase (Roche) and 1 mg/mL collagenase 4 (Roche). Cell suspensions were filtered through a 40 μ m cell strainer and washed in PBS containing 2% Fetal Calf Serum and 2mM EDTA. Red blood cells were lysed using Red Blood Cells Lysis Buffer (Sigma). Cells were stained with FITC anti-CD8a (BD Biosciences, clone 53-6.7), PE anti-CD3 (BD Biosciences, clone 145-2C11) and anti-CD19 (BD Biosciences, clone 1D3), PerCPCy5.5 anti-CD11b (BD Biosciences, clone M1/70), PeCy anti-CD11c (BD Biosciences, clone N418), APC anti-Ly6C (BD Biosciences, clone AL-21), APC-Cy7 anti-IA^b (Biolegend, clone M5/114.15.2). Cells were analysed on a FACS Verse instrument (BD Biosciences).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis. Wilcoxon matched paired test (fig. 1, 2, 3, 4, 5, S1, S5), Mann-Whitney test (fig. S7) and unpaired t-test (fig. 6 and S6) were performed using Prism (GraphPad Software). Statistical details for each experiment can be found in the corresponding figure legend. N corresponds to the number of individual donors or the number of individual mice analyzed.

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

The Affymetrix data has been deposited in GEO (Accession number XXX). The sequencing data from single-cell RNA-seq has been deposited in GEO (Accession number XXX).

Supplemental item titles

Fig.S1 related to Fig.1. Characterisation of the monocyte differentiation model.

Fig.S2 related to Fig.1. Analysis of monocyte-derived cells.

Fig.S3 related to Fig.3. Single-cell RNA-seq analysis of monocytes.

Fig.S4 related to Fig.4. AHR inhibition or activation does not alter cell phenotype.

Fig.S5 related to Fig.5. AHR synergizes with IL-4 and TNF α to induce mo-DC differentiation.

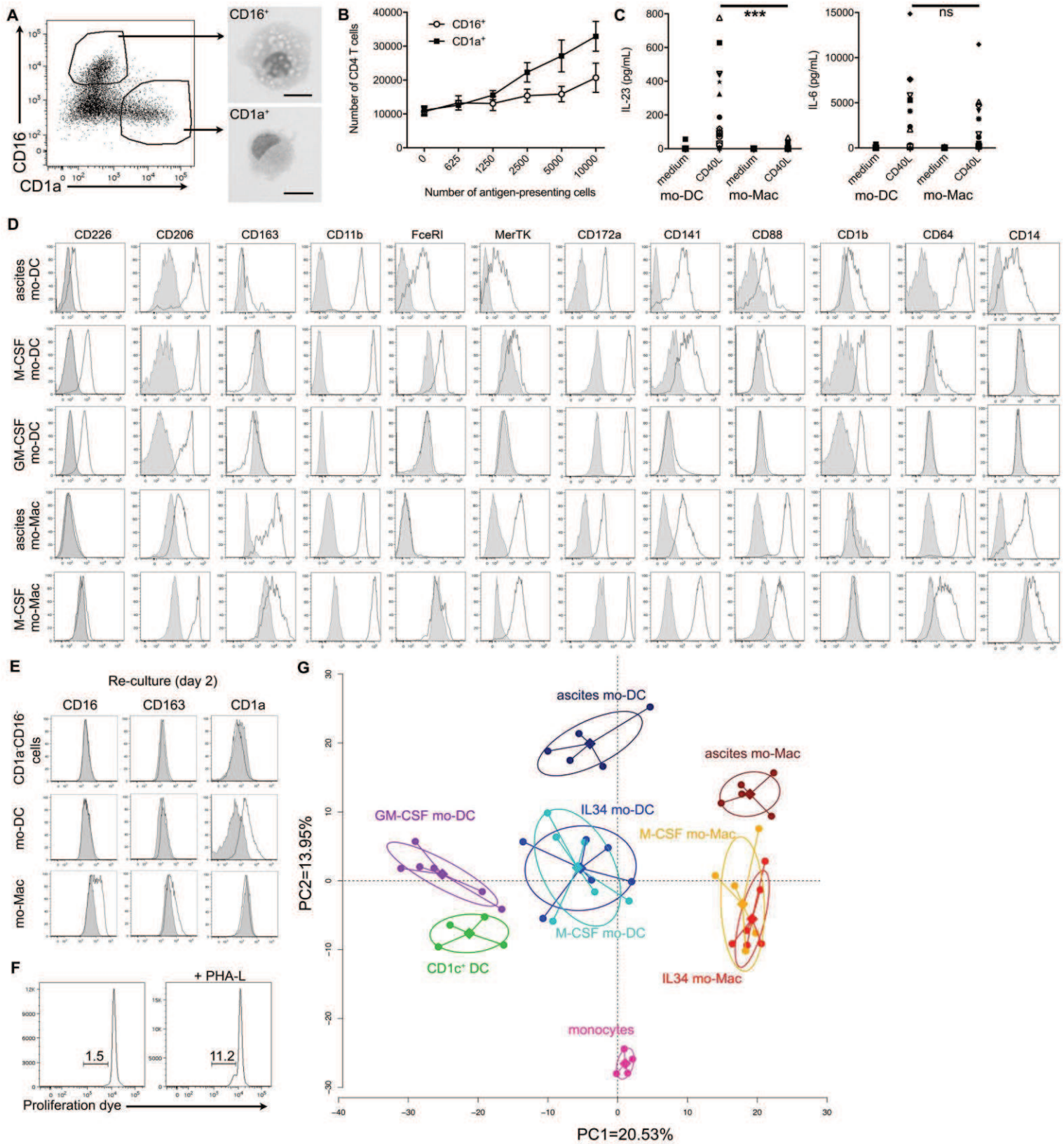
Fig.S6 related to Fig.6. Analysis of mouse monocyte-derived cells.

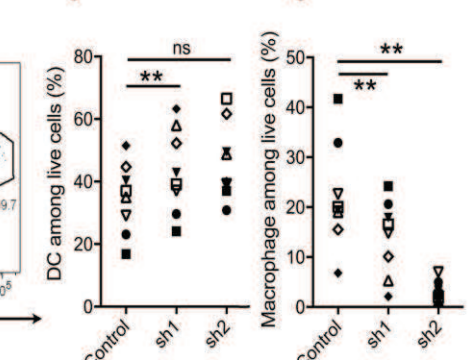
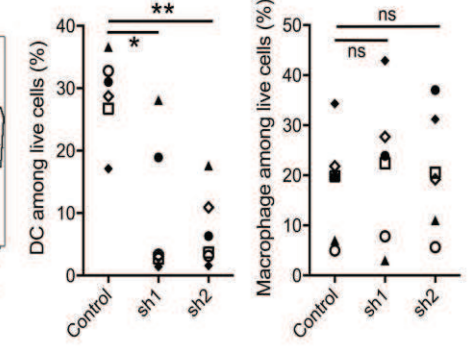
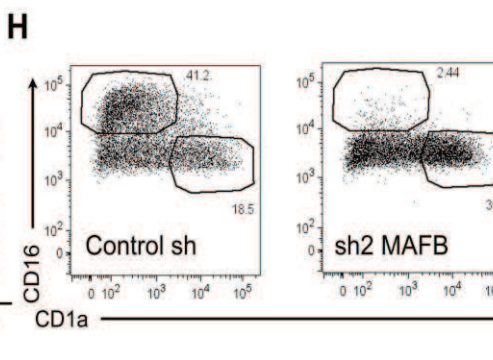
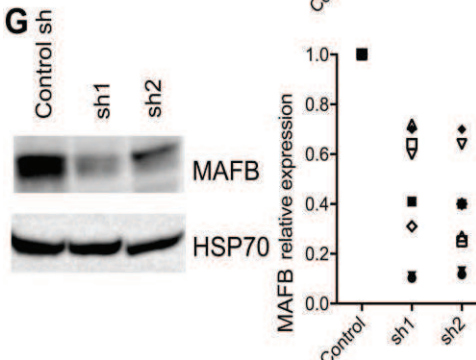
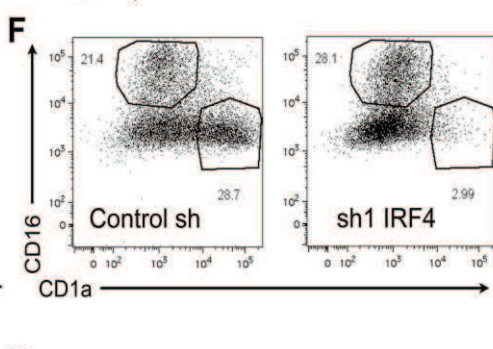
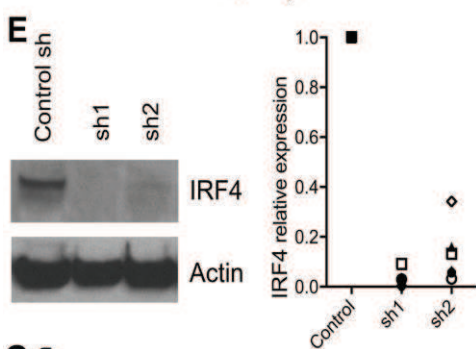
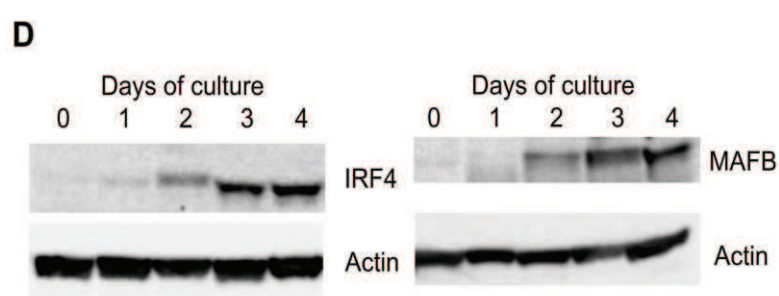
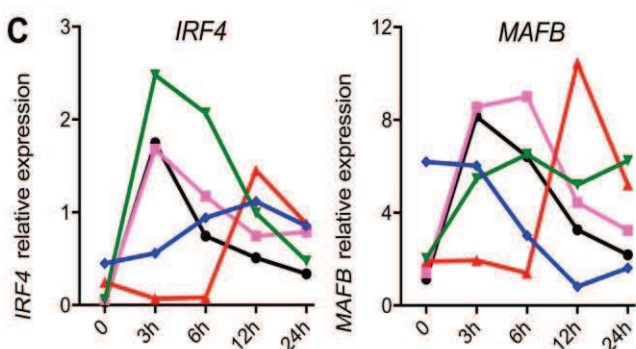
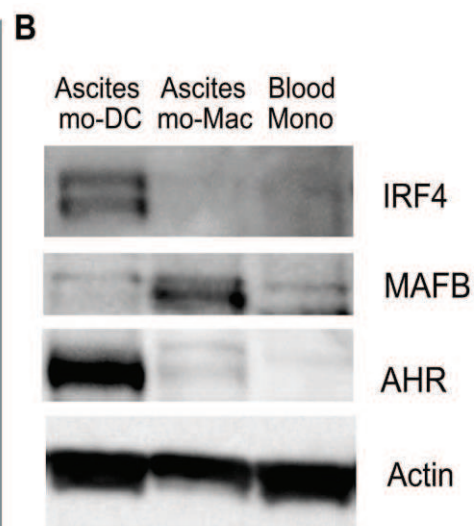
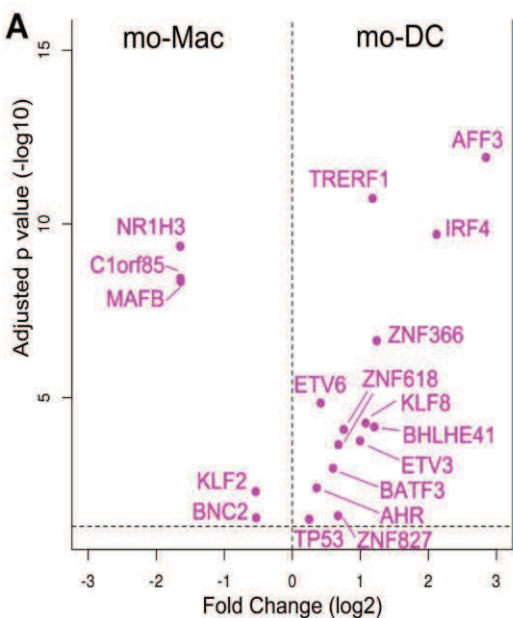
Fig.S7 related to Fig.7. Analysis of gene expression in leprosy lesions.

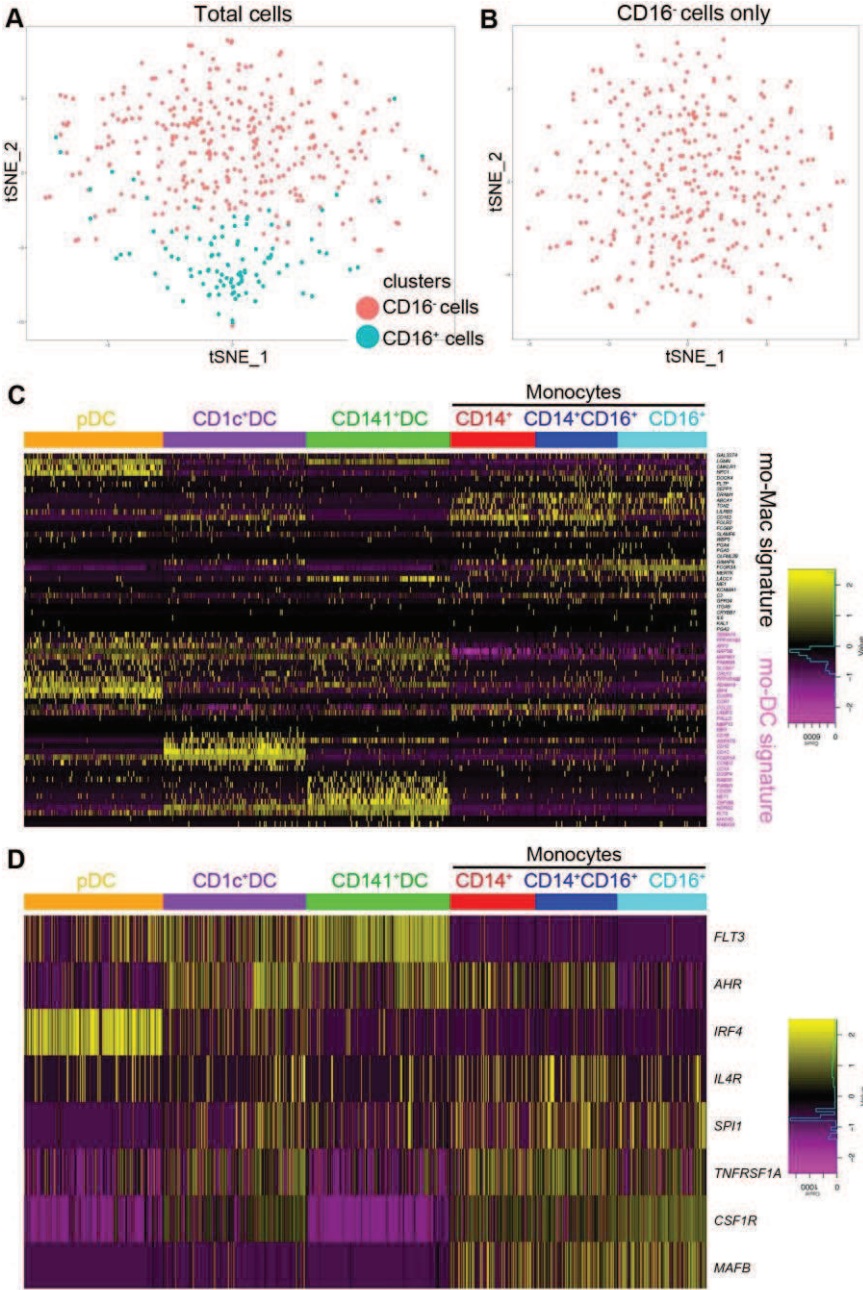
Table S1 related to Fig.2. List of transcription factor genes upregulated in ascites mo-DC versus ascites mo-Mac.

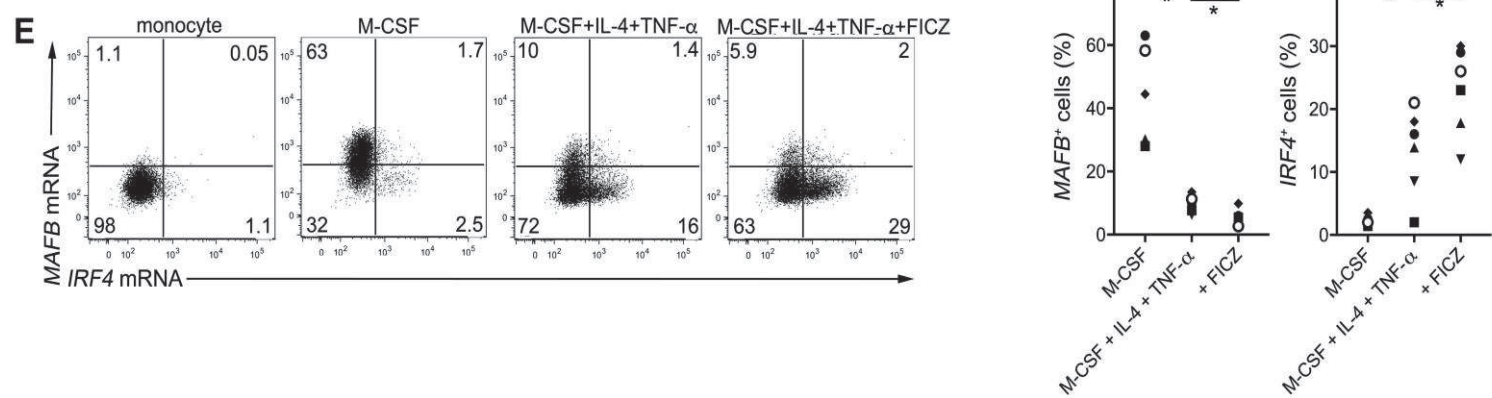
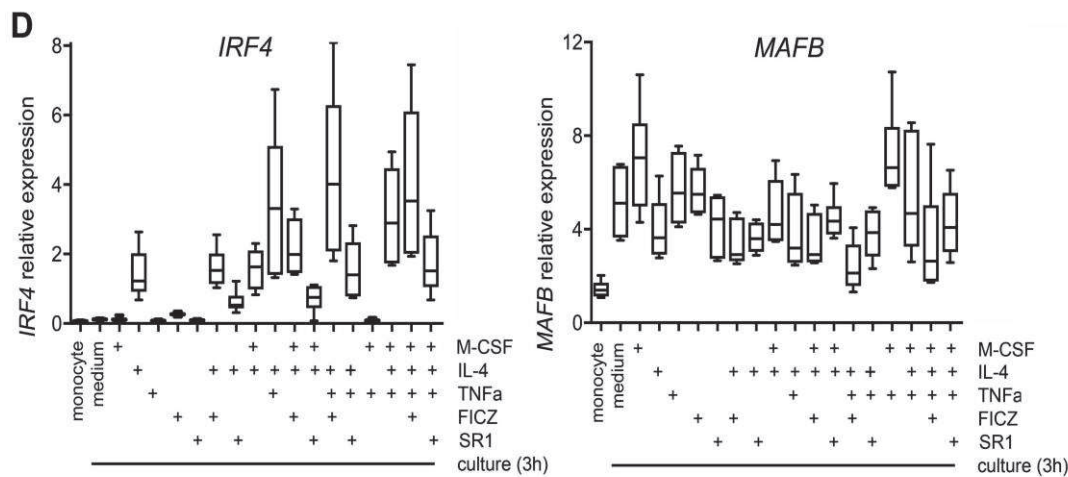
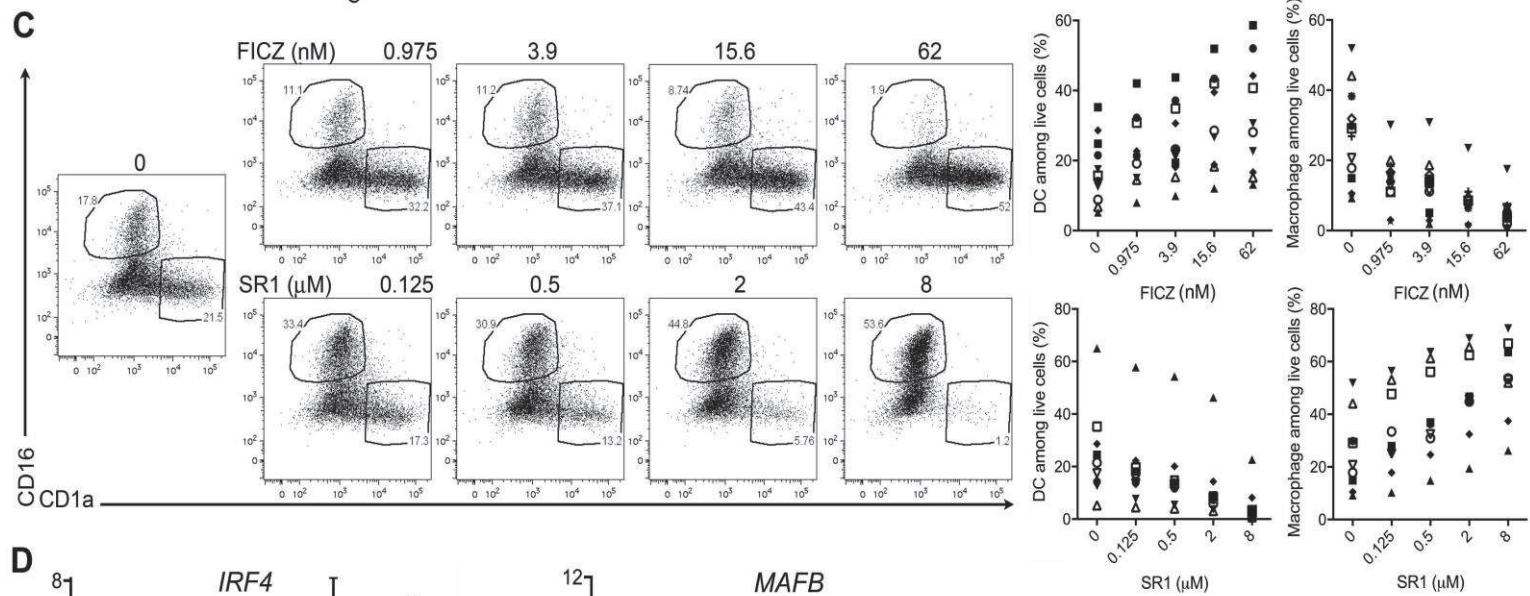
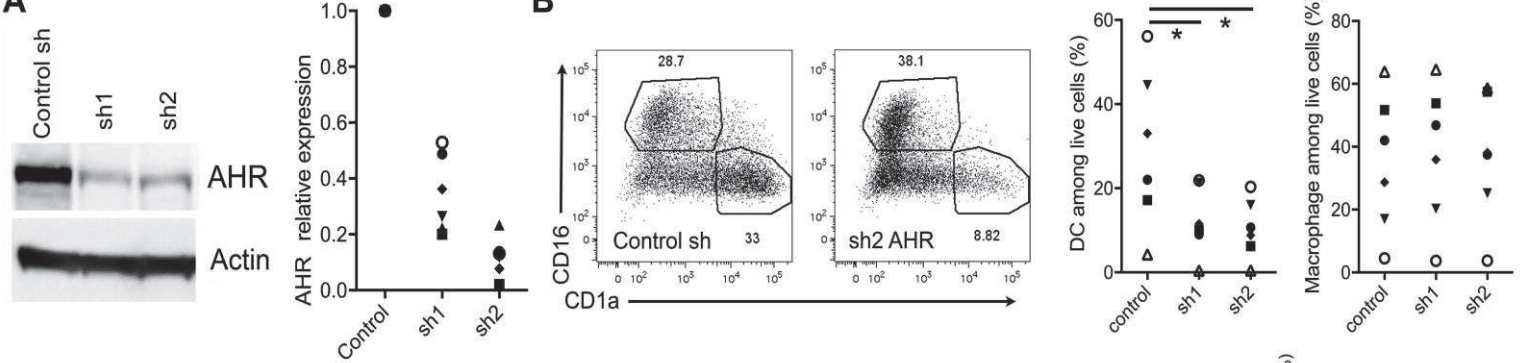
Table S2 related to Fig.3. List of genes for mo-DC and mo-Mac signatures.

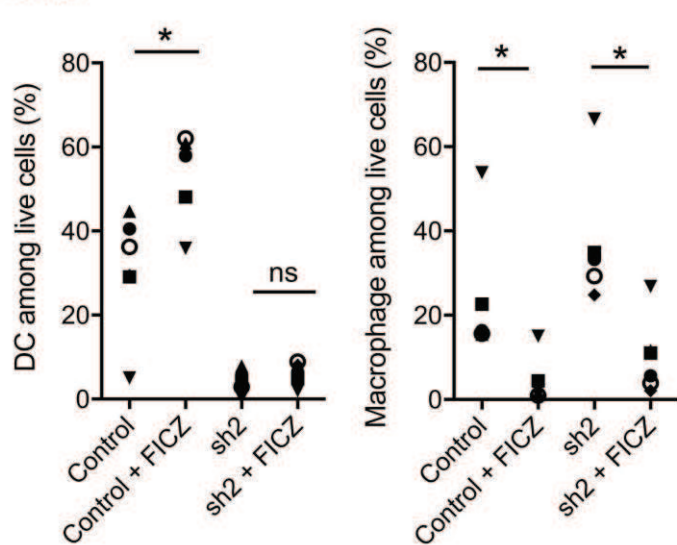
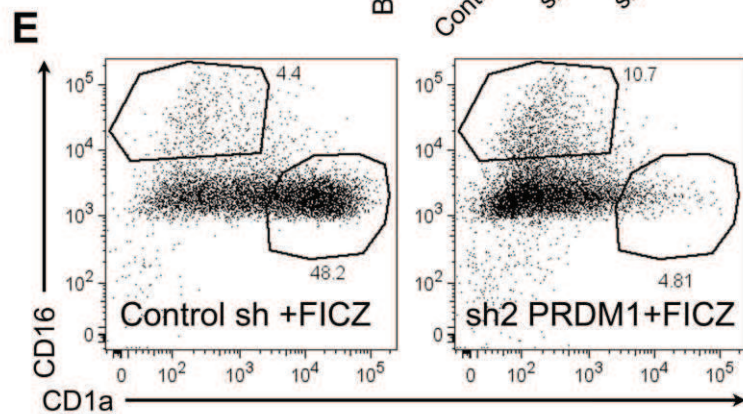
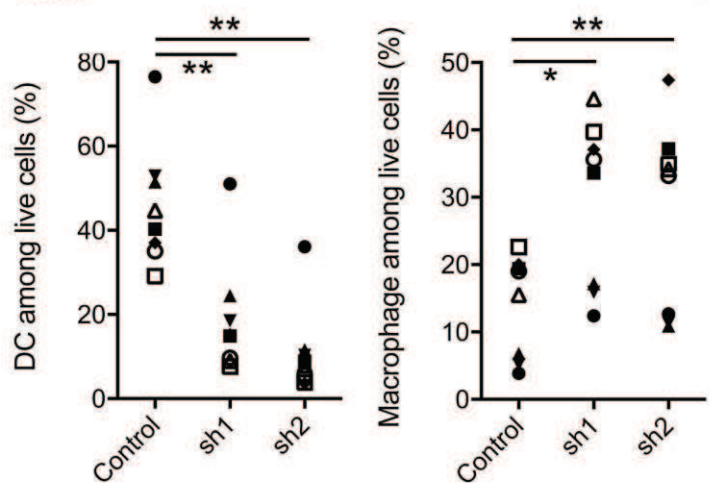
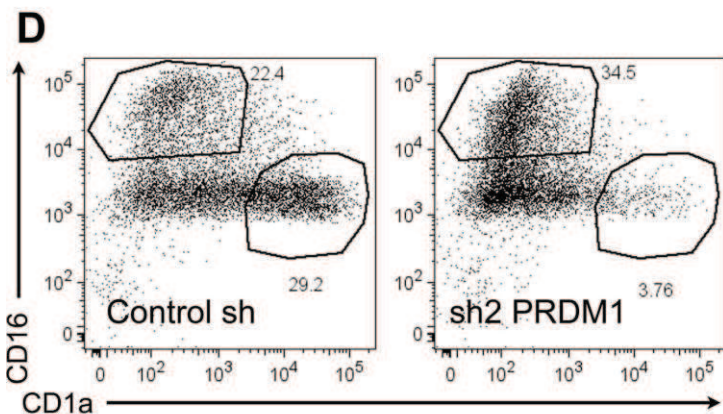
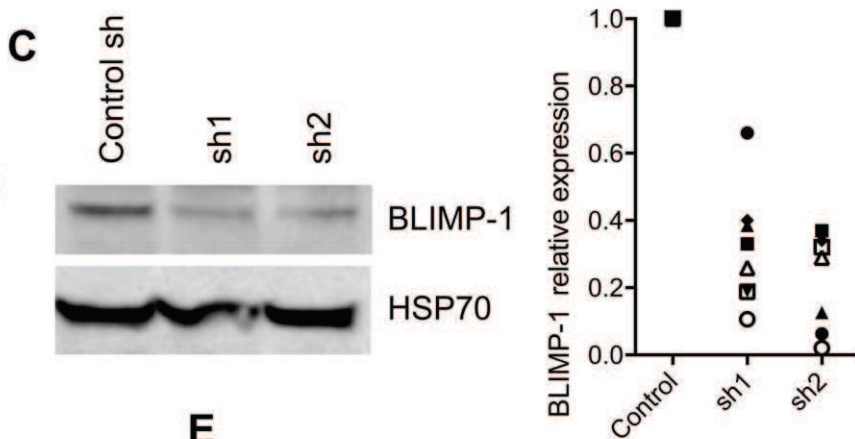
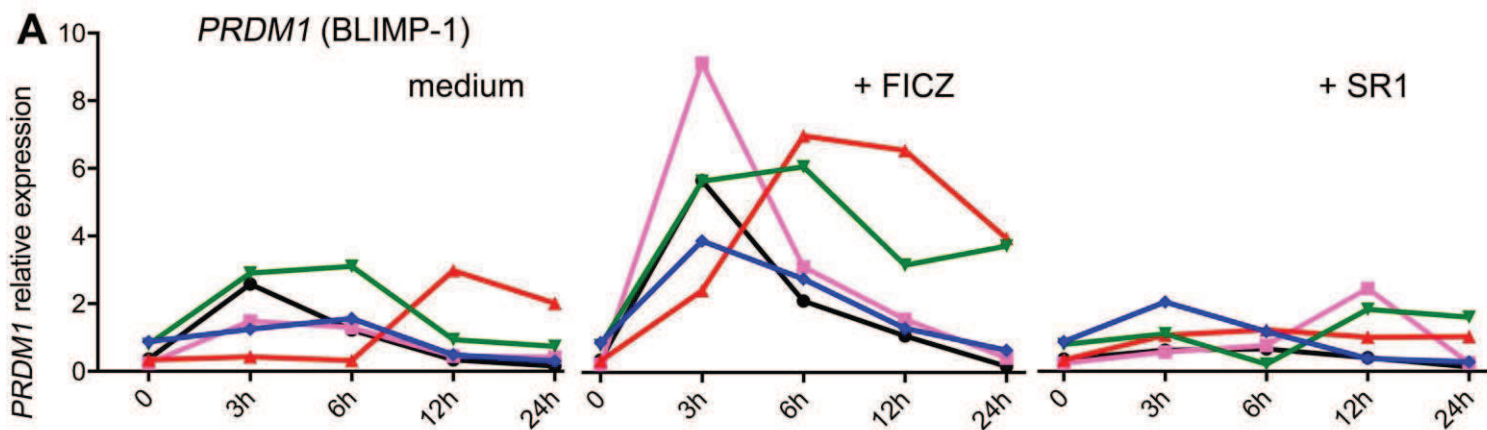
Table S3 related to Fig.7. List of genes for “AHR agonist” and “AHR antagonist” signatures

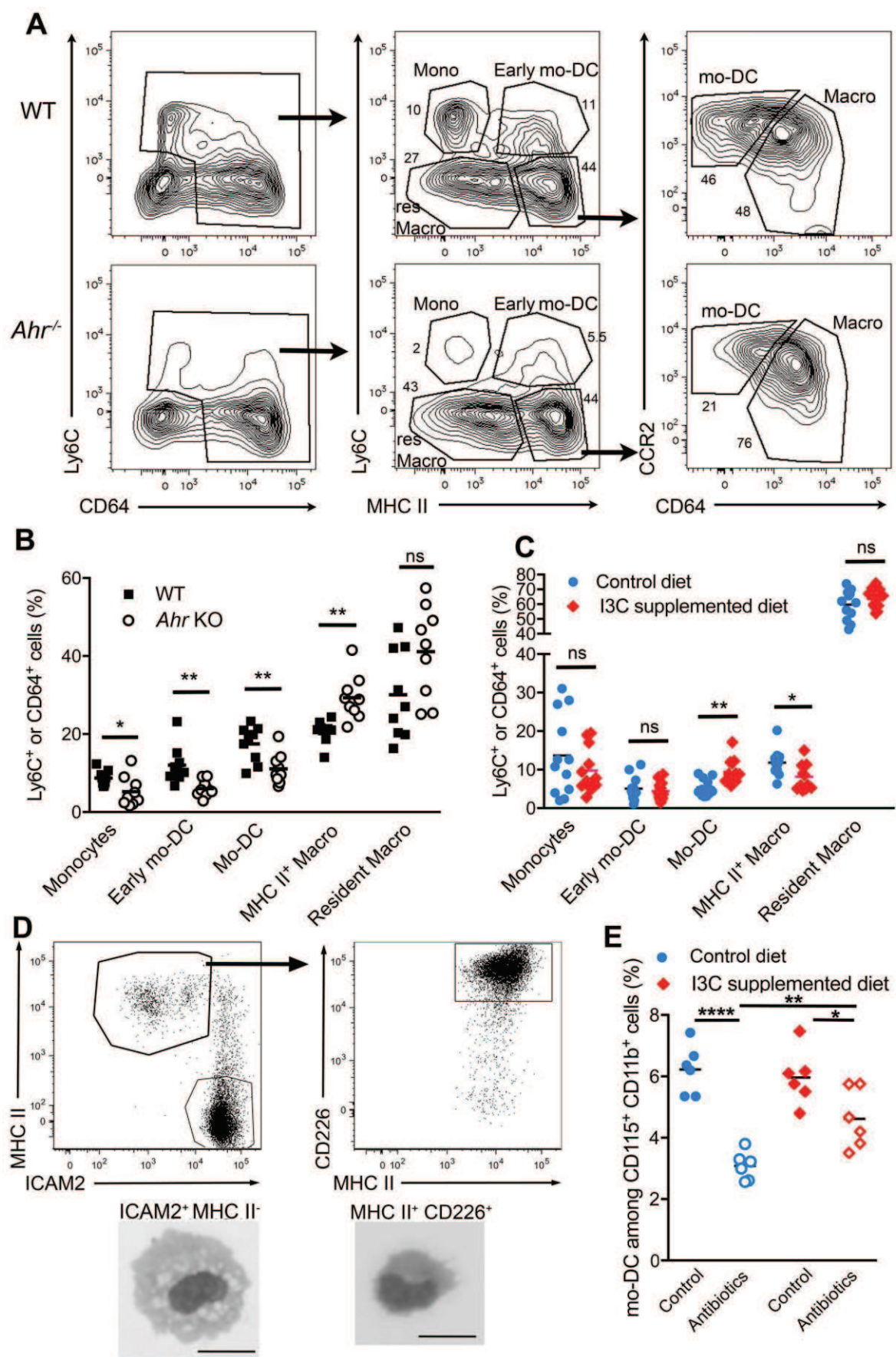


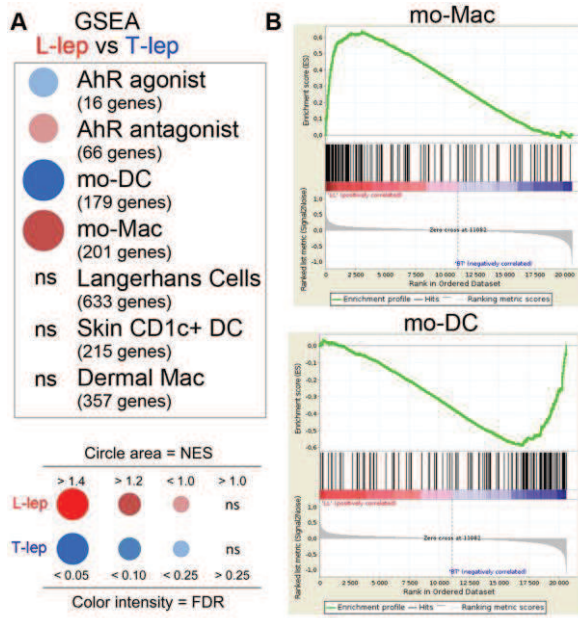












Supplemental information

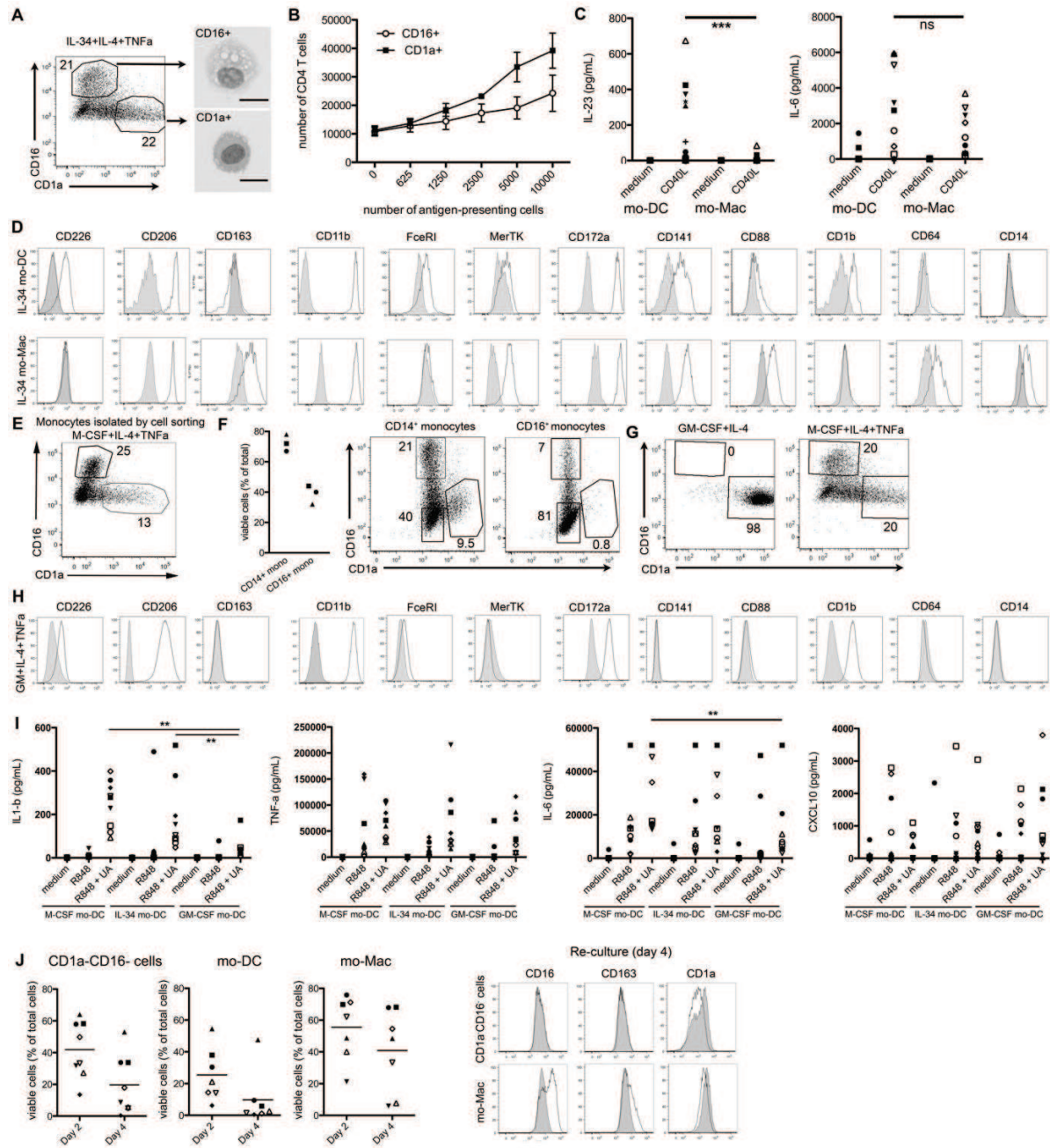


Fig.S1 related to Fig.1. Characterisation of the monocyte differentiation model. (A-D) CD14⁺ monocytes isolated by positive selection using magnetic beads were cultured with IL-34, IL-4 and TNF- α for 5 days. (A) Sorted CD1a⁺ and CD16⁺ cells were analyzed after cytospin and Giemsa and May-Grünwald staining. Bar=10 μ m. Representative of 3 independent experiments. (B) Cell-sorted CD1a⁺ and CD16⁺ cells were cultured with allogeneic naive CD4 T cells for 6 days and CD4 T cell proliferation was assessed by flow cytometry. Mean +/- SEM of 5 independent experiments. (C) Cell-sorted DC (CD1a⁺ cells) and macrophages (CD16⁺ cells) were cultured for 24 hours with or without dimerized CD40-L. IL-23 secretion was analyzed by ELISA and IL-6 secretion by CBA. Each symbol represents an individual donor (n=12). (D) Cells were analyzed by flow cytometry. Grey shaded histograms represent isotype control stainings. Representative of 6 independent experiments. (E) Blood CD14⁺ monocytes were isolated by cell sorting and cultured with M-CSF, IL-4 and TNF- α for 5 days. Representative of 5 independent experiments. (F) Blood CD16⁺ monocytes were isolated using magnetic beads and cultured with M-CSF, IL-4 and TNF- α for 5 days. Percentage of viable cells at the end of the culture is shown (n=3). Cells were analyzed by flow cytometry for CD16 and CD1a expression. Representative of 3 independent experiments. (G) CD14⁺ monocytes were cultured with GM-CSF and IL-4 or M-CSF, IL-4 and TNF- α for 5 days. Representative of

10 independent experiments. (H) CD14⁺ monocytes were cultured with GM-CSF, IL-4 and TNF- α for 5 days. Cells were analyzed by flow cytometry. Grey shaded histograms represent isotype control stainings. Representative of 6 independent experiments. (I) CD14⁺ monocytes were cultured for 5 days with MCSF, IL-4 and TNF- α , or IL-34, IL-4 and TNF- α , or GM-CSF and IL-4. Cell-sorted DC were cultured for 24 hours with or without R848 and uric acid crystals (UA). Cytokine secretion was analyzed by CBA. Each symbol represents an individual donor (n=9). **p<0.01. (J) Cell-sorted CD1a⁻CD16⁻ cells, mo-DC and mo-Mac were re-cultured with MCSF, IL-4 and TNF- α , and analyzed by flow cytometry after 2 or 5 days. Percentage of viable cells is shown (n=8). Grey shaded histograms represent isotype control stainings. Representative of 8 independent experiments.

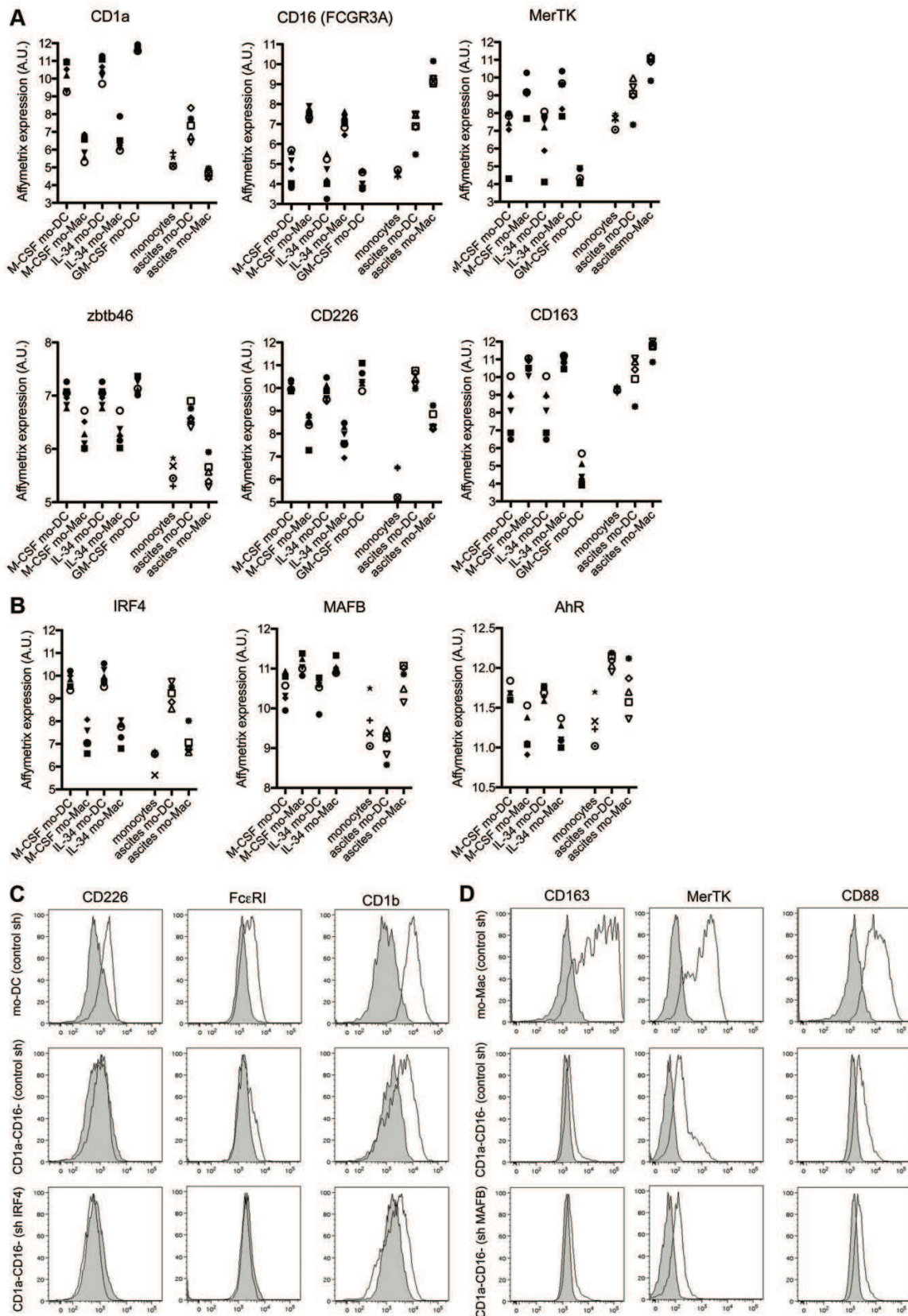


Fig.S2 related to Fig.2. Analysis of monocyte-derived cells. (A-B) Transcriptomic analysis. mRNA expression from Affymetrix data (arbitrary units) for selected phenotypic markers (A) and candidate transcription factors (B). Each symbol represents an individual donor. (C-D) Monocytes were infected at day 0 with lentivirus containing sh RNA against *IRF4* (C) or *MAFB* (D), or control sh RNA. After 5 days of culture, cells were analyzed by flow cytometry. Cells were gated as mo-DC (CD16⁻CD1a⁺), CD16⁻CD1a⁻ cells or mo-Mac (CD16⁺CD1a⁺). Grey shaded histograms represent isotype control stainings. Representative of 5 independent experiments.



Fig.S4 related to Fig.4. AHR inhibition or activation does not alter cell phenotype. CD14⁺ monocytes were cultured with MCSF, IL-4 and TNF- α for 5 days, in the presence of 8 μ M SR1 (A and C) or 62 nM FICZ (B and C). Cell populations were analyzed by flow cytometry. Grey shaded histograms represent isotype control stainings. Representative of 6 independent experiments.

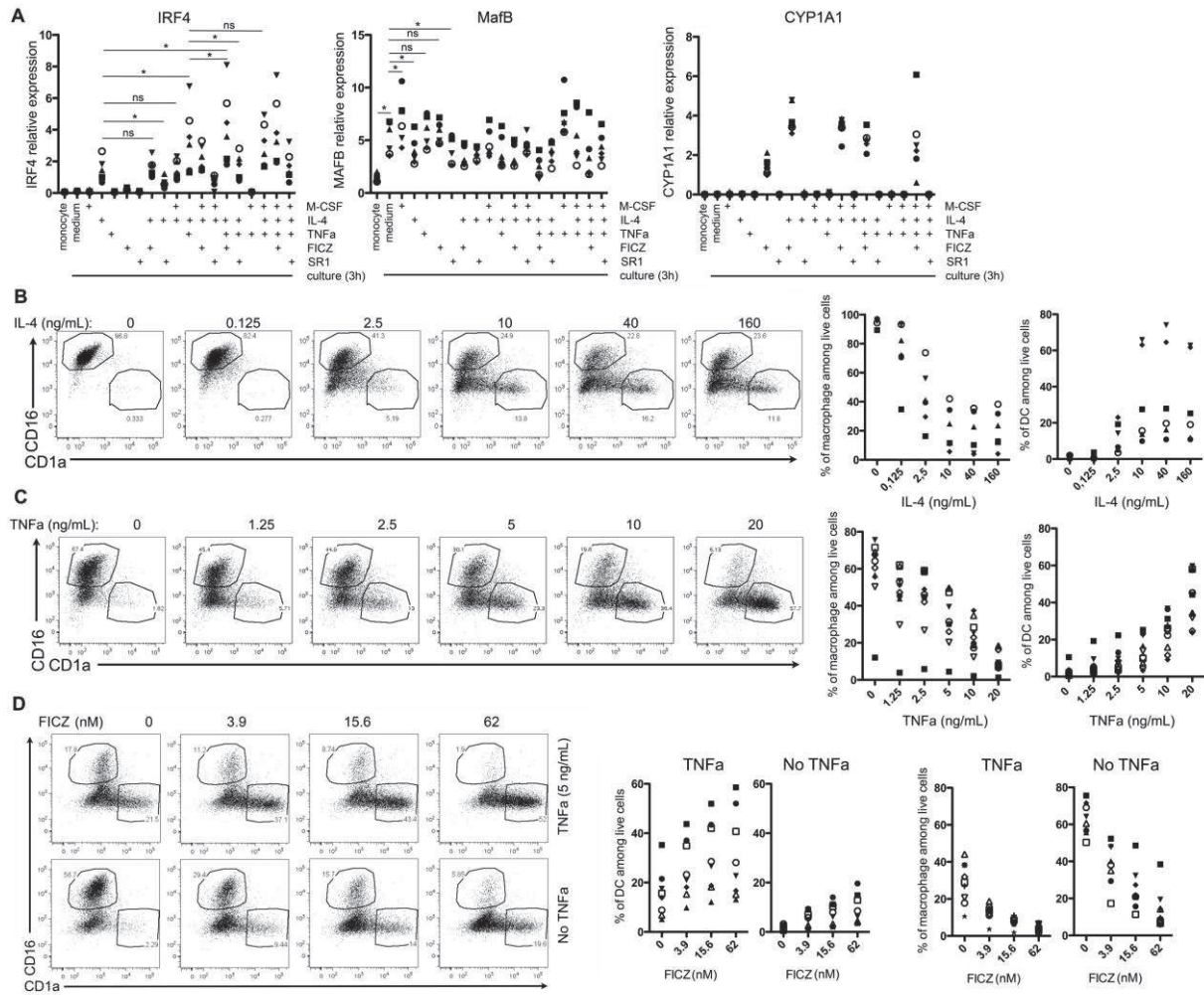


Fig.S5 related to Fig.4. AHR synergizes with IL-4 and TNF α to induce mo-DC differentiation. (A) Purified blood CD14⁺ monocytes were analyzed directly after isolation, or were cultured for 3h in medium alone or with various combinations of MCSF, IL-4, TNF- α , FICZ or SR1. Relative expression of *IRF4*, *MAFB* and *CYP1A1* were measured by RT-qPCR. Each symbol represents an individual donor (n=6). (B) Monocytes were cultured for 5 days with 100 ng/mL MCSF, 5 ng/mL TNF- α and various concentrations of IL-4. Proportions of DC and macrophages at day 5 are shown. Each symbol represents an individual donor (n=6). (C) Monocytes were cultured for 5 days with 100 ng/mL MCSF, 40 ng/mL IL-4 and various concentrations of TNF- α . Proportions of DC and macrophages at day 5 are shown. Each symbol represents an individual donor (n=9). (D) Monocytes were cultured for 5 days with 100 ng/mL MCSF, 40 ng/mL IL-4 and various concentrations of FICZ in the presence or absence of 5 ng/mL TNF α . Proportions of DC and macrophages at day 5 are shown. Each symbol represents an individual donor (n=8). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

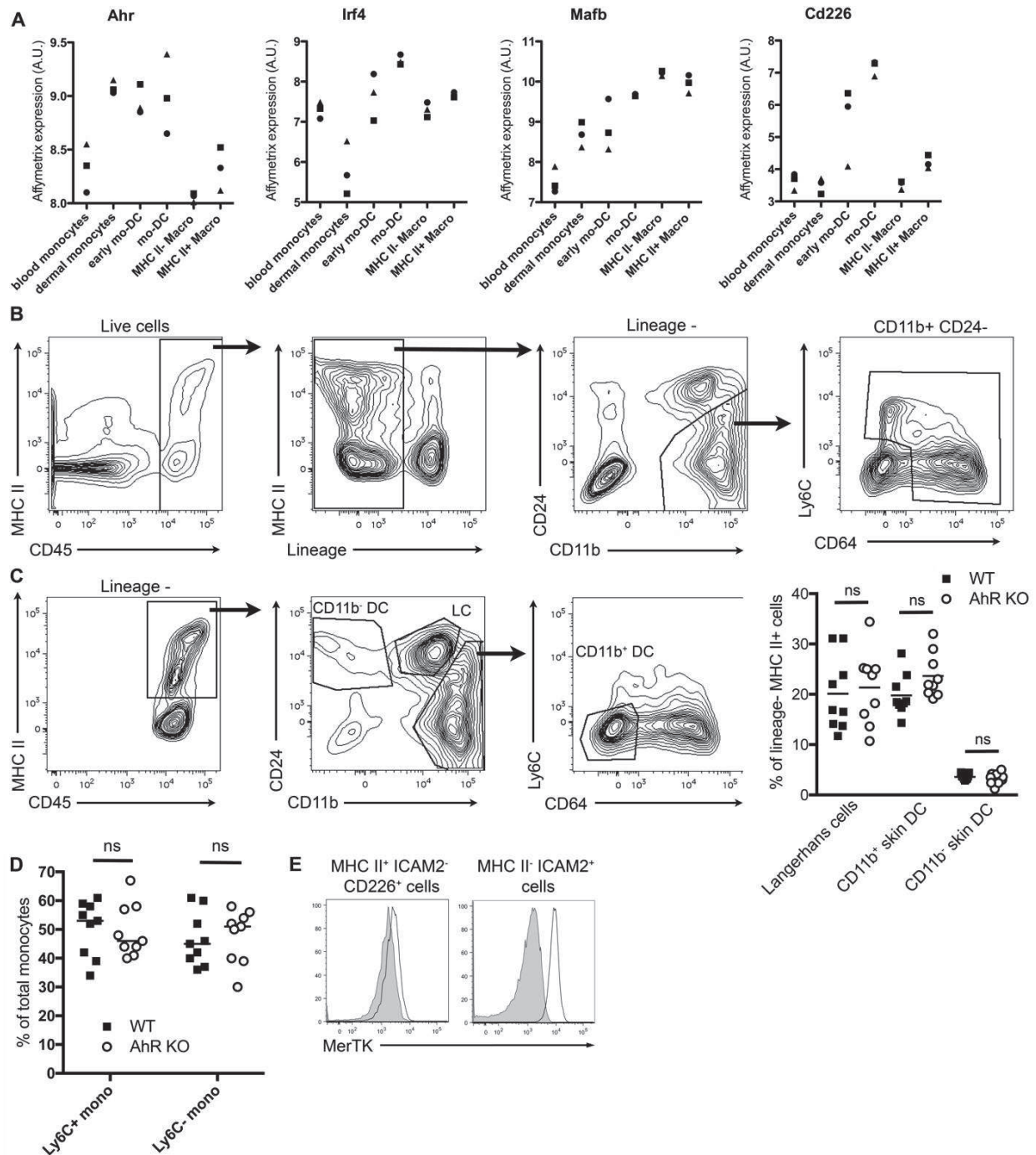


Fig.S6 related to Fig.6. Analysis of mouse monocyte-derived cells. (A) mRNA expression from Affymetrix data (arbitrary units) for *Ahr*, *Irf4*, *Mafk* and *Cd226*. Each symbol represents an individual data set. Microarray data from (Tamoutounour et al., 2013), GEO accession code GSE49358). (B-C) Ear skin from individual mice was dissociated and digested to prepare single-cell suspensions for flow cytometry analysis. (B) Gating strategy for skin monocyte-derived cells. Live cells are gated on CD45⁺ cells, then on CD3⁻NK1.1⁻CD19⁻Ly6G⁻ cells (lineage⁻ cells), then on CD24⁻CD11b⁺ cells. (C) Gating strategy for DC skin subsets. Lineage⁻ cells are gated on MHC II⁺ cells. Langerhans cells (LC) are CD24⁻CD11b⁺, CD11b⁻ DC are CD24⁺CD11b⁻ and CD11b⁺ DC are CD24⁻CD11b⁺ Ly6C⁻CD64⁻. Proportions of Langerhans cells, CD11b⁺ DC and CD11b⁻ DC among lineage-MHC II⁺ cells are shown. Each symbol represents an individual mouse (n=9 in 2 independent experiments). (D) Proportions of Ly6C⁺ and Ly6C⁻ cells among spleen monocytes of AhR^{-/-} or WT littermates. Each symbol represents an individual mouse (n=9 in 2 independent experiments). (E) Peritoneal MHC II⁺ ICAM2⁻CD226⁺ cells and MHC II⁻ICAM2⁺ cells were analyzed by flow cytometry for the expression of MerTK. Grey shaded histograms represent isotype control stainings. Results representative of 9 individual mice in 3 independent experiments.

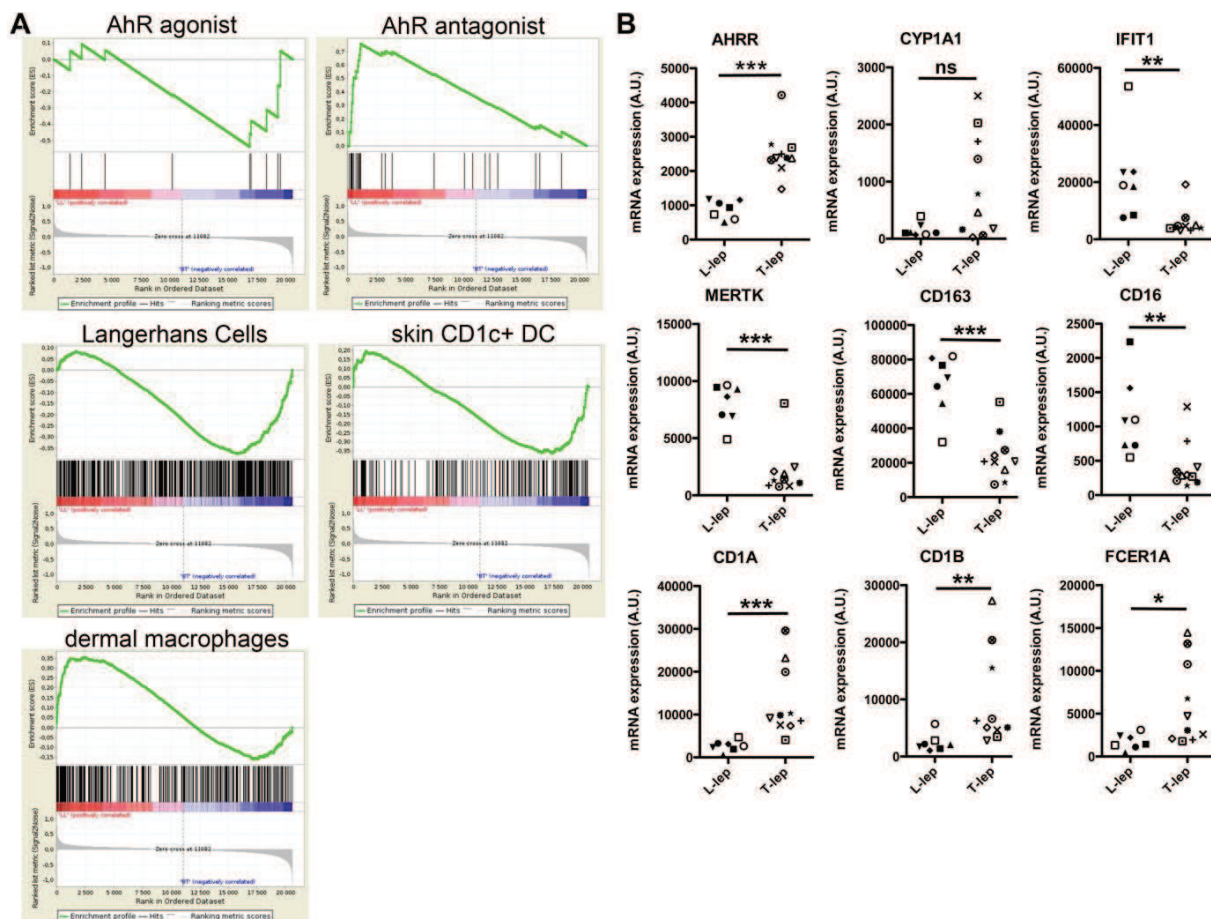


Fig.S7 related to Fig.7. Analysis of gene expression in leprosy lesions. (A) Gene set enrichment plot for gene signatures of interest. (B) Gene expression of selected genes from Affymetrix micro-arrays. Each symbol represents an individual donor. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
anti-CD1a APC human (clone HI149)	Biolegend	Cat: #300110
anti-CD1a APC-Vio770 human (clone HI149)	Miltenyi	Cat: #130-100-225
anti-CD1a PE-Vio770 human (clone HI149)	Miltenyi	Cat: #130-105-527
anti-CD16 FITC human (clone 3G8)	Biolegend	Cat: #302006
anti-CD16 APC human (clone 3G8)	Biolegend	Cat: #302012
anti-HLA-DR APC-eFluor780 human (clone LN3)	eBioscience	Cat: #47-9956-42
anti-CD11c Pe/Cy7 human (clone Bu15)	Biolegend	Cat: #337216
anti-CD1c PerCP-eFluor710 human (clone L161)	eBioscience	Cat: #46-0015-42
anti-CD1c APC human (clone L161)	Biolegend	Cat: #331524
anti-CD11b PE mouse/human (clone M1/70)	BD Biosciences	Cat: #553311
anti-FcεRI PE human (clone AER-37)	eBioscience	Cat: #12-5899-42
anti-CD163 PE human (clone GHI/61)	Biolegend	Cat: #333605
anti-CD206 Alexa647 human (clone 15-2)	Biolegend	Cat: #321116
anti-CD226 APC human (clone DX11)	Miltenyi	Cat: #130-100-436
anti-MerTK APC human (clone 125518)	R&D Biotechne	Cat: #FAB8912A
anti-CD141 PE human (clone AD5-14H12)	Miltenyi	Cat: #130-090-514
anti-CD88 PE human (clone S5/1)	Biolegend	Cat: #344303
anti-CD1b APC human (clone eBioSN13)	eBioscience	Cat: #17-0018-42
anti-CD64 PE human (clone 10.1)	Biolegend	Cat: #305007
anti-CD14 PE human (clone M5E2)	BD Biosciences	Cat: #301806
anti-CD172a biotin human (clone SE5A5)	Biolegend	Cat: #323804
Rabbit polyclonal Anti-AhR	Enzo Life Science	Cat: #BML-SA210
Rabbit polyclonal Anti-IRF4	Cell Signaling	Cat: #4964
Mouse monoclonal Anti-Blimp1 (clone 3H2-E8)	NovusBio	Cat: #NB600-235
Rabbit polyclonal Anti-MAFB	NovusBio	Cat: #NBP1-81342
anti-ICAM2 FITC mouse (clone MIC2/4)	Biolegend	Cat: #105606
anti-CD226 PE mouse (clone 10E5)	Biolegend	Cat: #128806

anti-CD115 APC mouse (clone AFS98)	eBioscience	Cat: #17-1152-82
anti CD11b PerCPCy5.5 mouse (clone M1/70)	BD Biosciences	Cat: #550993
anti-MHCII APCCy7 mouse (clone M5/114.15.2)	Biolegend	Cat: #107628
anti-MerTK PeCy7 mouse (clone DS5MMER)	eBioscience	Cat: #25-5751-80
anti-Ly6C FITC mouse (clone AL-21)	BD Biosciences	Cat: #553104
anti-CCR2 PE mouse (clone 475301)	R&D Biotechne	Cat: #FAB5538P
anti-CD24 PeCy5 mouse (clone M1/69)	Biolegend	Cat: #101811
anti-CD45 PerCPCy5.5 mouse (clone 30-F11)	eBioscience	Cat: #45-0451-82
anti-CD11b PeCy7 mouse/human (clone M1/70)	BD Biosciences	Cat: #552850
anti-CD64 Alexa647 mouse (clone X54-5/7.1)	BD Biosciences	Cat: #558539
anti-IA ^p Alexa700 mouse (clone M5/114.15.2)	eBioscience	Cat: #56-5321-82
anti-CD45R APCCy7 mouse (clone RA3-6B2)	Biolegend	Cat: #103224
anti-NK1.1 APCCy7 mouse (clone PK136)	Biolegend	Cat: #108724
anti-CD3 APCCy7 mouse (clone 145-2C11)	Biolegend	Cat: #100330
anti-Ly6G APCCy7 mouse (clone 1a8)	Biolegend	Cat: #127624
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Stemregenin-1	Cayman chemicals	SSY261

6-Formylindolo(3,2-b)carbazole	Enzo Life Sciences	BML-GR206-0100
Critical Commercial Assays		
PrimeFlow RNA Assay	eBioscience	Cat: # 88-18005-210
RNAeasy micro kit	Qiagen	Cat: #74004
Deposited Data		
Affymetrix data	GEO	GSE102046
Single-cell RNA-seq data	GEO	GSE103544
Experimental Models: Cell Lines		
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: B6.129-Ahr ^{tm1Gonz} /Nci	{Fernandez-Salguero, 1995 #981}	RRID:IMSR_NCIMR: 01XC3

Oligonucleotides		
Primer IRF4	Thermo Fisher Scientific	Hs01056533_m1
Primer CYP1A1	Thermo Fisher Scientific	Hs01054797_g1
Primer MAFB	Thermo Fisher Scientific	Hs00271378_s1
Primer PRDM1	Thermo Fisher Scientific	Hs00153357_m1
Recombinant DNA		
Software and Algorithms		
Cell Ranger Single Cell Software Suite (v1.3.1)	(Zheng et al., 2017)	https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/pipelines/latest/rkit
Seurat package (v1.4.0.14)	(Satija et al., 2015)	https://github.com/satijalab/seurat
<i>Ade4</i> package	(Chessel et al., 2004)	http://pbil.univ-lyon1.fr/ade4/
EMA package	(Servant et al., 2010)	http://bioinfo-out.curie.fr/projects/ema/
<i>ArrayQualityMetrics</i> package	(Kauffmann et al., 2009)	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/arrayQualityMetrics.html
<i>oligo</i> package	(Carvalho and Irizarry, 2010)	https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/oligo.html
<i>limma</i> package	(Smyth, 2004)	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html
FlowJo (v.9.9.5)	FlowJo LLC	https://www.flowjo.com/

ANNEXE 3 : Chapitre dans Seminars in Cell & Developmental Biology (Accepted)

Human *in vivo*-differentiated monocyte-derived dendritic cells

Authors: Tsing-Lee Tang-Huau^{1,2} and Elodie Segura¹

¹ Institut Curie, PSL Research University, INSERM, U932, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

² Sanofi, Breakthrough Laboratory, 1 impasse des ateliers, 94400 Vitry-sur-Seine, France

Corresponding author : Elodie Segura, elodie.segura@curie.fr, +33-156246720

Abstract

When entering tissues, monocytes can differentiate into cells that share morphological and functional features with either dendritic cells (DC) or macrophages. Monocyte-derived DC have been observed in humans at mucosal tissues and in inflammatory settings, where they are usually referred to as « inflammatory DC ». In this chapter, we review recent studies on the characterization of these cells in humans. We also discuss nomenclature and examine the criteria defining *in vivo*-differentiated human mo-DC.

Keywords : monocyte ; dendritic cell; inflammation ; auto-immune disease ; cancer

1. Introduction

Monocytes have long been used as precursor cells for the *in vitro* generation of human dendritic cells (DC) [1]. However, it has become clear that, *in vivo*, most DC derive from a specific precursor, termed pre-DC, distinct from monocytes [2-8]. The physiological relevance of monocytes as DC precursors was demonstrated in the mouse in a *Leishmania* infection model in which monocytes could differentiate *in vivo* into cells that shared phenotypic and functional features with DC [9]. Numerous subsequent studies in mice have shown that DC can differentiate *in vivo* from monocytes in various inflammatory settings, including infections and models of auto-immune diseases [10, 11]. Because they arise during inflammation, these *in vivo*-differentiated monocyte-derived DC (mo-DC) were initially termed « inflammatory DC ». However, this term can be misleading as it implies that mo-DC are « inflammatory » by essence. Yet, mo-DC can be found in mice in the absence of inflammation at mucosal sites, such as the intestine and the skin [12-14], and in skeletal muscles [15].

In the classification of DC lineages based on ontogeny [16], mo-DC represent a separate DC subset. Importantly, monocytes can also differentiate into macrophages, which are distinct from “resident” macrophages derived from embryonic precursors [17] (figure 1). Whether mo-DC are fundamentally distinct from monocyte-derived macrophages (mo-Mac), and how to distinguish these two populations has been controversial. In this chapter, we will cover *in vivo*-differentiated human mo-DC, both generated in the steady-state (referred to as « steady-state mo-DC ») and arising during inflammation (referred to as « inflammatory mo-DC »). We will also discuss recent data on the molecular requirements for mo-DC versus mo-Mac differentiation.

2. Definition of human *in vivo*-differentiated mo-DC

2.1 Identification of human inflammatory mo-DC

« Inflammatory dendritic epidermal cells » (IDEC) were first described in the skin of atopic dermatitis patients [18]. These cells were absent from healthy skin and characterized by a surface phenotype distinct from that of Langerhans cells. Subsequently, IDEC were also identified in the skin of psoriasis patients [19]. Another study reported in the skin of psoriasis patients the presence of a population of « inflammatory dermal DC », phenotypically distinct from the dermal DC found in healthy skin [20]. Whether these inflammatory DC represented an activated form of classical DC or were related to monocytes was not investigated at the time.

Several lines of evidence suggest that in humans, as in mice, monocytes recruited to inflammatory sites can differentiate into DC. Radio-labelled autologous monocytes are recruited to the gut in inflammatory bowel disease patients [21] and monocyte numbers are increased in the intestine of Crohn's disease and ulcerative colitis patients compared to healthy donors [22]. Influx of monocytes were also observed in cantharidin-induced skin blisters [23], in the peritoneum of patients with dialysis-related peritonitis [24] and in the nasal mucosa of subjects with induced allergic rhinitis [25]. In the latter study, monocytes were recruited in the nasal mucosa within hours after allergen challenge while a new population of DC appeared after 3 days, consistent with the potential differentiation of monocytes into mo-DC. Moreover, we have identified in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients and in peritoneal ascites from cancer patients a population of « inflammatory DC » with a phenotype different from that of classical blood DC [26]. We showed by transcriptomic analysis that these cells represent a distinct DC subset and share gene signatures with *in vitro*-generated monocyte-derived cells, supporting the idea that these inflammatory DC are more closely related to monocytes than to

classical DC [26, 27]. Finally, mo-DC have been evidenced in human lung and colorectal tumors, based on their phenotypic similarity with tumor-associated mo-DC in mice tumor models [28].

Collectively, these results support the notion that monocytes recruited to inflammatory sites can differentiate *in situ* into mo-DC in humans.

2.2 Defining features of *in vivo*-differentiated mo-DC

DC have been traditionally defined based on 1) their distinctive morphology, with the presence of dendrites; 2) their superior ability to activate naive T cells ; 3) their capacity to migrate to lymph nodes. In addition, distinct DC subtypes can be defined based on their ontogeny and their requirement for distinct transcription factors [16]. However, because these properties can be difficult to investigate in humans, most studies rely on the differential expression of phenotypic markers to distinguish DC from other myeloid cells, and DC subsets from one another.

Human inflammatory mo-DC are HLA-DR⁺CD11c⁺ cells that express markers found on classical DC such as CD1c, CD1a, CD1b, FcεRI, as well as molecules that are also expressed by macrophages including CD206, CD14 and CD11b [19, 25, 26, 28, 29]. By contrast, they lack the macrophage markers CD16 and CD163 [26] [28]. Inflammatory mo-DC can also be distinguished from macrophages by their morphology (figure 2) and their capacity to stimulate T cell proliferation [20, 26].

2.3 Molecular ontogeny of mo-DC

The relationship of mo-DC to monocytes is suggested by their expression of CCR2, a chemokine receptor essential for monocyte recruitment into peripheral tissues [30]. However, this

is not an absolute marker of monocyte-derived cells, as a CCR2⁺ DC population from mouse intestine has been shown to derive from pre-DC [31].

The ontogeny of human DC is usually inferred from the analysis of gene patterns and specific transcription factors, but can also be analyzed using *in vitro* differentiation models [6, 7, 16]. Inflammatory mo-DC from ascites express a unique combination of transcription factors that are either shared with classical DC (IRF4, BATF3, ZBTB46) or with macrophages (EGR1, EGR2), but they do not express MAFB which is restricted to macrophages [26]. Using a novel model of human monocyte differentiation, we have recently shown that MAFB controls monocyte differentiation into mo-Mac, while IRF4, BLIMP-1 and Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) are essential for monocyte differentiation into mo-DC [27]. Moreover, patients suffering from systemic juvenile idiopathic arthritis underexpress AHR in their monocytes, which are biased towards mo-Mac differentiation [32].

Precursors of human classical DC have been shown to be pre-committed to either lineage at an early stage [8]. By contrast, single-cell RNA-seq analysis of human CD14⁺ monocytes has revealed that monocytes do not contain two populations that would be pre-committed to differentiate into mo-DC versus mo-Mac [27]. Rather, blood CD14⁺ monocytes are programmed to spontaneously differentiate into blood CD16⁺ monocytes [33], unless they extravasate into tissues. Monocytes express a partial mo-Mac gene signature, suggesting they may possess in tissues a default differentiation pathway into macrophages unless they encounter specific cues, such as inflammatory cytokines and AHR ligands [27]. Because their differentiation is governed by distinct transcription factors, mo-DC and mo-Mac do not represent variations of a highly plastic cell population as previously proposed [16], but rather are *bona fide* cell lineages derived from monocytes (figure 3).

2.4 Slan-DC

CD16⁺ cells that express a 6-sulfo LacNAc modification of the P selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) have been termed « slan-DC » and proposed to represent an inflammatory subtype of DC based on their capacity to produce large amounts of TNF- α upon stimulation [34]. These cells were initially described in the blood, but can also be found in tissues such as the skin of psoriasis patients [35], tumor-draining lymph nodes [36], intestinal lamina propria [37], mesenteric lymph nodes and intestinal mucosa of Crohn's disease patients [38], renal carcinoma [39], tonsil [36] and brain lesions of patients with multiple sclerosis [40]. Comparative transcriptomic analysis identified slan-DC as a subset of CD16⁺ monocytes [41, 42] and showed that they are distinct from the DC lineage [43]. These results are further supported by functional analysis showing that slan-DC are poor antigen-presenting cells compared to classical DC [41, 43]. In addition, slan-DC do not express CCR7 [39] and exhibit a macrophage morphology in tissues [37]. These observations suggest that slan-DC may be a specialized monocyte subset rather than mo-DC.

2.5 A practical key to identify human mo-DC from biological samples

Most studies rely on a small number of surface markers to distinguish cell populations. Because macrophages, monocytes, mo-DC and classical DC subsets display overlapping phenotypes, identifying these different populations in biological samples can be challenging. Based on the results discussed above, we propose that several categories of criteria should be combined for identifying human *in vivo*-differentiated mo-DC :

1) *Phenotype*. Mo-DC are HLA-DR⁺CD11c⁺CD14^{int}CD206⁺CD1c⁺ cells. Additional useful markers to distinguish them from other myeloid cells are shown in Table 1.

- 2) *DC Function*. Mo-DC possess typical DC functions, including the ability to efficiently stimulate naive T cells and the capacity to express CCR7 (potentially enabling their migration to lymph nodes).
- 3) *DC morphology*. Mo-DC display a typical DC morphology : they are of small size, possess dendrites and lack large cytoplasmic vacuoles (as opposed to macrophages) (figure 2).
- 4) *Ontogeny*. Mo-DC derive from monocytes, which can be assessed by analyzing gene signatures or the expression of CCR2. Mo-DC can be distinguished from mo-Mac by the expression of specific transcription factors such as IRF4 and AHR, and the absence of MAFB expression.

3. Distribution of human mo-DC

3.1 Human steady-state mo-DC in mucosal tissues

Several studies have analyzed the composition of myeloid cells at mucosal sites, including cells displaying the phenotype of mo-DC. Lungs of healthy donors comprise a population of CD14⁺CD206⁺CD1c⁺CD1a⁺ cells that express IRF4 [44]. CD14⁺CD206⁺CD1c⁺CD163⁻ cells are also present in the broncho-alveolar lavage (BAL) of healthy volunteers and express IRF4 and CCR2 [45]. Another study reported the presence of CD14⁺CD1c⁺CD1a⁺ DC in the BAL of healthy volunteers and showed that these cells can upregulate CCR7 [46]. In addition, transcriptomic analysis indicated that this population overexpresses CCR2, CD206 and CD11b [46]. These results suggest that mo-DC are present in human lungs at the steady-state.

CD14^{low}CD206⁺CD1c⁺CD1a⁺FcεRI⁺CD11b⁺ cells can also be found in the peritoneum as shown through the analysis of dialysate of patients, with or without dialysis-induced peritonitis

[24]. These cells express CCR2, IRF4 and upregulate CCR7 upon activation [24], suggesting they are mo-DC .

Three main DC populations were identified in the small intestine, including a CD1c⁺ CD11b⁺ population that was increased in patients with hyperemic mucosa (i.e. with increased redness and blood flow, consistent with inflammation) [47]. The transcriptomic signature of this population was closer to blood monocytes than to classical blood DC, suggesting they are mo-DC.

Finally, whether mo-DC are present in human skin in the steady-state remains unclear. Dermal CD14⁺ DC were initially proposed to be mo-DC based on their reconstitution by donor-derived cells after hematopoietic stem cell transplantation and on their transcriptional proximity with blood monocytes [48, 49]. However, this population may be heterogeneous and a large proportion of them have been shown to be actually monocyte-derived macrophages [50].

3.2 Human mo-DC in cancer

Several studies in mouse models have shown that circulating monocytes are recruited to tumors and can differentiate at the tumor site [51-53]. It is therefore likely that human tumors contain inflammatory mo-DC within the myeloid infiltrate, but this question has been little studied. Tumor-associated mo-DC have been identified based on their phenotype in lung and colorectal tumors [28]. CD14⁺CD1c⁺ cells, which may be mo-DC, have also been observed by histology in melanoma skin lesions and colon metastasis [54]. Finally, a single-cell analysis of lung adenocarcinoma has evidenced that some CD1c⁺ DC express monocyte/macrophage markers (CD14, CCR2, CD206, CD64, CD11b), which could indicate the presence of a population of mo-DC [55] .

3.3 Human mo-DC in blood

Human mo-DC have been identified in a variety of tissues (Table 2), but whether circulating mo-DC are present in the blood remains unclear. Blood CD14⁺CD1c⁺CD11b⁺ cells have been described, but these cells do not express CD206 nor CD1a [54]. This population is elevated in the blood of melanoma patients compared to healthy donors. Comparative transcriptomic analysis showed that this population is closely related to monocytes, but whether they are a subpopulation of monocytes or *bona fide* mo-DC requires further investigation.

In addition, single-cell RNA-seq analysis showed that blood CD1c⁺ DC comprise two distinct subgroups, one of which was termed « inflammatory » [5]. These « inflammatory » CD1c⁺ DC express mRNA for CD14, but not the protein at the cell surface. They can be separated from the other CD1c⁺ DC subgroup by their differential expression of CD163 and CD36. Despite being termed « inflammatory », these cells are transcriptionally closer to classical DC rather than to monocytes, and are most likely derived from pre-DC. The properties of these two CD1c⁺ DC populations remain to be characterized.

4. Functional properties of *in vivo*-differentiated mo-DC

Due to the difficulty of isolating human mo-DC directly from biological samples, there is limited data on their functional properties. Human mo-DC efficiently activate CD4 and CD8 T cells in *ex vivo* assays [20, 24, 26]. Peritoneal mo-DC secrete IL-6, TNF- α , IL1- β and IL-12p70 upon *ex vivo* restimulation [24]. Mo-DC from BAL also secrete TNF- α upon restimulation, but their ability to secrete other cytokines was not reported [45]. By contrast, inflammatory mo-DC from tumor ascites secrete IL-6, TNF- α , IL1- β without the need for *ex vivo* restimulation,

suggesting they are already activated *in situ* by the inflammatory environment [26]. Ascites mo-DC, but not macrophages, also secrete IL-12p70 and IL-23 upon *ex vivo* restimulation [26].

Consistent with their ability to produce IL-23, inflammatory mo-DC from tumor ascites and from synovial fluid from rheumatoid arthritis patients are potent inducers of Th17 polarization *ex vivo* [26]. Inflammatory mo-DC from the skin of psoriasis patients also induce Th17 polarization *ex vivo* [20]. Because Th17 cells play a major role in tissue damage in these diseases, these results suggest that inflammatory mo-DC could be involved in the pathogenesis by fueling the inflammation. Nevertheless, the properties of inflammatory mo-DC will likely be influenced by their micro-environment, and their T cell-polarizing ability may be different in a Th1- or Th2-driven pathology.

Conclusion and perspectives

The literature discussed in this chapter indicates that mo-DC are present *in vivo* in humans and represent a *bona fide* DC subset. Recent technical advances, such as single-cell transcriptomic analysis, may reveal mo-DC populations in additional tissues or pathological situations. A major challenge is to better understand their functional properties and potential role in the physiopathology of inflammatory disorders or cancer. This would pave the way for manipulating mo-DC differentiation or function for therapeutic intervention.

Acknowledgements

This work is funded by the program «Investissements d’Avenir» from Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LABX-0043 and ANR-10-IDEX-0001-02 PSL), Fondation Bristol-Myers Squibb pour la Recherche en Immuno-Oncologie and INSERM. T-L Tang-Huau is supported by an industry-funded PhD fellowship at Université Paris Descartes.

References

- [1] F. Sallusto, A. Lanzavecchia, Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha, *J Exp Med* 179(4) (1994) 1109-18.
- [2] S.H. Naik, D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe, K. Shortman, Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes, *Nat Immunol* 7(6) (2006) 663-71.
- [3] K. Liu, G.D. Victora, T.A. Schwickert, P. Guermonprez, M.M. Meredith, K. Yao, F.F. Chu, G.J. Randolph, A.Y. Rudensky, M. Nussenzweig, In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis, *Science* 324(5925) (2009) 392-7.
- [4] P. See, C.A. Dutertre, J. Chen, P. Gunther, N. McGovern, S.E. Irac, M. Gunawan, M. Beyer, K. Handler, K. Duan, H.R.B. Sumatoh, N. Ruffin, M. Jouve, E. Gea-Mallorqui, R.C.M. Hennekam, T. Lim, C.C. Yip, M. Wen, B. Malleret, I. Low, N.B. Shadan, C.F.S. Fen, A. Tay, J. Lum, F. Zolezzi, A. Larbi, M. Poidinger, J.K.Y. Chan, Q. Chen, L. Renia, M. Haniffa, P. Benaroch, A. Schlitzer, J.L. Schultze, E.W. Newell, F. Ginhoux, Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques, *Science* (2017).
- [5] A.C. Villani, R. Satija, G. Reynolds, S. Sarkizova, K. Shekhar, J. Fletcher, M. Griesbeck, A. Butler, S. Zheng, S. Lazo, L. Jardine, D. Dixon, E. Stephenson, E. Nilsson, I. Grundberg, D. McDonald, A. Filby, W. Li, P.L. De Jager, O. Rozenblatt-Rosen, A.A. Lane, M. Haniffa, A. Regev, N. Hacohen, Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors, *Science* 356(6335) (2017).

- [6] J. Lee, G. Breton, T.Y. Oliveira, Y.J. Zhou, A. Aljoufi, S. Pühr, M.J. Cameron, R.P. Sekaly, M.C. Nussenzweig, K. Liu, Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow, *J Exp Med* (2015).
- [7] G. Breton, J. Lee, Y.J. Zhou, J.J. Schreiber, T. Keler, S. Pühr, N. Anandasabapathy, S. Schlesinger, M. Caskey, K. Liu, M.C. Nussenzweig, Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells, *J Exp Med* (2015).
- [8] G. Breton, S. Zheng, R. Valieris, I. Tojal da Silva, R. Satija, M.C. Nussenzweig, Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c+ or CD141+ DCs, *J Exp Med* (2016).
- [9] B. Leon, M. Lopez-Bravo, C. Ardavin, Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*, *Immunity* 26(4) (2007) 519-31.
- [10] E. Segura, S. Amigorena, Inflammatory dendritic cells in mice and humans, *Trends Immunol* 34(9) (2013) 440-5.
- [11] A. Mildner, S. Yona, S. Jung, A close encounter of the third kind: monocyte-derived cells, *Advances in immunology* 120 (2013) 69-103.
- [12] S. Tamoutounour, M. Guilliams, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen, S. Henri, Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin, *Immunity* 39(5) (2013) 925-38.
- [13] C. Varol, A. Vallon-Eberhard, E. Elinav, T. Aychek, Y. Shapira, H. Luche, H.J. Fehling, W.D. Hardt, G. Shakhar, S. Jung, Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions, *Immunity* 31(3) (2009) 502-12.

- [14] M. Bogunovic, F. Ginhoux, J. Helft, L. Shang, D. Hashimoto, M. Greter, K. Liu, C. Jakubzick, M.A. Ingersoll, M. Leboeuf, E.R. Stanley, M. Nussenzweig, S.A. Lira, G.J. Randolph, M. Merad, Origin of the lamina propria dendritic cell network, *Immunity* 31(3) (2009) 513-25.
- [15] C. Langlet, S. Tamoutounour, S. Henri, H. Luche, L. Ardouin, C. Gregoire, B. Malissen, M. Guilliams, CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization, *J Immunol* 188(4) (2012) 1751-60.
- [16] M. Guilliams, F. Ginhoux, C. Jakubzick, S.H. Naik, N. Onai, B.U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, S. Yona, Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny, *Nat Rev Immunol* 14(8) (2014) 571-8.
- [17] Y. Lavin, A. Mortha, A. Rahman, M. Merad, Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues, *Nat Rev Immunol* 15(12) (2015) 731-44.
- [18] A. Wollenberg, S. Kraft, D. Hanau, T. Bieber, Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema, *J Invest Dermatol* 106(3) (1996) 446-53.
- [19] A. Wollenberg, M. Mommaas, T. Opiel, E.M. Schottdorf, S. Gunther, M. Moderer, Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases, *J Invest Dermatol* 118(2) (2002) 327-34.
- [20] L.C. Zaba, J. Fuentes-Duculan, N.J. Eungdamrong, M.V. Abello, I. Novitskaya, K.C. Pierson, J. Gonzalez, J.G. Krueger, M.A. Lowes, Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells, *J Invest Dermatol* 129(1) (2009) 79-88.
- [21] M.C. Grimm, W.E. Pullman, G.M. Bennett, P.J. Sullivan, P. Pavli, W.F. Doe, Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa, *J Gastroenterol Hepatol* 10(4) (1995) 387-95.

- [22] N. Kamada, T. Hisamatsu, S. Okamoto, H. Chinen, T. Kobayashi, T. Sato, A. Sakuraba, M.T. Kitazume, A. Sugita, K. Koganei, K.S. Akagawa, T. Hibi, Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis, *J Clin Invest* 118(6) (2008) 2269-80.
- [23] W. Jenner, M. Motwani, K. Veighey, J. Newson, T. Audzevich, A. Nicolaou, S. Murphy, R. Macallister, D.W. Gilroy, Characterisation of leukocytes in a human skin blister model of acute inflammation and resolution, *PLoS One* 9(3) (2014) e89375.
- [24] C.T. Liao, R. Andrews, L.E. Wallace, M.W. Khan, A. Kift-Morgan, N. Topley, D.J. Fraser, P.R. Taylor, Peritoneal macrophage heterogeneity is associated with different peritoneal dialysis outcomes, *Kidney Int* 91(5) (2017) 1088-1103.
- [25] I. Eguiluz-Gracia, A. Bosco, R. Dollner, G.R. Melum, M.H. Lexberg, A.C. Jones, S.A. Dheyauldeen, P.G. Holt, E.S. Baekkevold, F.L. Jahnsen, Rapid recruitment of CD14(+) monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects, *J Allergy Clin Immunol* 137(6) (2016) 1872-1881 e12.
- [26] E. Segura, M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiochia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, S. Amigorena, Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation, *Immunity* 38(2) (2013) 336-348.
- [27] C. Goudot, A. Coillard, A.C. Villani, P. Gueguen, A. Cros, S. Sarkizova, T.L. Tang-Huau, M. Bohec, S. Baulande, N. Hacohen, S. Amigorena, E. Segura, Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages, *Immunity* 47(3) (2017) 582-596 e6.
- [28] D. Laoui, J. Keirsse, Y. Morias, E. Van Overmeire, X. Geeraerts, Y. Elkrim, M. Kiss, E. Bolli, Q. Lahmar, D. Sichien, J. Serneels, C.L. Scott, L. Boon, P. De Baetselier, M. Mazzone, M. Guilliams, J.A. Van Ginderachter, The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct

dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity, *Nature communications* 7 (2016) 13720.

[29] E. Guttman-Yassky, M.A. Lowes, J. Fuentes-Duculan, J. Whynot, I. Novitskaya, I. Cardinale, A. Haider, A. Khatcherian, J.A. Carucci, R. Bergman, J.G. Krueger, Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis, *J Allergy Clin Immunol* 119(5) (2007) 1210-7.

[30] L. Boring, J. Gosling, S.W. Chensue, S.L. Kunkel, R.V. Farese, Jr., H.E. Broxmeyer, I.F. Charo, Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice, *J Clin Invest* 100(10) (1997) 2552-61.

[31] C.L. Scott, C.C. Bain, P.B. Wright, D. Sichien, K. Kotarsky, E.K. Persson, K. Luda, M. Guilliams, B.N. Lambrecht, W.W. Agace, S.W. Milling, A.M. Mowat, CCR2(+)CD103(-) intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells, *Mucosal immunology* 8(2) (2015) 327-39.

[32] A.M. Cepika, R. Banchereau, E. Segura, M. Ohouo, B. Cantarel, K. Goller, V. Cantrell, E. Ruchaud, E. Gatewood, P. Nguyen, J. Gu, E. Anguiano, S. Zurawski, J.M. Baisch, M. Punaro, N. Baldwin, G. Obermoser, K. Palucka, J. Banchereau, S. Amigorena, V. Pascual, A multidimensional blood stimulation assay reveals immune alterations underlying systemic juvenile idiopathic arthritis, *J Exp Med* (2017).

[33] A.A. Patel, Y. Zhang, J.N. Fullerton, L. Boelen, A. Rongvaux, A.A. Maini, V. Bigley, R.A. Flavell, D.W. Gilroy, B. Asquith, D. Macallan, S. Yona, The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation, *J Exp Med* (2017).

[34] K. Schakel, R. Kannagi, B. Kniep, Y. Goto, C. Mitsuoka, J. Zwirner, A. Soruri, M. von Kietzell, E. Rieber, 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells, *Immunity* 17(3) (2002) 289-301.

[35] A. Hansel, C. Gunther, J. Ingwersen, J. Starke, M. Schmitz, M. Bachmann, M. Meurer, E.P. Rieber, K. Schakel, Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses, *J Allergy Clin Immunol* 127(3) (2011) 787-94 e1-9.

[36] W. Vermi, A. Micheletti, S. Lonardi, C. Costantini, F. Calzetti, R. Nascimbeni, M. Bugatti, M. Codazzi, P.C. Pinter, K. Schakel, N. Tamassia, M.A. Cassatella, slanDCs selectively accumulate in carcinoma-draining lymph nodes and marginate metastatic cells, *Nature communications* 5 (2014) 3029.

[37] T. Ogino, J. Nishimura, S. Barman, H. Kayama, S. Uematsu, D. Okuzaki, H. Osawa, N. Haraguchi, M. Uemura, T. Hata, I. Takemasa, T. Mizushima, H. Yamamoto, K. Takeda, Y. Doki, M. Mori, Increased Th17-inducing activity of CD14⁺ CD163^{low} myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease, *Gastroenterology* 145(6) (2013) 1380-91 e1.

[38] M. Bsati, L. Chapuy, N. Baba, M. Rubio, B. Panzini, R. Wassef, C. Richard, G. Soucy, H. Mehta, M. Sarfati, Differential accumulation and function of proinflammatory 6-sulfo LacNAc dendritic cells in lymph node and colon of Crohn's versus ulcerative colitis patients, *Journal of leukocyte biology* 98(4) (2015) 671-81.

[39] M. Toma, R. Wehner, A. Kloss, L. Hubner, G. Fodelianaki, K. Erdmann, S. Fussel, S. Zastrow, M. Meinhardt, B. Seliger, D. Brech, E. Noessner, T. Tonn, K. Schakel, M. Bornhauser, M.P. Bachmann, M.P. Wirth, G. Baretton, M. Schmitz, Accumulation of tolerogenic human 6-sulfo LacNAc dendritic cells in renal cell carcinoma is associated with poor prognosis, *Oncoimmunology* 4(6) (2015) e1008342.

[40] K. Thomas, K. Dietze, R. Wehner, I. Metz, H. Tumani, T. Schultheiss, C. Gunther, K. Schakel, H. Reichmann, W. Bruck, M. Schmitz, T. Ziemssen, Accumulation and therapeutic

modulation of 6-sulfo LacNAc(+) dendritic cells in multiple sclerosis, *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 1(3) (2014) e33.

[41] J. Cros, N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S.K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.P. Jais, D. D'Cruz, J.L. Casanova, C. Trouillet, F. Geissmann, Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors, *Immunity* 33(3) (2010) 375-86.

[42] T.P. Hofer, A.M. Zawada, M. Frankenberger, K. Skokann, A.A. Satz, W. Gesierich, M. Schuberth, J. Levin, A. Danek, B. Rotter, G.H. Heine, L. Ziegler-Heitbrock, slan-defined subsets of CD16-positive monocytes: impact of granulomatous inflammation and M-CSF receptor mutation, *Blood* 126(24) (2015) 2601-10.

[43] N. van Leeuwen-Kerkhoff, K. Lundberg, T.M. Westers, S. Kordasti, H.J. Bontkes, T.D. de Gruijl, M. Lindstedt, A.A. van de Loosdrecht, Transcriptional profiling reveals functional dichotomy between human slan⁺ non-classical monocytes and myeloid dendritic cells, *Journal of leukocyte biology* 102(4) (2017) 1055-1068.

[44] A.N. Desch, S.L. Gibbings, R. Goyal, R. Kolde, J. Bednarek, T. Bruno, J.E. Slansky, J. Jacobelli, R. Mason, Y. Ito, E. Messier, G.J. Randolph, M. Prabagar, S.M. Atif, E. Segura, R.J. Xavier, D.L. Bratton, W.J. Janssen, P.M. Henson, C.V. Jakubzick, Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Phagocytes in Nondiseased Human Lung and Lung-Draining Lymph Nodes, *Am J Respir Crit Care Med* 193(6) (2016) 614-26.

[45] F. Baharom, S. Thomas, G. Rankin, R. Lepzien, J. Pourazar, A.F. Behndig, C. Ahlm, A. Blomberg, A. Smed-Sorensen, Dendritic Cells and Monocytes with Distinct Inflammatory Responses Reside in Lung Mucosa of Healthy Humans, *J Immunol* 196(11) (2016) 4498-509.

[46] V.I. Patel, J.L. Booth, E.S. Duggan, S. Cate, V.L. White, D. Hutchings, S. Kovats, D.M. Burian, M. Dozmorov, J.P. Metcalf, Transcriptional Classification and Functional

Characterization of Human Airway Macrophage and Dendritic Cell Subsets, *J Immunol* 198(3) (2017) 1183-1201.

[47] P.B. Watchmaker, K. Lahl, M. Lee, D. Baumjohann, J. Morton, S.J. Kim, R. Zeng, A. Dent, K.M. Ansel, B. Diamond, H. Hadeiba, E.C. Butcher, Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice, *Nat Immunol* 15(1) (2014) 98-108.

[48] M. Haniffa, F. Ginhoux, X.N. Wang, V. Bigley, M. Abel, I. Dimmick, S. Bullock, M. Grisotto, T. Booth, P. Taub, C. Hilkens, M. Merad, M. Collin, Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation, *J Exp Med* 206(2) (2009) 371-85.

[49] M. Haniffa, A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P.S. Wasan, X.N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R.F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J.K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, F. Ginhoux, Human Tissues Contain CD141(hi) Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103(+) Nonlymphoid Dendritic Cells, *Immunity* 37(1) (2012) 60-73.

[50] N. McGovern, A. Schlitzer, M. Gunawan, L. Jardine, A. Shin, E. Poyner, K. Green, R. Dickinson, X.N. Wang, D. Low, K. Best, S. Covins, P. Milne, S. Pagan, K. Aljefri, M. Windebank, D.M. Saavedra, A. Larbi, P.S. Wasan, K. Duan, M. Poidinger, V. Bigley, F. Ginhoux, M. Collin, M. Haniffa, Human Dermal CD14(+) Cells Are a Transient Population of Monocyte-Derived Macrophages, *Immunity* 41(3) (2014) 465-77.

[51] F.H. Shand, S. Ueha, M. Otsuji, S.S. Koid, S. Shichino, T. Tsukui, M. Kosugi-Kanaya, J. Abe, M. Tomura, J. Ziogas, K. Matsushima, Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(21) (2014) 7771-6.

- [52] R.A. Franklin, W. Liao, A. Sarkar, M.V. Kim, M.R. Bivona, K. Liu, E.G. Pamer, M.O. Li, The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages, *Science* 344(6186) (2014) 921-5.
- [53] B.Z. Qian, J. Li, H. Zhang, T. Kitamura, J. Zhang, L.R. Campion, E.A. Kaiser, L.A. Snyder, J.W. Pollard, CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis, *Nature* 475(7355) (2011) 222-5.
- [54] G. Bakdash, S.I. Buschow, M.A. Gorris, A. Halilovic, S.V. Hato, A.E. Skold, G. Schreiberl, S.P. Sittig, R. Torensma, T. Duiveman-de Boer, C. Schroder, E.L. Smits, C.G. Figdor, I.J. de Vries, Expansion of a BDCA1+CD14+ Myeloid Cell Population in Melanoma Patients May Attenuate the Efficacy of Dendritic Cell Vaccines, *Cancer Res* 76(15) (2016) 4332-46.
- [55] Y. Lavin, S. Kobayashi, A. Leader, E.D. Amir, N. Elefant, C. Bigenwald, R. Remark, R. Sweeney, C.D. Becker, J.H. Levine, K. Meinhof, A. Chow, S. Kim-Shulze, A. Wolf, C. Medaglia, H. Li, J.A. Rytlewski, R.O. Emerson, A. Solovyov, B.D. Greenbaum, C. Sanders, M. Vignali, M.B. Beasley, R. Flores, S. Gnjatic, D. Pe'er, A. Rahman, I. Amit, M. Merad, Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses, *Cell* 169(4) (2017) 750-765 e17.

Figure legends

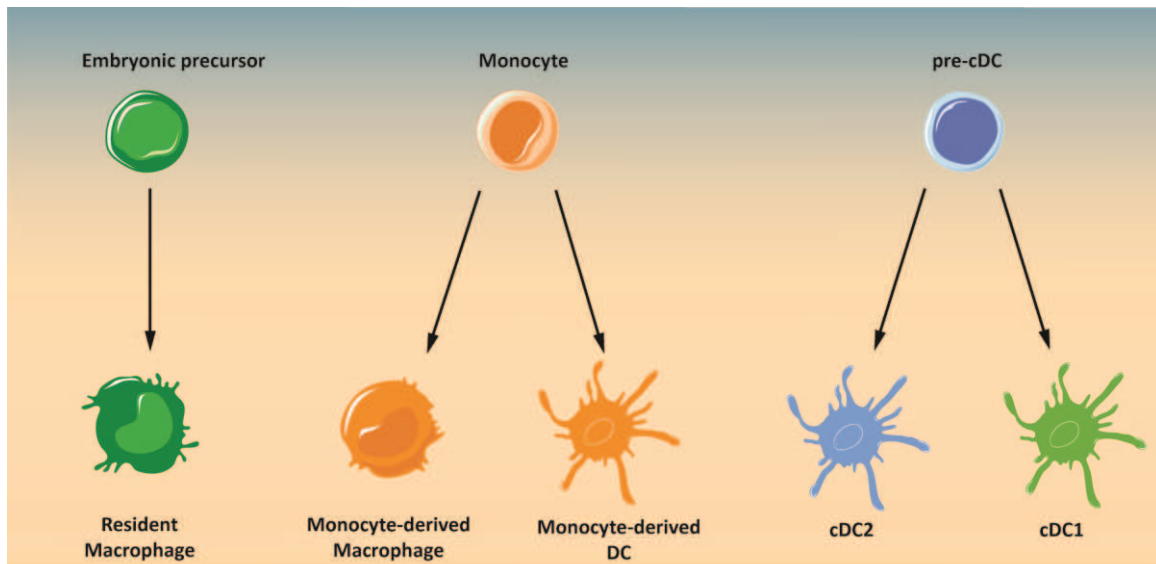


Figure 1. Ontogeny of macrophages and dendritic cells. Macrophages and dendritic cells (DC) populations can be divided into two categories based on their ontogeny: derived from monocytes or from dedicated precursors.

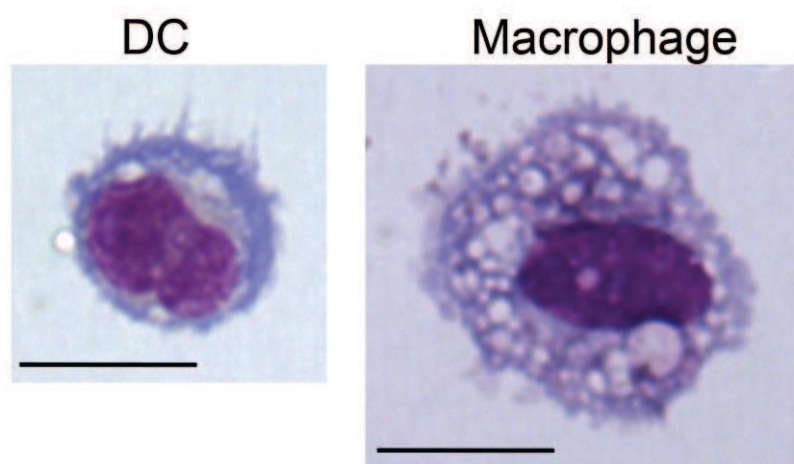


Figure 2. Morphology of human DC versus macrophages. DC and macrophages from the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients were isolated and their morphology analyzed after

cytospin and Giemsa/May-Grünwald staining. Typical DC morphology includes a small size, the presence of dendrites and the lack of internal vacuoles. Bar = 10 μm .

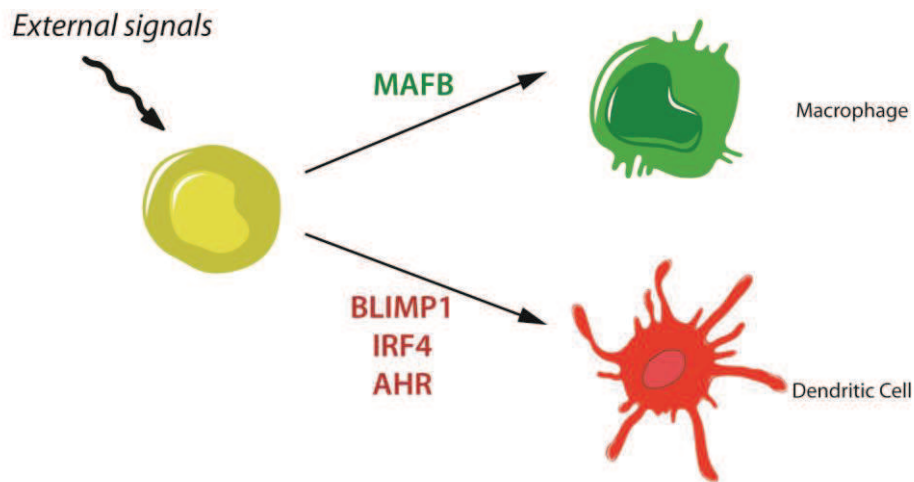


Figure 3. Molecular ontogeny of monocyte-derived cells. In response to external signals (cytokines and AHR ligands), monocytes differentiate either into macrophages or dendritic cells. Transcription factors governing these two pathways are shown.

Table 1. Phenotypic markers for classical DC, mo-DC, monocytes and macrophages.

Surface markers	cDC1	cDC2	Macrophage	mo-DC	CD14 ⁺ monocytes	Slan-DC
HLA-DR	+	+	+	+	+	+
CD11c	+	+	+	+	+	+
CD1c	-	+	-	+	-	-
CD1a	-	Tissue-dependent	-	+	-	-
CD1b	-	Tissue-dependent	-	+	-	-
CD141	+	low	low	+	-	-
CD14	-	-	+	intermediate	+	-
CD16	-	-	Tissue-dependent	-	-/low	+
CD206	-	Tissue-dependent	+	+	-	-
Clec9A	+	-	-	-	-	-
CD163	-	-	Tissue-dependent	-	-	-
CD11b	-	Tissue-dependent	+	+	+	+
MerTK	-	-	+	-	-	-
FcεRI	-	Tissue-dependent	-	+	-	-
Slan (M-DC8)	-	-	-	-	-	+

Table 2. Human tissues in which mo-DC have been identified.

Tissue	Condition	Reference
BAL	healthy	[45]
BAL	healthy	[46]
Colorectal tumor	cancer	[28]
Intestine	healthy	[47]
Lung	healthy	[44]
Lung tumor	cancer	[28]
Lung tumor	cancer	[55]
Melanoma	cancer	[54]
Nasal mucosa	allergic rhinitis	[25]
Peritoneum	healthy	[24]
Peritoneum	peritonitis	[24]
Peritoneum	tumor ascites	[26]
Skin	atopic dermatitis	[18]
Skin	psoriasis	[19]
		[20]
Synovial fluid	rheumatoid arthritis	[26]