

Université de Montréal

ÉTUDE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES MOLÉCULES RELIÉES À  
L'APOPTOSE DURANT LA MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES :  
RÔLE PRO-APOPTOTIQUE DE FAS

par

Sandrine Crabé

Programme de microbiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)  
En immunologie

© Sandrine Crabé, 2008



W

4

U58

2008

v.011

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

ÉTUDE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES MOLÉCULES RELIÉES À  
L'APOPTOSE DURANT LA MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES :  
RÔLE PRO-APOPTOTIQUE DE FAS

présentée par :

Sandrine Crabé

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Présidents rapporteur : Dr. Jacques Thibodeau/Dr. Nathalie Labrecque

Directeur de recherche : Dr. Rafick-Pierre Sékaly

Co-directeur de recherche : Dr. Sylvie Beaulieu

Membre du jury : Dr. Réjean Lapointe

Examineur externe : Dr. Viktor Steimle

Thèse acceptée le 17 décembre 2007



## **SOMMAIRE**

Les cellules dendritiques (DC) constituent les cellules présentatrices d'antigène les plus efficaces du système immunitaire. Elles sont capables d'initier des réponses primaires et secondaires, mais elles sont aussi responsables du maintien de la tolérance. Afin d'effectuer leur travail de présentation de l'antigène et d'activation des lymphocytes T, deux états caractérisent les DC. Dans un premier temps, elles sont immatures et se localisent au niveau de la périphérie. Cette situation permet aux DC d'effectuer un travail de sentinelle. Elles capturent les antigènes environnants et les appréhendent dans le but de les présenter associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Dans un second temps, après avoir été au contact d'une situation de danger ie.infection de l'hôte par un pathogène, les DC migrent vers le ganglion et y entament un processus de maturation. La localisation dans le ganglion leur permet d'interagir avec les lymphocytes T initiant ainsi la réponse immunitaire.

Curieusement, leur élimination reste un sujet obscur. Cette thèse traite d'une part de la régulation de l'apoptose induite via Fas durant la maturation; et d'autre part, de l'expression génique des molécules reliées à l'apoptose durant la maturation des DC.

Comme les DC sont impliquées dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T  $CD8^+$ , nous avons voulu déterminer comment les DC résistent à la lyse induite par les CTL (cytotoxic T lymphocytes) activés. La maturation induit l'augmentation de l'expression de l'inhibiteur de protéase PI9, protégeant les DC contre l'effet du granzyme. Cependant l'impact de la voie Fas sur la survie des DC est encore mal compris. Bien que les DC expriment le récepteur Fas quel que soit leur stade de maturation, l'engagement de celui-ci peut induire une co-stimulation des DC ou leur apoptose.

Nous démontrons que l'engagement de Fas induit l'apoptose des DC immatures. De plus les DC immatures sont des cellules de type II. Ces dernières sont caractérisées par la dépolarisation de la mitochondrie suite à l'engagement de Fas, contrairement aux cellules de type I. La maturation induite soit par des cytokines pro-inflammatoires, soit par du LPS (lipopolysaccharide) ou soit par CD40L induit une résistance à l'apoptose induite par les TNFRs (Tumor Necrosis Factor receptors). En fait la stimulation des DC provoque la sur-expression de plusieurs molécules anti-

apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1, FLIP et cIAP-2. Ces molécules sont connues pour bloquer la voie d'apoptose induite par Fas.

Comme la maturation augmente l'expression de certaines molécules anti-apoptotiques, nous avons voulu investiguer quels étaient les effets de la maturation sur le profil d'expression des gènes reliés à l'apoptose. Afin d'avoir une vision plus large de ces modifications, nous avons criblé à l'aide de biopuces le transcriptome de ces cellules à différents stades de maturation. Puis nous avons confirmé les variations d'expression des gènes d'intérêts par le biais d'expériences de protection par la RNase. Cela nous a permis de définir les voies de signalisation reliées à l'apoptose qui sont modifiées durant la maturation.

Nous avons observé que la maturation entraîne l'induction d'un programme anti-apoptotique caractérisé par l'augmentation de l'expression de nombreuses molécules anti-apoptotiques et de la diminution de l'expression de quelques molécules pro-apoptotiques. Nous avons pu confirmer que la voie de signalisation de Fas est grandement inhibée lors de la maturation. Cependant nous avons aussi constaté que l'expression de certains gènes pro-apoptotiques était augmentée lors de la maturation surtout avec LPS.

Ces études nous permettront de mieux connaître les mécanismes régissant la survie des DC. Ces connaissances conduiront à l'élaboration ou à l'amélioration des nouvelles immunothérapies développées contre le cancer ou contre les infections virales.

Mots-clé : Cellules dendritiques, apoptose, Fas, biopuce à ADN

**SUMMARY**

Dendritic cells (DC) are the most powerful antigen presenting cells in the immune system. They are able to induce primary and secondary response. They are also responsible for tolerance induction and its maintenance. DC are found in two states. Immature DC are located in the periphery where they perform a sentinel work. They are specialized in the capture and processing of antigen. After encountering antigen, DC migrate to lymph nodes. Maturation begins during this migration and is completed upon its interaction with T cells.

However, the elimination of DC remains very unclear. This thesis has focused on the impact of maturation on Fas pathway and on apoptosis related genes expression regulation in DC.

DC are involved in the activation of CD8 T lymphocytes; we decided to define the mechanisms that allow DC to survive lysis induced by activated CTL. The maturation leads to the increase of the protease inhibitor-9 (PI-9). This protein blocks granzyme activity. However the issue of Fas engagement remains still a matter of debate. Some papers argue for a co-stimulatory role of Fas, whereas others demonstrate a pro-apoptotic action of Fas.

We show that the engagement of Fas on DC induce the apoptosis of immature DC. Moreover, immature DC are type II cells characterized by mitochondrial membrane depolarization. The maturation induction by pro-inflammatory cytokines or LPS or CD40L leads to the TNFR induced apoptosis DC resistance. This is due to the increase in the expression of anti-apoptotic molecules as Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1, FLIP and cIAP-2. The accumulation of these anti-apoptotic molecules leads to a blockade of all apoptotic pathways.

As we showed that maturation induces anti-apoptotic molecule upregulation, we investigate how maturation modulates apoptosis related gene profile. We performed microarray experiments to obtain a better view of the modulation of gene expression in DC during maturation, and then we confirmed by RNase protection.

We demonstrate that the maturation leads to the modulation of apoptosis related gene expression. During maturation, we detect an up-regulation of anti-apoptotic and a down-regulation of pro-apoptotic molecule expression. We show that molecules implicated in the Fas pathway are modulated. It seems that maturation

installs an anti-apoptotic program. However, we also noticed that some pro-apoptotic genes are upregulated during maturation, especially with LPS maturation.

These studies allow us to have a better understanding of DC survival mechanisms. These knowledges could participate to develop or improve the new immunotherapies developed against cancer or viral infections.

**Key words:** Dendritic cells, apoptosis, Fas, microarrays

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AIF	Apoptosis-inducing factor
APAF-1	Apoptosis protease-activating factor 1
APC	Antigen presenting cells
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
bmDC	bone marrow dendritic cells ou cellules dendritiques issues de la moelle osseuse
CARD	Caspase-recruitment domain
Caspase	CaspaseCysteiny aspartate-specific proteinase
CD	Cluster de différenciation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CR	Complement receptor ou Récepteur du complément
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte ou Lymphocyte T CD8 <sup>+</sup> cytotoxique
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DC	Dendritic cells ou Cellule Dendritique
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DR	Death receptor
FADD	Fas-associated via death domain
FcR	Récepteur de la partie constante des immunoglobulines
FLIP	FLICE-inhibitory protein
G-CSF	Granulocyte-colony secreting factor
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-colony secreting factor

HSP	Heat shock protein ou proteines du choc thermique
IAP	Inhibitors of apoptosis
IDO	2,3-dioxygénaseindoléamine
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IPC	Interferon producing cells ou Cellules produisant de l'IFN
LAMP-3	Lysosomal-associated membrane protein 3
LPS	Lipopolysaccharide
MCP	Macrophage chemoattractant protein
MIIC	MHC type II compartment ou Compartiment du CMH de classe II
MIP	Macrophage inflammatory protein
MR	Mannose receptor ou Récepteur du mannose
NK	Natural killer
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PCL	Progéniteur commun lymphoïde
PCM	Progéniteur commun myéloïde
pDC	Plasmacytoid DC ou DC plasmacytoides
PI-9	Protease inhibitor-9
PRR	Pattern recognition receptor
PS	Phosphatidylserine
RANK	Receptor activator of NK-kB
RANKL	Receptor activator of NK-kB ligand
RANTES	Regulated on activation normal T cells expressed and secreted
RE	Réticulum endoplasmique



RIP	Receptor-interacting protein
SCF	Stem cell factor
SMAC/Diablo	Second mitochondrial activator of apoptosis/direct Iap binding protein with low pI
SR	Scavenger receptor ou Récepteur scavenger
TCR	Récepteur de la cellule T ou T cell receptor
Th	Lymphocyte T helper ou auxiliaire ou CD4 <sup>+</sup>
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF receptor
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
TRADD	TNF receptor 1-associated death domain protein
TRAF	TNF receptor-associated factor
Treg	Lymphocyte T régulateur
TSA	Tissu specific antigen ou antigène spécifique de tissu

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr. Rafick-Pierre Sékaly qui m'a accueillie au sein de son laboratoire. Sa passion de l'Immunologie et sa rigueur expérimentale ont été le long de mon doctorat un exemple à suivre et une source constante de motivation. En outre, le Dr. Sékaly m'a été d'une grande aide lors de mon congé maternité. Je veux lui dire ici ma sincère gratitude.

Ensuite je souhaiterais remercier ma co-directrice le Dr. Sylvie Beaulieu.

De même, j'aimerais remercier Gaëlle Breton et le Dr. Ehssan Sharif-Askari qui m'ont assistée dans la complétion de mon manuscrit.

Je veux aussi dire ma reconnaissance à Gaëlle Breton, Anne-Elen Kernaleguen, le Dr. Olivier Chambenoit, le Dr. Karine Maisnier-Patin et le Dr. Marie-Laurence Baron pour leur support et leur aide dans la relecture de ma thèse.

Puis, je désirerais remercier le Département d'Immunologie de l'Université de Montréal pour son support financier.

Enfin, je remercie l'ensemble des membres du comité de correction de ma thèse.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>IV</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>VII</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>X</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. LE CYCLE DE VIE DES DC</b> .....	<b>2</b>
1.1. GÉNÉRALITÉS.....	2
1.2. L'ORIGINE DES CELLULES DENDRITIQUES.....	4
1.3. LES CELLULES DENDRITIQUES IMMATURES .....	8
1.3.1. RECRUTEMENT DES PRÉCURSEURS .....	8
1.3.2. CAPTURE.....	8
1.3.3. APPRÊTEMENT ET PRÉSENTATION DE L'ANTIGÈNE .....	10
1.4. LA MATURATION .....	16
1.4.1. CHANGEMENTS DE PHÉNOTYPE .....	17
1.4.2. LES SIGNAUX DU DANGER .....	20
1.4.3. L'INTERACTION AVEC LES LYMPHOCYTES T.....	23
1.5. LES CELLULES DENDRITIQUES MATURES .....	24
1.5.1. ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T CD4 <sup>+</sup> .....	25

1.5.2. ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T CD8 <sup>+</sup> .....	29
1.5.3. ACTIVATION DES LYMPHOCYTES B .....	31
1.5.4. INTERACTION AVEC LES NK .....	32
1.6. LE MAINTIEN DE LA TOLÉRANCE .....	<b>33</b>
1.6.1. LA TOLÉRANCE CENTRALE .....	33
1.6.2. LA TOLÉRANCE PÉRIPHÉRIQUE .....	34
<b>2. <u>L'ÉLIMINATION DES DC.....</u></b>	<b>37</b>
2.1. RAPPELS SUR L' APOPTOSE.....	<b>38</b>
2.1.1. LES MODIFICATIONS CELLULAIRES .....	38
2.1.2. LES CASPASES .....	39
2.1.3. LA FAMILLE BCL2 .....	44
2.1.4. LA MITOCHONDRIE .....	46
2.1.5. LES RÉCEPTEURS DE MORT (TNFR) ET LEURS LIGANDS (TNF) .....	47
2.1.6. LE SYSTÈME FAS/FASL .....	52
2.1.7. RÉGULATION DE L' ACTIVITÉ DES CASPASES .....	54
2.2. L'ÉLIMINATION DES CELLULES DENDRITIQUES.....	<b>56</b>
2.2.1. LES SIGNAUX SUR LE SITE D'INFECTION .....	57
2.2.2. LES SIGNAUX DANS LES GANGLIONS.....	59
2.2.3. LE LIEN ENTRE SURVIE/MATURATION: MAPK, ERK, AKT/PI3K .....	60
2.2.4. LE RÔLE CONTROVERSÉ DE FAS .....	61
<b><u>JUSTIFICATIONS ET OBJECTIFS.....</u></b>	<b>69</b>
<b><u>CHAPÎTRE 1.....</u></b>	<b>73</b>
<b><u>CHAPÎTRE 2.....</u></b>	<b>112</b>
<b><u>DISCUSSION .....</u></b>	<b>169</b>
<b>3. <u>RÉSISTANCE DES DC A L' APOPTOSE .....</u></b>	<b>171</b>

<b>3.1. INHIBITION DE LA VOIE FAS .....</b>	<b>171</b>
3.1.1. INHIBITION PROXIMALE DE LA VOIE DE SIGNALISATION : AU NIVEAU DU DISC 172	
3.1.2. INHIBITION DISTALE DE LA VOIE DE SIGNALISATION : AU NIVEAU DE LA MITOCHONDRIE .....	175
<b>3.2. INHIBITION DES CASPASES ACTIVES .....</b>	<b>178</b>
<b>4. <u>ÉLIMINATION DES DC .....</u></b>	<b><u>182</u></b>
<b>5. <u>APPLICATIONS.....</u></b>	<b><u>185</u></b>
<b><u>CONCLUSION.....</u></b>	<b><u>188</u></b>
<b><u>ANNEXES.....</u></b>	<b><u>191</u></b>
<b><u>RÉFÉRENCES .....</u></b>	<b><u>229</u></b>

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 2

<b>Table 1 A: Differential gene expression analyses using microarrays in DCs exposed to LPS or MCM treatments during time course.....</b>	<b>148</b>
<b>Table 1 B: Differential gene expression analyses using microarrays in DCs exposed to LPS or MCM treatments during time course.....</b>	<b>149</b>
<b>Table 1 C: Differential gene expression analyses using microarrays in DCs exposed to LPS or MCM treatments during time course.....</b>	<b>150</b>
<b>Table 2: Parameters used by BD to assign confidence level to changes in protein expression.....</b>	<b>151</b>
<b>Table 3: Protein changes in MCM-mimic treated DC relative to iDC.....</b>	<b>152</b>
<b>Table 4: Protein changes in LPS treated DC relative to iDC.....</b>	<b>153</b>
<b>Table 5: Protein changes in CD40L treated DC relative to iDC.....</b>	<b>154</b>
<b>Supplementary data 1: Protein changes in MCM-mimic treated DC relative to iDC.....</b>	<b>160</b>
<b>Supplementary data 2: Protein changes in LPS treated DC relative to iDC.....</b>	<b>163</b>

### ANNEXE

<b>Tableau 1. Principales molécules associées à la maturation des cellules dendritiques. ....</b>	<b>209</b>
<b>Tableau 2. Récapitulatif des essais cliniques basés sur l'utilisation des cellules dendritiques transfectées avec de l'ARNm spécifique d'antigène ou avec l'ensemble des ARNm issus d'une tumeur.....</b>	<b>210</b>

## **INTRODUCTION**

## 1. LE CYCLE DE VIE DES DC

### 1.1. Généralités

Le système immunitaire est responsable de la protection de l'organisme contre les agressions qu'elles soient extérieures (virus, bactéries...) ou intérieures (cellules cancéreuses, cellules apoptotiques...). Il se compose de deux parties : l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée (ou naturelle) constitue la première ligne de défense, mais ne reconnaît pas de manière spécifique le pathogène. L'immunité acquise (ou adaptative) est basée sur la sélection clonale de lymphocytes dotés de récepteurs spécifiques de l'antigène (Turley, Inaba et al. 2000), hautement diversifiés. Après leur activation, ces lymphocytes spécifiques de l'antigène prolifèrent et se différencient en cellules effectrices aptes à éliminer les pathogènes. Une partie de ces cellules activées vont persister dans l'organisme afin d'assurer la mémoire protégeant ainsi l'organisme d'une réinfection. C'est la reconnaissance spécifique de l'antigène et la mise en place de la mémoire qui différencient ces deux composantes.

L'activation des lymphocytes T nécessite la dégradation de l'antigène en peptide et la présentation de celui-ci associé au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Cette fonction est assurée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les CPA comprennent trois types cellulaires : les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques (DC). Toutes ces cellules sont capables de présenter l'antigène dans le contexte du CMH, mais le type et-ou la qualité de la réponse immunitaire dépend du type de CPA utilisé.

Les DC ont été visualisées pour la première fois en 1868 au niveau de la peau et nommées cellules de Langerhans, du nom de leur découvreur. Toutefois, leur véritable caractérisation a débuté, il y a seulement un peu plus de 25 ans, lorsqu'il a été possible de les isoler et de les différencier des autres CPA. Les DC se distinguent des autres CPA par leur capacité à activer les lymphocytes naïfs. Pendant longtemps seul leur rôle d'adjuvant naturel a été étudié. Mais plus récemment il a été démontré qu'elles étaient



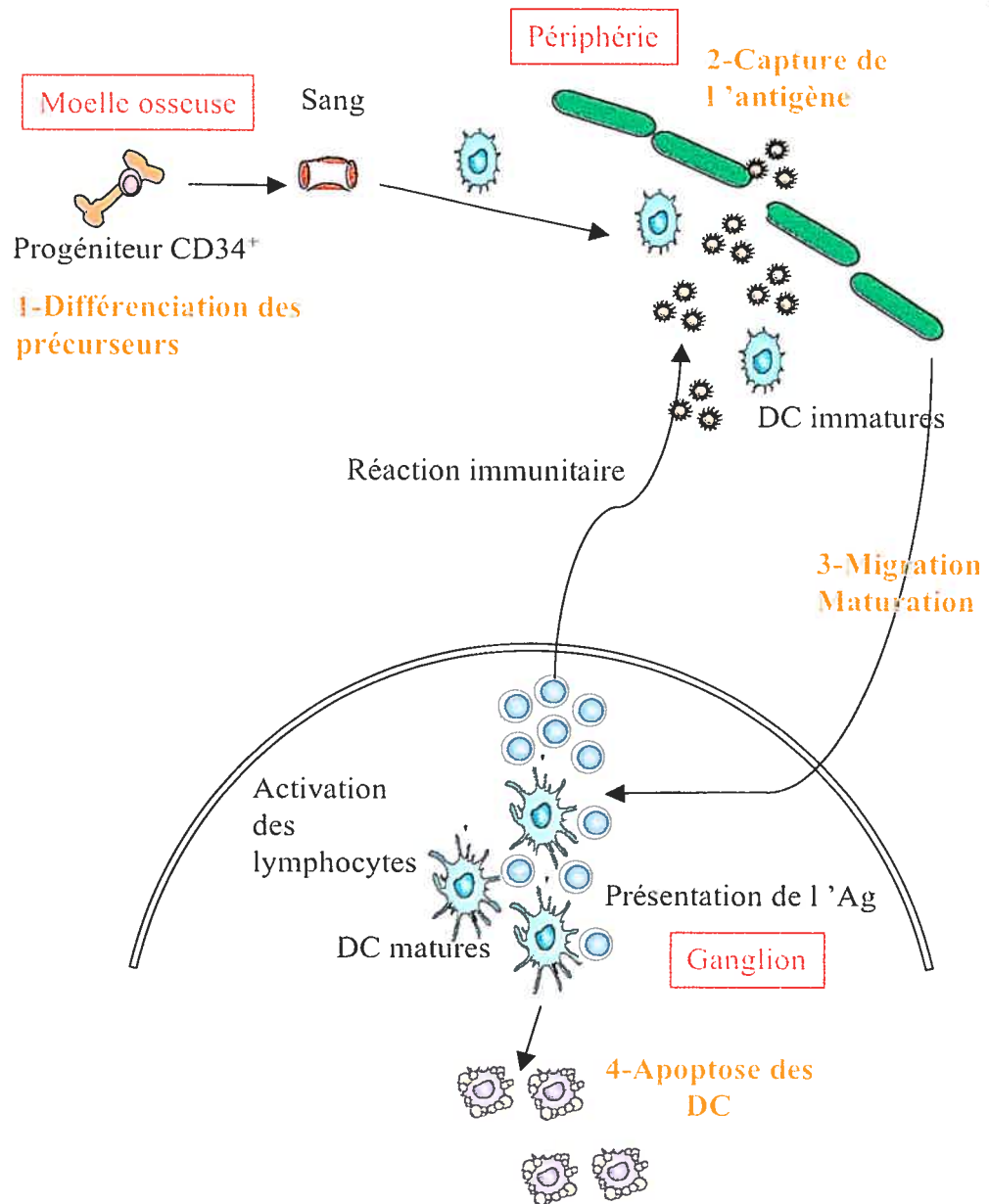


Figure 1 : Cycle de vie des DC.

Le cycle de vie se découpe en quatre parties. 1- La différenciation a lieu dans la moelle osseuse. 2- Via le sang, les DC immatures migrent à la périphérie où elles effectuent un travail de surveillance. 3- Après la capture de l'antigène, les DC effectuent une migration vers le ganglion, durant laquelle elles commencent leur maturation. Une fois dans le ganglion, les DC matures interagissent avec les lymphocytes. 4- Finalement, les DC meurent supposément par apoptose. (D'après Banchereau *et al.*, 2000)(Banchereau, Briere et al. 2000).

aussi capables d'interagir avec les cellules de la réponse innée comme les cellules tueuses NK (Natural Killer) et les cellules tueuses NKT et étaient responsables de la tolérance immunologique. Grâce à ces qualités, les DC ont un rôle prépondérant dans l'homéostasie et le fonctionnement système immunitaire.

Le cycle de vie d'une DC (Figure 1) peut être divisé en quatre étapes successives s'effectuant dans des compartiments différents. 1) Les précurseurs des DC sont localisés dans la moelle osseuse. 2) Les DC immatures migrent ensuite jusqu'à la périphérie où elles effectuent un travail de surveillance. En présence d'un danger, les DC immatures vont reconnaître ce signal entraînant l'internalisation et la dégradation de l'antigène. 3) Afin d'effectuer leur travail de présentation et de stimulation des lymphocytes T, les DC migrent alors jusqu'au ganglion lymphatique. Leur maturation commence durant ce trajet, mais ne se terminera qu'après la mise en contact avec les lymphocytes. 4) Les DC disparaissent du ganglion lymphatique supposément par apoptose (Ingulli, Mondino et al. 1997).

## 1.2. L'origine des cellules dendritiques

Les DC se composent de plusieurs sous-types cellulaires qui sont phénotypiquement et fonctionnellement divers. Cette hétérogénéité est assurée par l'existence de plusieurs précurseurs et de différentes voies d'activation.

Comme toutes les cellules du système immunitaire, les DC sont issues des progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (HPC) localisés dans la moelle osseuse (Figure 2). Ceux-ci se différencient en deux précurseurs : le précurseur commun lymphoïde (PCL) et le précurseur commun myéloïde (PCM).

Avec l'apparition de ces deux précurseurs, deux voies de différenciation se distinguent : la voie lymphoïde et la voie myéloïde.

- La voie lymphoïde : Via une différenciation en DC CD11c<sup>-</sup>, les PCL donnent naissance aux DC plasmacytoïdes (pDC). Leur origine lymphoïde est soutenue par la démonstration de l'expression de certains gènes spécifiques aux cellules lymphoïdes comme la chaîne  $\alpha$  du pré-récepteur T (pT $\alpha$ ), mais aussi par l'absence de marqueurs

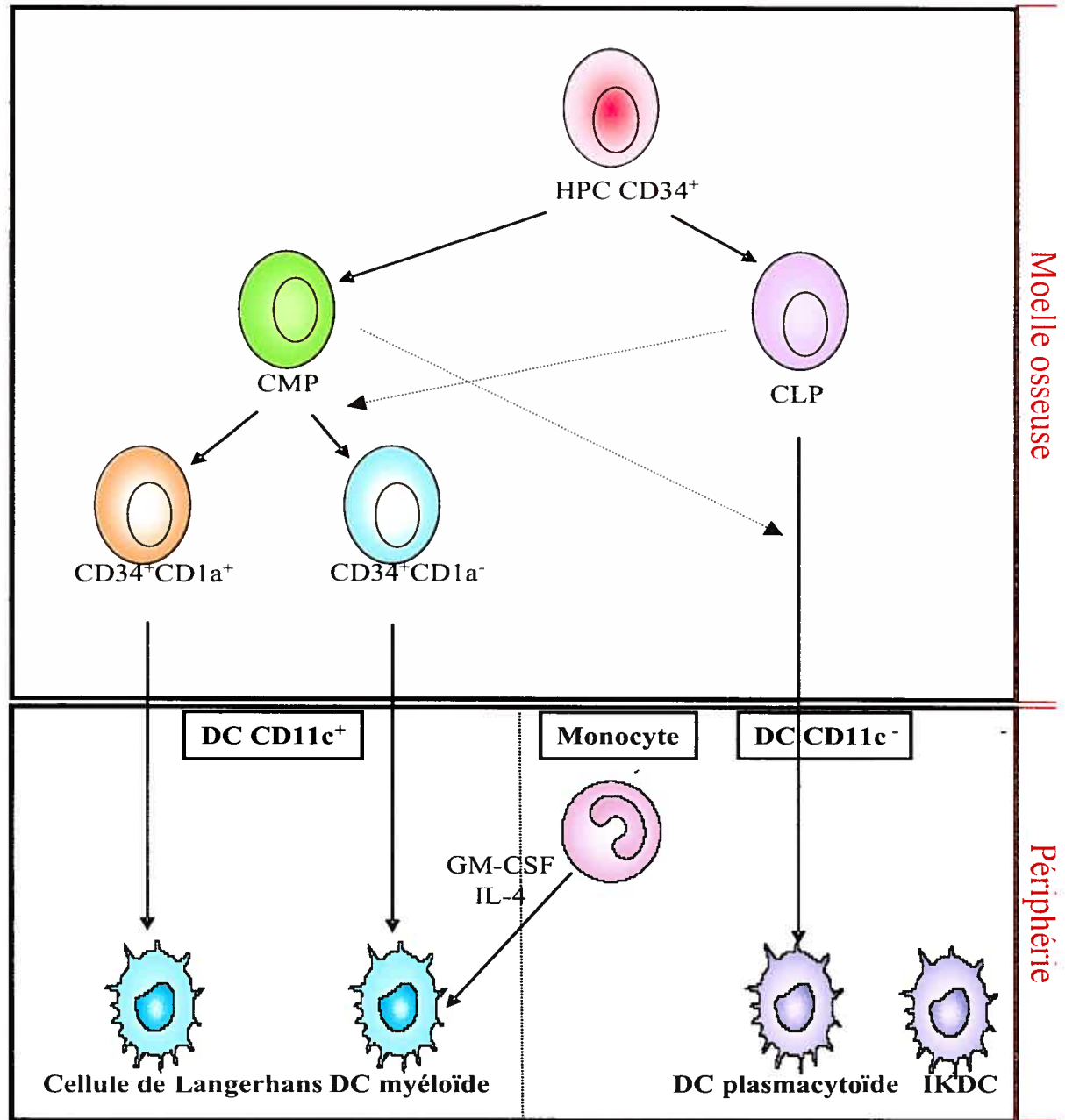


Figure 2 : Hétérogénéité des DC.

Les DC sont issues du progéniteur hématopoïétique CD34<sup>+</sup> situé dans la moelle osseuse. Après la différenciation en PCL et PCM, deux types de précurseurs sont retrouvés dans le sang : les DC CD11c<sup>-</sup> et les DC CD11c<sup>+</sup>. Les DC CD11c<sup>-</sup> se différencient en DC plasmacytoïdes. Les PCM se différencient en deux sous-types de DC : en cellules de Langerhans et en DC interstitielles. La plupart des études sont effectuées à l'aide de DC dérivées de monocytes en présence de GM-CSF et d'IL-4. Ces cellules ressemblent beaucoup à des DC interstitielles.

(D'après (Grabbe, Kampgen et al. 2000)).

myéloïdes (Ardavin, Wu et al. 1993; Res, Couwenberg et al. 1999; Spits, Couwenberg et al. 2000). Les IKDC (Interferon-producing killer dendritic cells) sont aussi issues de cette voie (Welner, Pelayo et al. 2007).

- La voie myéloïde : Quant aux PCM, ils se différencient en deux intermédiaires exprimant ou non le marqueur CD1a. Les précurseurs CD1a<sup>+</sup> se différencient en cellules de Langerhans alors que les cellules CD1a<sup>-</sup> sont les précurseurs des DC interstitielles.

Toutefois, le schéma de différenciation n'est pas aussi simple. Il a été démontré que les précurseurs lymphoïdes peuvent se différencier en DC myéloïdes et que les PCM peuvent donner naissance à des DC de type lymphoïde. En fait des expériences menées *in vivo* ont démontré que les sous-types CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> et les pDC peuvent se différencier aussi bien à partir des PLC que des PMC (Akashi, Traver et al. 2000; Traver, Akashi et al. 2000; Manz, Traver et al. 2001; Wu, D'Amico et al. 2001; D'Amico and Wu 2003)

Ces différents sous-types cellulaires : les pDC, les IKDC, les cellules de Langerhans et les DC interstitielles présentent des phénotypes, des localisations et des fonctions différentes.

- Les pDC : Au cours de leur caractérisation, ces cellules ont été nommées cellules plasmacytoïdes (Lennert and Remmele 1958), monocytes plasmacytoïdes (Facchetti, Vermi et al. 2003) ou encore DC lymphoïdes (Ardavin, Wu et al. 1993; Res, Couwenberg et al. 1999; Spits, Couwenberg et al. 2000), pre-DC2 (Shigematsu, Reizis et al. 2004) ou cellules sécrétrices d'interféron (IPC) (Trinchieri, Santoli et al. 1978). Elles sont maintenant communément appelées pDC (Siegal, Kadowaki et al. 1999). Il existe deux marqueurs dont l'expression est restreinte aux pDC : Blood DC Antigen-2 (Dzionek, Sohma et al. 2001) et BDCA-4 (Dzionek, Inagaki et al. 2002). La fonction de ces marqueurs n'est pas encore très claire, mais ils sont utilisés comme marqueurs spécifiques des pDC. Ces cellules se localisent dans le sang ou dans les ganglions au niveau des zones riches en lymphocytes T à proximité des veines endothéliales (Colonna, Trinchieri et al. 2004). Elles sont reconnues pour leur capacité à sécréter de grande quantité d'interférons de type I en réponse aux infections virales (Kol, Lichtman et al. 2000).

- Les IKDC : Récemment, il a été décrit un nouveau type de DC appelé les IKDC possédant un phénotype hybride partagé entre les pDC et les cellules NK (Natural Killer). Elles expriment les marqueurs B220, CD122, NK1.1, CD11c, sécrètent des interférons (IFN), possèdent la capacité de présenter des antigènes mais aussi une forte activité cytotoxique ou anti-tumorale (Chan, Crafton et al. 2006; Taieb, Chaput et al. 2006; Spits and Lanier 2007)

- Les cellules de Langerhans : Elles sont identifiables en microscopie par la présence des granules de Birbeck dans leur cytoplasme. Ces cellules expriment aussi la langerine, une lectine constitutivement associée aux granules de Birbeck. La fonction de ces organelles reste inconnue. Les cellules de Langerhans sont aussi discernables par l'expression de la E-cadherine, molécule responsable de leur localisation dans les épithéliums. Les cellules de Langerhans sont des meilleurs stimulateurs des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> que les autres sous-types de DC (Banchereau and Steinman 1998).

- Les DC interstitielles : Ces cellules sont aussi qualifiées de DC conventionnelles. Contrairement aux cellules de Langerhans, les DC interstitielles ne contiennent pas de granules de Birbeck, mais expriment CD68, un récepteur scavenger. Grâce à ces deux marqueurs (granules de Birbeck et CD68), il est possible de différencier les deux sous-types cellulaires myéloïdes. Les DC interstitielles se localisent dans tous les organes excepté le cerveau. Après stimulation, les DC interstitielles produisent de l'IL-10 (Saint-Vis, Fugier-Vivier et al. 1998) et sont capables de stimuler la prolifération des lymphocytes B du centre germinatif, de provoquer la commutation isotypique et la production d'immunoglobulines, au contraire des cellules de Langerhans (Fayette, Dubois et al. 1997; Dubois, Bridon et al. 1999).

Très récemment, il a été décrit qu'il existe des progéniteurs logés ailleurs que dans la moelle osseuse. La rate contient un progéniteur capable de se différencier en DC conventionnelle mais pas en un autre sous-type comme les pDC. Ces « pre-DC » sont CD11c<sup>int</sup> CD45RA<sup>lo</sup> CD43<sup>int</sup> SIRP- $\alpha$ <sup>int</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CMH-II<sup>-</sup> et ne sont pas des monocytes (Liu, Waskow et al. 2007).

Il existe d'autres sous-types qui sont différenciés *in vitro*, notamment les cellules sont issues de monocytes cultivés avec de l'IL-4 et du GM-CSF (Figure 2). Elles sont très proches des DC interstitielles du point de vue phénotype et fonction.

### 1.3. Les cellules dendritiques immatures

Les DC immatures exercent un travail de sentinelle dans la périphérie. Elles sont attirées sur le site d'infection par la création d'un gradient de chémokines attractives. Elles sont hautement spécialisées pour capturer l'antigène et pour l'apprêter en peptides dans le dessein de le présenter à leur surface en association avec le CMH.

#### 1.3.1. Recrutement des précurseurs

Lors de l'intrusion d'un pathogène (virus, bactérie...), les cellules endothéliales réagissent en produisant rapidement des chémokines inflammatoires comme l'IL-8, le MIP-1 $\beta$  (Trinchieri, Santoli et al. 1978), le MCP (Macrophage Chemoattractant Protein)-1 et les RANTES (Regulated on Activation Normal T cells Expressed and Secreted) (Kuss, Knodel et al. 1999; Zlotnik and Yoshie 2000). Ces chémokines forment un gradient et attirent les cellules inflammatoires comme les granulocytes et les monocytes sur le site d'infection. Les DC immatures expriment aussi les récepteurs de ces chémokines inflammatoires (CXCR1, CCR1, CCR2 et CCR5, CCR6) (Randolph, Beaulieu et al. 1998; Randolph, Inaba et al. 1999). Grâce à ces récepteurs, les DC suivent le gradient attractif de chémokines et atteignent la source du stimulus inflammatoire (Sallusto and Lanzavecchia 2000), où elles entrent en contact avec le pathogène.

#### 1.3.2. Capture

Les DC immatures capturent les antigènes de manière très efficace, en utilisant différents mécanismes : la phagocytose, la macropinocytose et l'endocytose assurée par un récepteur (Guermontprez, Valladeau et al. 2002).

- La phagocytose : Ce processus permet l'internalisation des antigènes particuliers. Il est dépendant de l'actine, requiert la désorganisation de la membrane

et conduit à la formation de larges vacuoles intracellulaires, appelés phagosomes. La phagocytose est généralement assurée par des récepteurs comme les récepteurs pour la partie constante (Fc) des immunoglobulines (FcR) et les récepteurs du complément (CR) ou encore les intégrines. Les DC dérivées des monocytes expriment : FcγRII (CD32), FcαR (Geissmann, Launay et al. 2001), ainsi que le CR3 et le CR4 (Reis e, Stahl et al. 1993). Ces récepteurs permettent la reconnaissance de particules opsonisées. Elles expriment aussi les intégrines  $\alpha_5\beta_3$  et  $\alpha_5\beta_5$ , qui associées avec la molécule CD36 permettent la capture des corps apoptotiques (Arnold-Schild, Hanau et al. 1999).

- La macropinocytose : Les antigènes solubles sont internalisés par macropinocytose. Celle-ci est une absorption de fluide. Contrairement aux macrophages et aux cellules endothéliales, la macropinocytose est un phénomène constitutif chez les DC immatures.

- L'endocytose assurée par des récepteurs : L'endocytose est assurée par des récepteurs localisés dans des régions spécialisées de la membrane plasmique qui s'invaginent et qui sont riches en clathrine, appelées puits recouverts (ou coated pits). Ce processus est initié par la région cytoplasmique des récepteurs d'endocytose (après fixation du ligand) qui est en contact avec des molécules adaptatrices intracytoplasmiques. Ces adaptateurs recrutent un réseau de clathrine et induisent la formation de vésicules d'endocytose de petite taille (Slepnev and De Camilli 2000).

Les DC immatures expriment un grand nombre de récepteur d'endocytose :

- Les DC sont capables de capturer et de présenter les peptides liés aux protéines du choc thermique (gp96 et hsp-70) libérées lors de la mort cellulaire par nécrose (Arnold-Schild, Hanau et al. 1999; Castellino, Boucher et al. 2000). Le récepteur CD91 a été démontré comme étant responsable de la fixation des protéines du choc thermique sur les DC (Binder, Han et al. 2000; Basu, Binder et al. 2001).

- Certains récepteurs lectine de type C (Récepteur du Mannose (MR) ou DEC-205) sont exprimés par les DC. Le MR reconnaît plusieurs monosaccharides ainsi qu'une variété de pathogènes comme les levures (Banchereau, Briere et al. 2000).

- Les récepteurs scavenger (SR) exercent un rôle important au niveau des défenses de l'hôte puisqu'ils permettent la capture de nombreuses bactéries.

Après internalisation, les complexes ligand-récepteur peuvent emprunter deux voies intracellulaires.

- Le complexe peut être dirigé vers les endosomes puis vers les lysosomes pour être dégradé.

- Le complexe peut aussi être dissocié dans les endosomes. Le récepteur est alors recyclé à la surface cellulaire pour initier de nouveaux cycles d'internalisation et le ligand est dégradé (Le Roy and Wrana 2005).

### 1.3.3. Apprêtement et présentation de l'antigène

Les lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  expriment des TCR qui reconnaissent respectivement les peptides antigéniques associés aux CMH de classe II et de classe I. Ces molécules du CMH exposent des peptides provenant de protéines dégradées dans différents sites intracellulaires. Les molécules du CMH de classe II fixent des peptides provenant de protéines dégradées dans des vésicules intracellulaires acidifiées (antigènes exogènes) alors que les molécules de CMH de classe I lient des peptides venant de protéines dégradées dans le cytosol par le protéasome (antigènes endogènes). Il existe une voie alterne de présentation des peptides antigéniques exogènes associés au CMH de classe I. Ce phénomène est appelé la présentation croisée.

Les DC sont aussi capables de présenter des antigènes non-peptidiques grâce aux molécules CD1.

#### 1.3.3.1. La présentation par le CMH de classe II

La génération du CMH de classe II associé au peptide antigénique implique la dégradation d'antigènes exogènes dans les vésicules d'endocytose et leur association au CMH de classe II dans ces mêmes vésicules. Celles-ci contiennent des protéases telles que les cathepsines B, D et S (Villadangos, Bryant et al. 1999). Leur activité est optimale à pH acide. Les vésicules de cette voie deviennent progressivement acides permettant l'activation progressive des protéases. Le mécanisme par lequel s'exerce cette régulation n'est pas encore clairement défini. Il semble que les vésicules



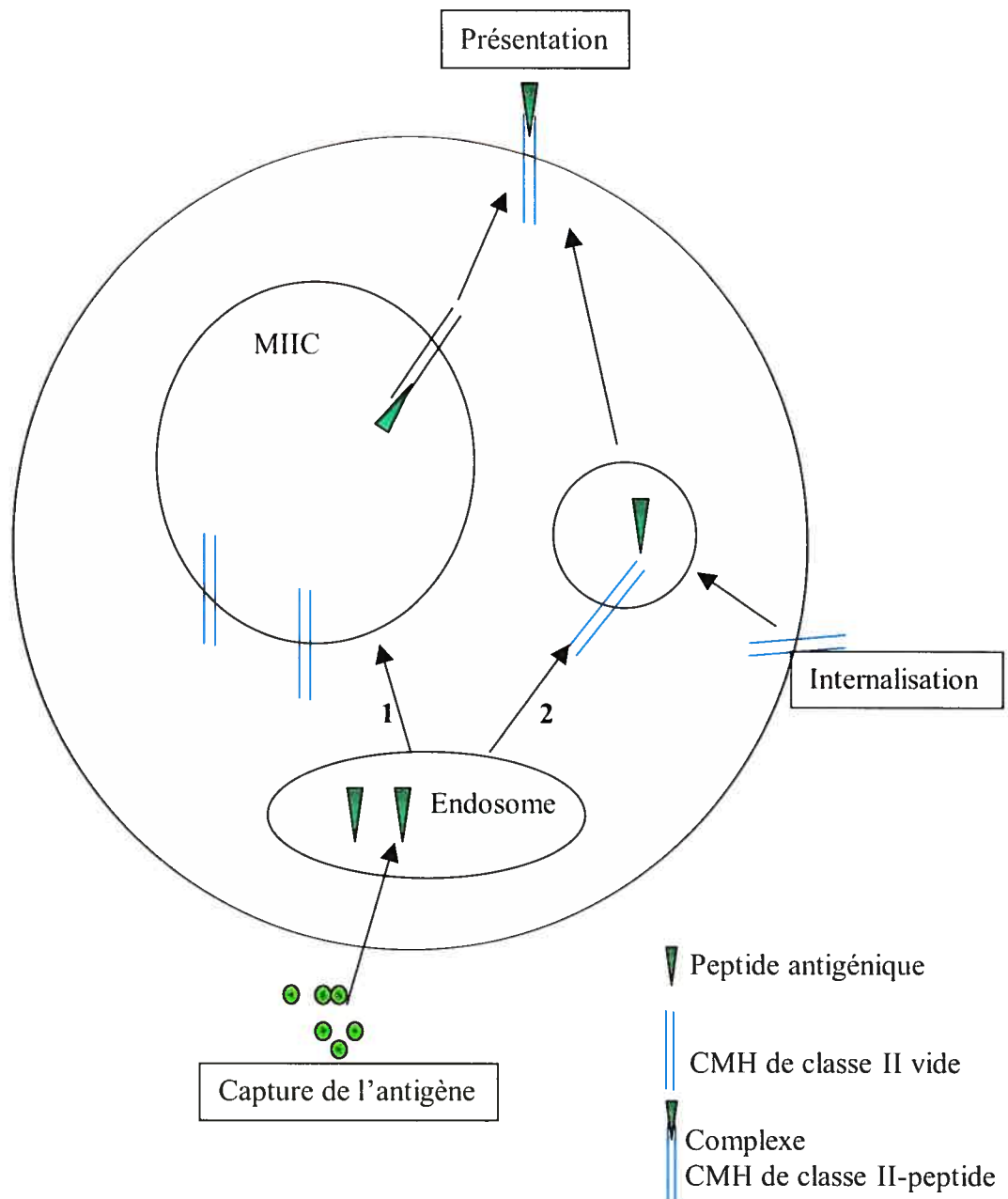


Figure 3 : La présentation via le CMH de classe II.

Les DC capturent l'antigène soit par phagocytose, soit par macropinocytose ou soit par endocytose via un récepteur. 1-L'antigène est alors dégradé dans les endosomes en peptides. Après la fusion des deux vésicules, le peptide s'associe à la molécule de CMH de classe II, puis acheminé vers la surface cellulaire. 2- Si la molécule de CMH de classe II atteint la surface vide, celle-ci est recyclée et peut alors être associée à un peptide antigénique ou elle peut être dirigée vers les lysosomes où elle est dégradée. (D'après (Guermonprez, Valladeau et al. 2002))

contiennent un inhibiteur des cathepsines, la cystatine C. Ce mécanisme entraîne la séquestration de l'antigène jusqu'à la fusion avec les vésicules contenant le CMH de classe II (Pierre and Mellman 1998).

Les molécules de CMH de classe II sortent du réticulum endoplasmique (RE), traversent l'appareil de Golgi pour atteindre la voie endosomale. Dans les DC immatures, les molécules de CMH de classe II s'accumulent dans des compartiments intracellulaires, appelés compartiments de CMH de classe II (MIIC) (Nijman, Kleijmeer et al. 1995). Lors de la maturation, ces compartiments fusionnent avec les vésicules d'endocytose, qui contiennent l'antigène dégradé. Une fois liée au peptide antigénique, la molécule de CMH de classe II se localise à la surface de la membrane plasmique (Figure 3) (Guermonprez, Valladeau et al. 2002).

#### *1.3.3.2. La présentation par le CMH de classe I*

- La voie endogène

La majorité des peptides associés au CMH de classe I sont générés à partir de protéines présentes dans le cytosol (antigènes endogènes). Ces protéines sont ubiquitinilées et dégradées par le protéasome (Figure 4). Le peptide résultant est transféré dans le RE par un transporteur associé au traitement de l'antigène, TAP (Transporter associated with Antigen Processing). Toutefois, une fois dans le RE, le peptide a encore besoin de modification avant d'être associé avec le CMH de classe I. Une amino-peptidase du RE (ERAAP) a été identifiée comme utile pour ce processus. Deux études récentes ont démontré que ERAAP est nécessaire à la génération d'un répertoire normal de peptides pour le CMH de classe I (Serwold, Gonzalez et al. 2002; Hammer, Gonzalez et al. 2006). Cette enzyme dont l'expression est répandue et induite par l'IFN $\gamma$  (Serwold, Gonzalez et al. 2002), coupe le peptide à la bonne longueur pour son accouplement avec la molécule de CMH de classe I. Son absence diminue l'expression de la molécule de CMH de classe I en surface (Serwold, Gonzalez et al. 2002; Hammer, Gonzalez et al. 2006). Il a récemment été démontré par la même équipe que curieusement son absence augmentait aussi l'immunogénicité des complexes CMH de classe I-peptide (Hammer, Gonzalez et al. 2007). Après ce traitement, le peptide est associé à une molécule de CMH de classe I sous le contrôle

de molécules chaperonnes (incluant la tapasine, la calnexine, la calréticuline) (Cresswell, Bangia et al. 1999). Une fois formé, le complexe CMH de classe I-peptide est rapidement transféré vers la membrane plasmique via l'appareil de Golgi.

- Voie exogène : présentation croisée

Toutefois le travail de M.Bevan démontrait qu'*in vivo*, la génération d'une réponse CTL (lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés) avait lieu lorsque les antigènes exogènes étaient présentés en association avec le CMH de classe I (phénomène appelé alors activation croisée) (Bevan 1976). De récentes études sur les DC et autres APC ont prouvé que les antigènes exogènes internalisés pouvaient aussi être présentés par le CMH de classe I (phénomène rebaptisé : la présentation croisée) (Banchereau, Briere et al. 2000) (Figure 4). Ce processus permet l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par des DC ayant phagocyté des cellules apoptotiques (Albert, Sauter et al. 1998). Cela permet l'induction d'une réponse anti-tumorale et anti-virale (Berard, Blanco et al. 2000).

- Lors de la présentation croisée, deux façons d'associer le peptide avec le CMH de classe I ont été décrites : via le RE ou via la voie d'endocytose (Yewdell, Norbury et al. 1999). Le modèle d'association via le RE implique la translocation de l'antigène des endosomes vers le cytoplasme, puis une dégradation de celui-ci par le protéasome. Ce mode d'association requiert la présence de TAP et est sensible aux inhibiteurs du protéasome (Guermonprez, Valladeau et al. 2002).

- De récentes observations ont démontré un recrutement possible de RE lors de la formation des phagosomes permettant l'incorporation de la machinerie nécessaire à l'association du CMH de classe I avec un peptide (Guermonprez, Saveanu et al. 2003; Houde, Bertholet et al. 2003). Cette association dans les endosomes est indépendante de TAP, mais elle est sensible aux inhibiteurs des fonctions lysosomales (Banchereau, Briere et al. 2000).

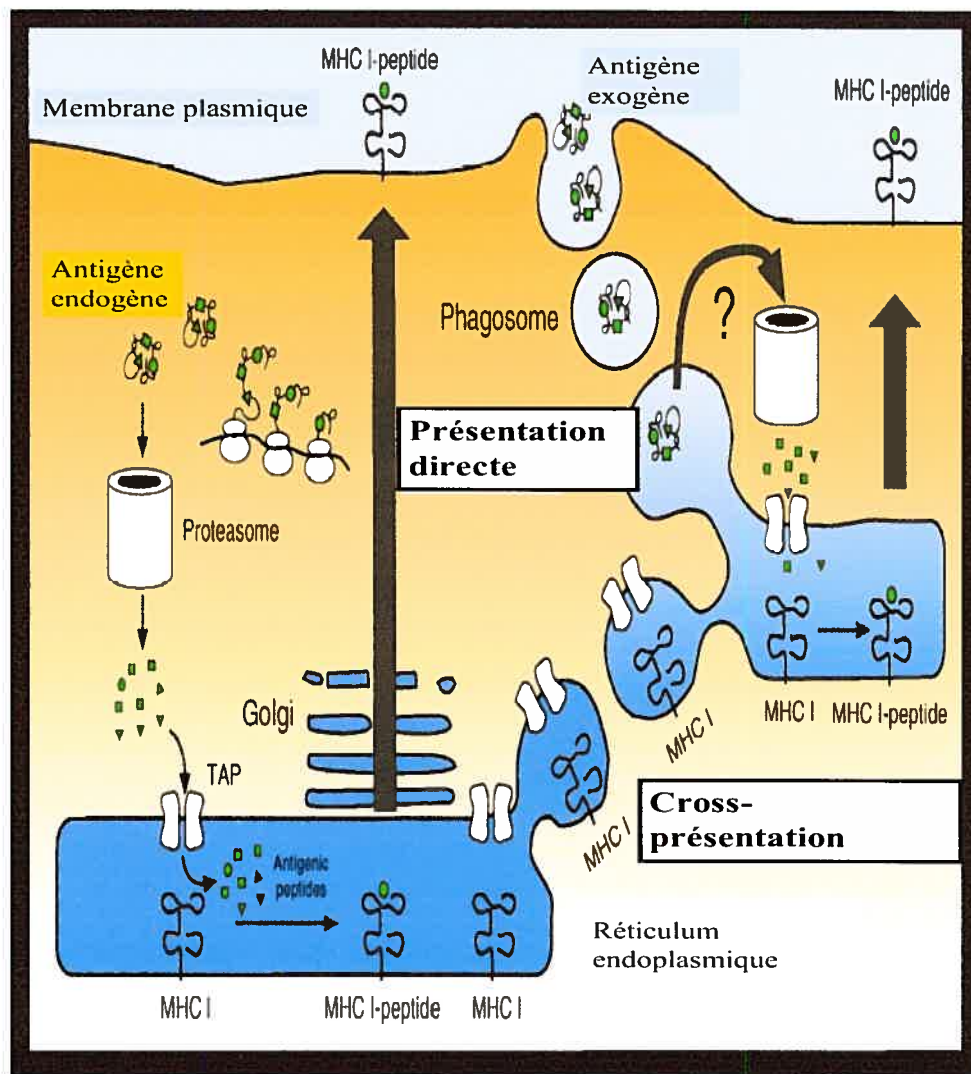


Figure 4 : La présentation via le CMH de classe I.

La voie endogène de présentation du CMH de classe I (ou voie directe) implique la dégradation d'antigènes endogènes (synthétisés par la cellule) par le protéasome en peptides, qui sont transportés par le complexe TAP dans le RE pour être associés aux nouvelles molécules de CMH de classe I. Ces complexes sont alors transportés à travers le golgi jusqu'à la surface cellulaire. De nouvelles évidences démontrent que le processus de présentation croisée implique la fusion de RE avec les phagosomes précoces pour former de nouvelles organelles requises pour la machinerie du CMH de classe I. Les antigènes phagocytés peuvent aussi être transportés hors des phagosomes pour être dégradés par le protéasome. Les peptides sont alors réimportés dans les phagosomes à l'aide de TAP et associés soit aux molécules de CMH de classe I nouvellement formées ou soit aux molécules de CMH de classe I recyclées.

(D'après (Guernonprez, Valladeau et al. 2002).

La raison pour laquelle une APC présente l'antigène exogène via le CMH de classe II ou de classe I reste obscure. Dernièrement l'équipe de Kurts *et al.* démontre que l'APC utilise une voie d'endocytose distincte selon si l'antigène sera présenté aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (Burgdorf, Kautz et al. 2007). Il semblerait que les récepteurs au mannose soient responsables de la présentation croisée. Leur absence cause une délétion de la présentation aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et non celle aux CD4<sup>+</sup> (Burgdorf, Kautz et al. 2007).

#### 1.3.3.3. La présentation via CD1

Les cellules dendritiques expriment également un autre type de molécules du CMH impliqué dans la présentation d'antigènes lipidiques aux lymphocytes T: les molécules CD1. Ces molécules sont apparentées aux molécules de classe I. Chez l'homme, cinq gènes codant pour ces molécules de classe I non classiques sont connus : CD1a, b, c, d, e. Les molécules CD1 sont principalement exprimées à la surface des CPA comme les DC, les macrophages et les lymphocytes B (Roark, Park et al. 1998 ).

La molécule CD1d est aussi exprimée à la surface des thymocytes corticaux, expression nécessaire au développement des cellules NKT (Bendelac 1995). Elle est aussi présente à la surface des cellules de Kupffer et les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques où se trouvent une grande concentration de cellules NKT chez la souris (Geissmann, Cameron et al. 2005). Les hépatocytes expriment CD1d de manière constitutive chez la souris et après la maladie chez l'homme (de Lalla, Galli et al. 2004).

Les molécules CD1 s'assemblent avec la  $\beta$ 2-microglobuline dans le RE à l'aide des molécules chaperonnes (les mêmes que celles utilisées pour les molécules de classe I) (Sugita, Porcelli et al. 1997; Huttinger, Staffler et al. 1999; Kang and Cresswell 2002).

Les transformations des lipides qui lient ces molécules sont encore mal élucidées. Par exemple, il a été démontré que la galactose disaccharide synthétique est nécessaire à la dégradation partiel de  $\alpha$ -Gal-Cer dans les endosomes tardifs lors de sa liaison avec CD1d (Prigozy, Naidenko et al. 2001).

Les molécules CD1a, b, c, e présentent des antigènes glycolipidiques aussi bien d'origine endogène qu'exogène. Elles permettent de stimuler des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> ou  $\gamma\delta$ . L'association CD1-antigène se fait principalement dans les compartiments de la voie d'endocytose. Chaque molécule est impliquée dans la surveillance d'un compartiment endosomal spécifique : CD1a pour les endosomes précoces et de recyclage (Sugita, Grant et al. 1999), CD1b pour les lysosomes, et CD1c vraisemblablement pour tous les compartiments (Sugita, van Der Wel et al. 2000). L'association CD1b et CD1c avec l'antigène peut également se faire directement à la surface de la DC (Briken, Jackman et al. 2000; Guermonprez, Valladeau et al. 2002).

La molécule CD1d s'associe avec un antigène synthétique, l' $\alpha$ -galactosyl-céramide, et active une sous population de lymphocytes particuliers, les lymphocytes T NK. D'autres lymphocytes T reconnaissent également les molécules CD1d, complexées à des lipides endogènes dans le réticulum endoplasmique (Guermonprez, Valladeau et al. 2002).

Le dernier isoforme CD1, la molécule CD1e n'est pas exprimée à la surface des cellules. Elle s'accumule dans l'appareil de Golgi et est relocalisée dans les endosomes tardifs au cours de la maturation des DC. La fonction de la molécule CD1e reste à déterminer (Guermonprez, Valladeau et al. 2002).

#### 1.4. La maturation

La maturation est un processus initié dans la périphérie après un contact avec l'antigène et/ou les cytokines inflammatoires et qui finit durant l'interaction avec les lymphocytes. Elle entraîne un changement phénotypique d'où découlent des modifications fonctionnelles. Les DC matures deviennent alors une CPA capable de générer efficacement une réponse immunitaire primaire ou secondaire. Pour cela, elles perdent l'expression des molécules responsables de la capture et de l'apprêtement de l'antigène et acquièrent celles permettant la stimulation des lymphocytes. Cette dernière étape nécessite le concours du processus de migration

pour permettre aux cellules de quitter le tissu et d'atteindre les lymphocytes dans le ganglion (Banchereau, Briere et al. 2000).

#### 1.4.1. Changements de phénotype

Les DC produisent et répondent aux chémokines inflammatoires comme le MIP-1 $\alpha$  et le MIP-1 $\beta$ , les RANTES et le MIP-3 $\alpha$ . Les DC immatures expriment les récepteurs de ces chémokines (CCR1, CCR5, CCR6). Ces chémokines sont relâchées dans le tissu enflammé où elles exercent deux rôles. Premièrement, d'une manière autocrine, elles entraînent la diminution de leur récepteur par un processus d'endocytose, permettant aux DC de quitter la périphérie. Deuxièmement, d'une façon paracrine, les chémokines inflammatoires relâchées par les DC crée le gradient attracteur permettant le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires sur le site, soutenant ainsi la réponse (Sallusto, Palermo et al. 1999). Certains médiateurs de l'inflammation comme la PGE<sub>2</sub> augmentent l'expression du récepteur CCR7. Il permet aux DC d'atteindre le ganglion en suivant le gradient de la chémokine ELC. Une fois la zone T du ganglion atteint, les DC matures sécrètent aussi des chémokines lymphoïdes comme ELC et SLC. Ces chémokines facilitent l'interaction avec les lymphocytes T naïfs ou mémoires qui expriment CCR7 en les attirant vers la cellule sécrétrice (Sallusto and Lanzavecchia 2000) (Figure 5).

La maturation des DC s'accompagne d'une augmentation de l'expression des molécules telles que LFA-1, LFA-3, ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-3. Elles ont deux rôles. Elles permettent aux DC d'extravaser et de quitter le site d'inflammation par les vaisseaux de lymphe afférents. Elles sont aussi responsables d'une meilleure interaction avec les lymphocytes présents dans les ganglions (Baggiolini 1998).

Les DC matures sont caractérisées par une forte expression des molécules du CMH impliquées dans la présentation antigénique aux lymphocytes T. Le signal de maturation induit une modification coordonnée de la néosynthèse et de l'expression à la surface des complexes CMH-peptide. Non seulement la synthèse des molécules de CMH de classe II est augmentée, mais leur demi-vie aussi (Fiebigger, Meraner et al. 2001). La maturation entraîne aussi un changement de l'activité protéique des cathepsines dans les endosomes. La quantité de cystatine C présente dans les

vésicules diminue, d'où la levée de l'inhibition des cathepsines (Pierre and Mellman 1998). Il en résulte un plus grand nombre de peptides libérés et de molécules de CMH de classe II disponibles en même temps. Par conséquent, les complexes CMH de classe II-peptide sont rapidement formés (Inaba, Turley et al. 2000) et transportés par les vésicules endosomales vers la surface (Pierre, Turley et al. 1997).

La maturation est aussi caractérisée par l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (entre autres CD80 et CD86). La combinaison des molécules de co-stimulation et du CMH permet l'activation complète des lymphocytes.

D'autres molécules sont utilisées pour l'identification des DC matures. La molécule DC-LAMP est associée à la membrane des lysosomes et est exprimée sur les DC matures localisées au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Il y a aussi CD83 dont le rôle est encore mal défini. Elle serait impliquée dans des interactions avec les lymphocytes T (Lechmann, Krooshoop et al. 2001) surtout avec les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Hirano, Butler et al. 2005).



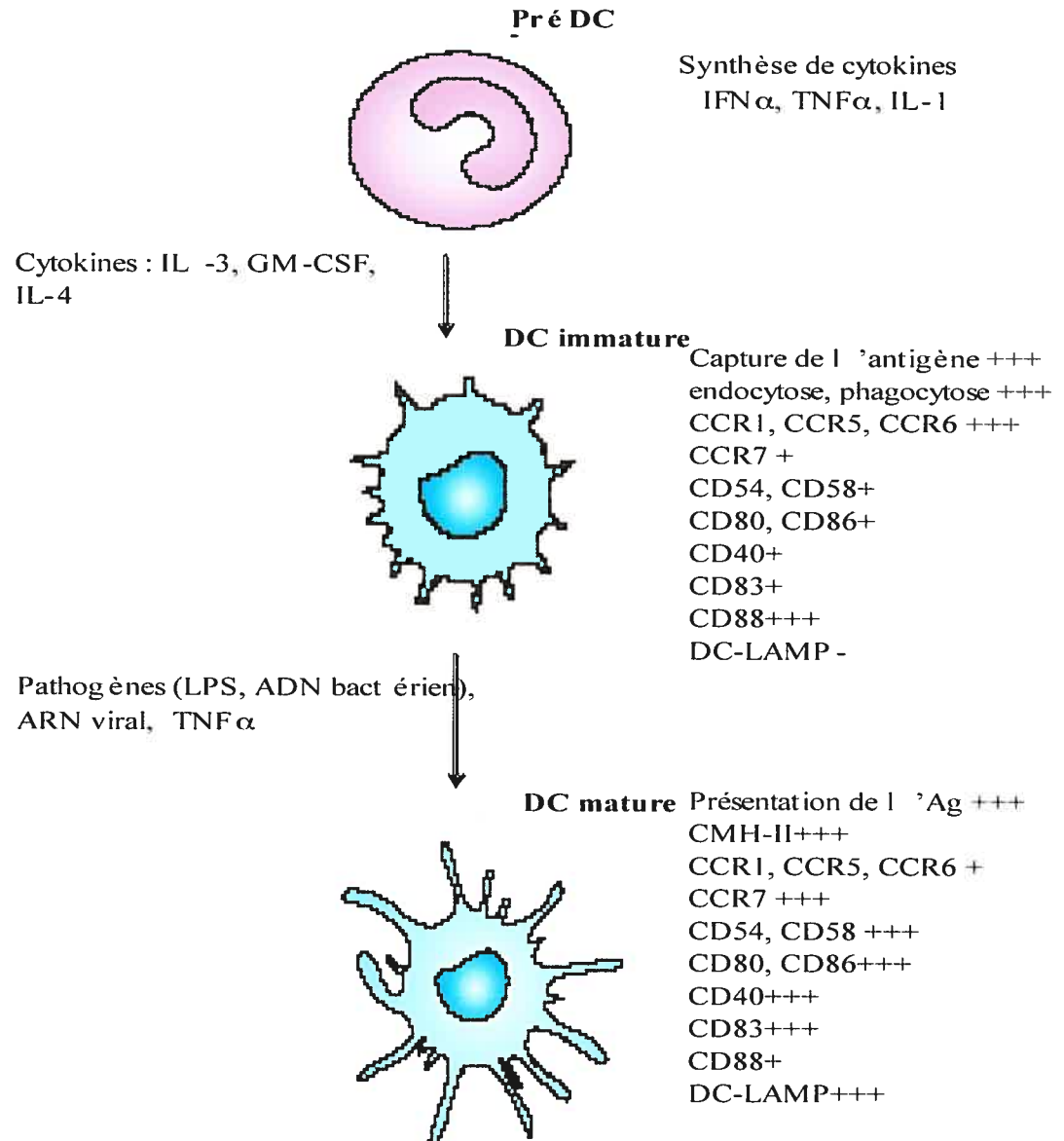


Figure 5 : Les modifications des DC matures.

La partie gauche du schéma montre les facteurs permettant le passage d'un stade à un autre. La partie droite explique les propriétés-clé associées à chaque stade. Les pré-DC produisent des cytokines en réponse à l'antigène. Cette sécrétion entraîne la différenciation en DC immature mais aussi le recrutement de nouvelles cellules sur le site d'inflammation. Les DC immatures sont des cellules spécialisées dans la capture de l'antigène et dans son conditionnement. Suite à l'ingestion de l'antigène et à la présence de signaux pro-inflammatoires les DC mûrissent. À ce stade, les DC perdent la capacité de capturer l'antigène et acquièrent celle de stimuler les effecteurs de la réponse immunitaire. (D'après Banchereau *et al.*, 2000).

#### 1.4.2. Les signaux du danger

La maturation des DC est induite par la détection d'un signal de danger. Celui-ci est composé du mélange de molécules issues de l'inflammation avec un élément étranger. Ces signaux peuvent être d'origine endogène ou exogène : endogènes quand les cellules de l'organisme meurent par nécrose, et libèrent des constituants intracellulaires qui sont phagocytés ; exogènes, lorsqu'ils sont exprimés à la surface des pathogènes. Ils sont alors appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns).

##### 1.4.2.1. Les cytokines et les médiateurs de l'inflammation

Il est déjà bien établi que l'antigène et les molécules de co-stimulation sont nécessaires à la bonne activation des DC. Maintenant il devient de plus en plus évident que les cytokines ont aussi un grand rôle à jouer sur la différenciation des DC.

Des molécules comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , la prostaglandine (PGE<sub>2</sub>) sont sécrétées en périphérie par les cellules immunitaires déjà présentes. Leur présence signifie la présence d'un danger aux DC (Kalinski, Hilkens et al. 1999; Guermonprez, Valladeau et al. 2002). Suite à la stimulation par ces molécules, les DC entament leur maturation. D'ailleurs ces médiateurs sont utilisés pour induire la maturation des DC *in vitro*.

Les cytokines sécrétées lors de l'interaction avec les lymphocytes sont aussi responsables de la maturation des DC. Nous reparlerons de ce cas un peu plus tard dans le texte.

##### 1.4.2.2. La mort cellulaire par nécrose

Lors de la nécrose, le contenu cytoplasmique de la cellule est déversé dans le milieu extracellulaire. La libération des constituants intracellulaires est ressentie comme un danger. La nature des composants qui initient la maturation des DC n'est pas encore très bien connue. Il a été démontré que l'ATP et l'UTP peuvent activer les DC via les récepteurs purinergiques (Gallucci and Matzinger 2001). Les HSP,

relâchées lors de la nécrose sont aussi capables d'induire la maturation des DC (Kol, Lichtman et al. 2000; Geissmann, Launay et al. 2001; De Trez, Pajak et al. 2005).

#### 1.4.2.3. Les PAMPs.

Les PAMPs sont des motifs conservés présents chez les microorganismes dont la reconnaissance induit une réaction immunitaire. La reconnaissance des PAMP s'effectue au travers de récepteurs spécifiques, appelés PRR (Pattern Recognition Receptor). Ces derniers sont principalement exprimés par les cellules qui sont les premières à rencontrer les pathogènes durant une infection comme les cellules NK, les basophiles, les mastocytes, les macrophages et les DC. Six familles de protéines composent les différents PRR (Medzhitov and Janeway 1997) : les lectines de type C (les collectines, les récepteurs « scavenger », les pentraxines, les transférases de lipides telles que la LBP (LPS Binding Protein)), les intégrines et les protéines avec des régions riches en leucine telles que les homologues des Toll qui ont récemment été identifiés chez les mammifères : les TLR (Toll Like Receptor). D'un point de vue fonctionnel, ces PRR peuvent être divisés en trois classes : les PRR sécrétés, les PRR d'endocytose et les PRR de signalisation (Medzhitov and Janeway 2000).

#### Les TLR

Grâce à leur profil d'expression et leur spécificité de PAMP, les TLR constituent la famille la plus étudiée des PRR. Celle-ci compte 9 membres chez l'humain, dont beaucoup sont exprimés par les DC immatures (Kaisho and Akira 2003; Iwasaki and Medzhitov 2004).

- Leurs ligands

Chaque TLR possède un ligand spécifique. Ils peuvent se regrouper en deux familles : ceux qui reconnaissent les composés bactériens (TLR1, 2, 4, 5, 6, 9) et ceux qui lient les composés viraux (TLR3, 7, 8). Effectivement le TLR2 reconnaît les peptidoglycanes présents sur les bactéries Gram-positives et Gram-négatives alors que le TLR4 lie le LPS. Quant au TLR9, son ligand est le motif CpG non méthylé caractéristique de l'ADN bactérien. Le TLR5 lie la flagelline. L'ARN double brin des

virus est reconnu par le TLR3 alors que l'ARN simple brin des virus lie le TLR7 (Medzhitov and Janeway 1997; Janeway and Medzhitov 2002).

- Leur profil d'expression

Chez l'humain, les pDC fraîchement isolées expriment les TLR7 et TLR9. En revanche les DC myéloïdes CD11c<sup>+</sup> expriment les TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR8 et TLR10 (Jarrossay, Napolitani et al. 2001; Kadowaki, Ho et al. 2001; Hornung, Rothenfusser et al. 2002). La raison d'être de ce profil d'expression n'est pas encore très claire. Les DC dérivées des monocytes sont les seules DC exprimant le TLR4.

- Leur localisation

Certains TLR sont exprimés à la membrane (TLR1, 2, 4, 5, 6) alors que d'autres se localisent dans les endosomes (TLR3, 7, 8, 9). Ces derniers sont probablement activés après la capture et l'internalisation du pathogène.

- Leur fonction

L'engagement des TLR par leurs ligands induit une cascade de signaux intracellulaires. Il existe deux voies de signalisation : celle qui implique la molécule adaptatrice MyD88 et celle où MyD88 n'intervient pas. La cascade de signaux intracellulaires aboutit à l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein) et par conséquent à la transcription de nombreux gènes. Ainsi l'engagement des TLR induit la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 (Kopp and Medzhitov 2003) ainsi que de MIP-1 $\beta$  et des RANTES. La diminution de l'expression des récepteurs des chémokines inflammatoires (CCR1 et CCR5) et l'augmentation de l'expression de CCR7 (responsable de la migration et de l'entrée des cellules dans les ganglions lymphatiques) découlent aussi de la liaison des ligands des TLR sur leurs récepteurs. L'activation de la voie NF- $\kappa$ B suite à l'engagement des TLR conduit aussi à la surexpression des molécules de co-stimulation et du CMH (Kapsenberg 2003).

En plus de ces effets, il est clair maintenant que l'engagement des TLR modifie également le système vacuolaire, l'organisation du cytosquelette mais aussi

la synthèse et la dégradation des protéines. La phagocytose est augmentée suite à la stimulation des DC via les TLR (West, Wallin et al. 2004). Le changement au niveau de la synthèse protéique a d'abord été observé par des études génomiques (Hashimoto, Suzuki et al. 2000; Granucci, Vizzardelli et al. 2001). Mais il a aussi été décrit pour par exemple les protéines du CMH de classe I (Rescigno, Citterio et al. 1998).

#### 1.4.3. L'interaction avec les lymphocytes T

L'interaction des DC avec les lymphocytes T conduit à une activation réciproque des deux cellules. Plusieurs types de molécules ainsi que des chémokines et des cytokines sont mis en jeu. Trois signaux sont requis pour l'activation des lymphocytes : le signal 1 est composé de l'interaction du TCR avec le CMH (détection de l'antigène) ; le signal 2 lui comprend la liaison des molécules de co-stimulation ; et le signal 3 est donné par les cytokines et les chémokines présentes dans le milieu. Il en est de même pour l'activation des DC. La rencontre avec l'antigène constitue le signal 1, ensuite l'interaction avec les lymphocytes T engage les molécules de co-stimulation (signal 2) et finalement les DC répondent aussi aux cytokines présentes dans le milieu (signal 3). Dans ce paragraphe, nous parlerons plutôt des effets sur la différenciation des DC. Les conséquences sur les partenaires des DC seront cités dans les paragraphes suivant (comme : l'activation des lymphocytes...)

La rencontre avec les lymphocytes permet l'engagement de molécules de surface tel que le CMH-TCR et CD80/CD86-CD28, mais aussi l'engagement de CD40 par son ligand CD40L (Banchereau and Steinman 1998). L'interaction de CD40 avec son ligand termine l'activation des DC (Caux, Massacrier et al. 1994) en augmentant l'expression des molécules de co-stimulation (Cella, Scheidegger et al. 1996; Koch, Stanzl et al. 1996), mais aussi en induisant la sécrétion de cytokines (Gately, Renzetti et al. 1998). De plus, cette interaction de CD40L présent sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD40 exprimé par les DC, prépare les DC pour qu'elles puissent activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Mais les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont eux aussi capables de stimuler les DC via CD40L. Toutefois, cette interaction en absence des lymphocytes

T CD4<sup>+</sup> n'induit pas une réponse immunitaire complète. Effectivement comme nous le verrons plus tard, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont nécessaires pour la génération de la réponse mémoire des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

Lors de leur interaction avec les DC, les lymphocytes T sécrètent des cytokines qui sont nécessaires pour la maturation des celles-ci. Une des plus importantes et plus étudiées est l'IFN $\gamma$ . Cette cytokine est produite par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activées mais aussi par les cellules NK. Il est démontré que la culture de DC immatures en présence de cellules NK (à faible ratio) activées conduit à la sécrétion de cytokines par les DC (Piccioli, Sbrana et al. 2002). Effectivement, une fois activées les cellules NK produisent du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  qui sont des agents de maturation pour les DC. En plus de ces cytokines, le contact entre les deux cellules est nécessaire (Piccioli, Sbrana et al. 2002). L'activation des DC par ces cytokines semble dépendre de l'engagement de la molécule NKp30 exprimée par les cellules NK. Son action serait contre-carrée par les molécules KIR (killer cell inhibitory receptor) et NKG2a, également exprimées par les cellules NK (Vitale, Della Chiesa et al. 2005). Un autre mécanisme a également été proposé. L'engagement du récepteur TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) sur les DC par des cellules NK activées par de l'IL-2 induit l'augmentation de l'expression de CD86 par les DC (Terme, Tomasello et al. 2004).

Si une culture avec un faible ratio de NK et de DC (1:5) induit la maturation des DC, un ratio élevé (5:1) entraîne l'élimination des DC immatures (Carbone, Terrazzano et al. 1999; Wilson, Heffler et al. 1999; Spaggiari, Carosio et al. 2001; Ferlazzo, Tsang et al. 2002; Piccioli, Sbrana et al. 2002)

### 1.5. Les cellules dendritiques matures

La première fonction reconnue des DC matures est d'initier la réponse immunitaire. L'activation complète des lymphocytes s'effectue à l'aide de trois signaux fournis par les DC matures. Le premier signal (signal 1) est fourni par l'interaction du CMH de classe II-peptide avec le TCR. Le deuxième signal (signal 2) est conduit par l'engagement des molécules de co-stimulation par leurs ligands. Quant au signal 3, il est constitué en partie de la relâche de cytokines et est responsable de la

polarisation de la réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et donc de diriger la réponse immunitaire Th1 ou Th2. Des interactions intercellulaires via les molécules Notch et leurs ligands sont aussi responsables de la polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Amsen, Blander et al. 2004). Ce phénomène serait aussi régulé par une boucle de contrôle négative sur les DC exercée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> matures (Rissoan, Soumelis et al. 1999).

L'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peut être dépendante ou non des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Effectivement, les DC sont capables d'activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sans l'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Toutefois, il semble que la réponse primaire initiée sans l'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ne semble pas suffisante pour la génération d'une réponse mémoire CD8 (Shedlock and Shen 2003). Il existe deux modèles qui illustrent l'interaction entre les trois acteurs (Creusot and Mitchison 2004), que nous décriront plus tard dans la Figure 8.

Il en est de même pour les lymphocytes B. Leur activation s'effectue soit lors d'une interaction directe entre les DC et les lymphocytes B (Qi, Egen et al. 2006), soit lors d'un ménage à trois composé des DC, des lymphocytes B et CD4. La commutation isotypique est contrôlée par des cytokines sécrétées par les DC.

En plus de leur rôle d'activateur des lymphocytes, les DC sont capables d'interagir avec les NK. Cette communication est bidirectionnelle et s'effectue soit par contact direct soit par sécrétion de cytokines (Fernandez, Lozier et al. 1999).

#### 1.5.1. Activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Le devenir des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs est déterminé par trois signaux donnés par les DC matures. Le signal 1 stimulateur est donné par l'engagement du TCR par le complexe CMH de classe II-peptide. Ce signal détermine la spécificité de la réponse. L'initiation d'une réponse immunitaire protectrice nécessite la co-stimulation des lymphocytes. Sans ce signal 2 co-stimulateur, les lymphocytes T deviennent anergiques ce qui entraîne la tolérance. Ces deux signaux différencient les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en cellules effectrices protectrices. La direction de la réponse CD4 (Th1, Th2) est conditionnée par le signal 3. Ce signal 3 est constitué par des cytokines sécrétées par les DC, mais est aussi fonction du temps de stimulation.

Ces signaux entraînent la sécrétion d'autres cytokines spécifiques d'une réponse CD4 Th1, Th2 (Figure 6) (Strobl, Bello-Fernandez et al. 1997).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent se différencier en lymphocytes T helper 1 (Th1) et la réponse immunitaire résultante est donc à médiation cellulaire. Cette réponse est caractérisée par la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\beta$  de la part des lymphocytes (Liu, Kanzler et al. 2001).

Mais ils peuvent aussi se différencier en lymphocytes T helper 2 (Th2) et la réponse humorale est alors favorisée. Ces lymphocytes sécrètent principalement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 (Liu, Kanzler et al. 2001).

La direction de la polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est déterminée par le patron de sécrétion des cytokines des DC, qui lui dépend du sous-type de DC et du type de stimulus ainsi que des interactions intercellulaires (Figure 6).

- Origine des DC

Dans un premier temps, il a été pensé que le sous-type de DC était responsable de cette polarisation de la réponse CD4. L'équipe de Rissouan a été la première à mentionner une dichotomie de la réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en fonction de l'origine des DC (Rissoan, Soumelis et al. 1999). Elle a démontré que les DC myéloïdes génèrent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IFN $\gamma$  (Th1) alors que ceux qui sont stimulés par des pDC produisent de l'IL-4 (Th2). De plus cette étude démontre aussi l'existence d'une boucle de contrôle négative exercée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> matures. L'IL-4 serait responsable de l'induction de l'apoptose des pDC, évitant ainsi le risque de développer une réponse Th2 déviante (Rissoan, Soumelis et al. 1999). Cette hypothèse était supportée par l'observation que les DC myéloïdes, après stimulation par CD40L, sécrètent de l'IL-12, interleukine responsable de la voie Th1, alors que les pDC n'en sont pas capables. Cette subdivision fonctionnelle a donné lieu à une nouvelle nomenclature des DC. Les DC myéloïdes furent appelées DC1 (pour responsables de la voie Th1) et les pDC appelées DC2 (pour responsables de la voie Th2) (Rissoan, Soumelis et al. 1999).



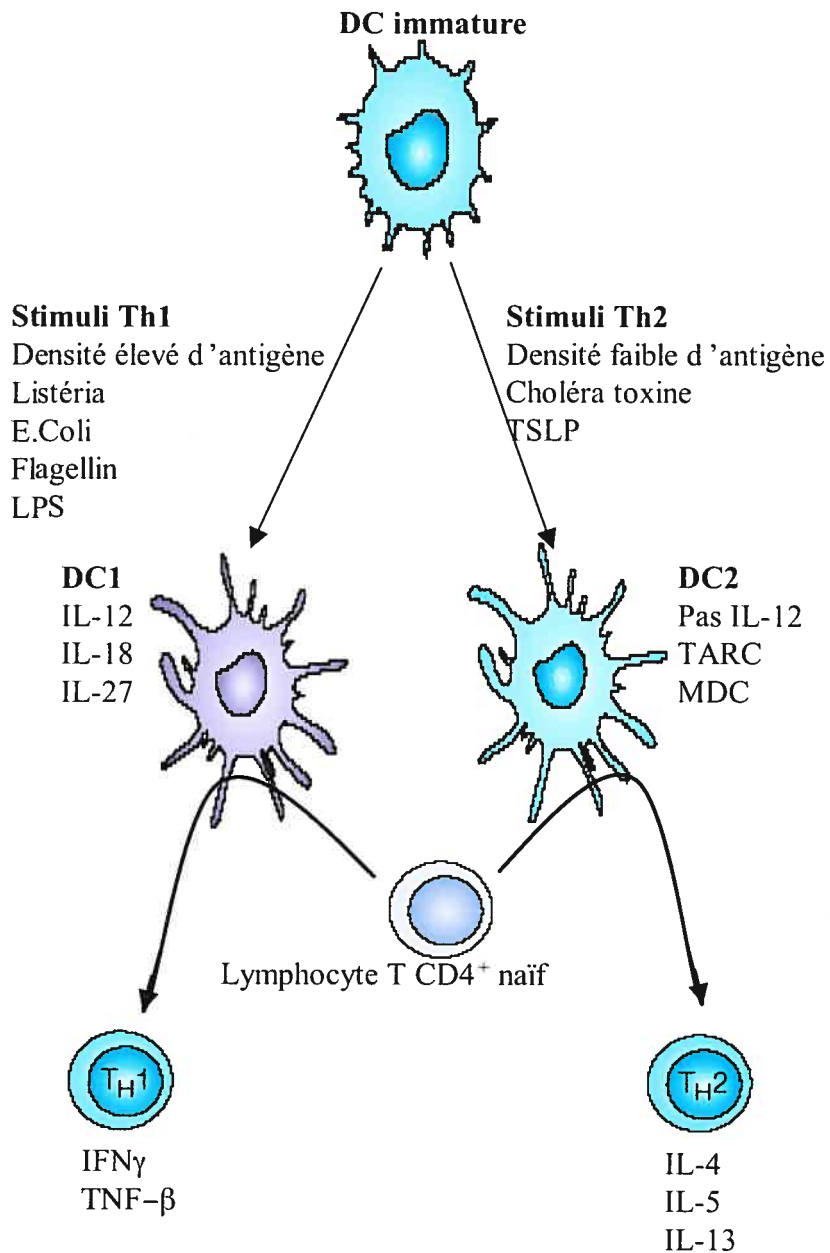


Figure 6 : Plasticité des DC.

Les DC dirigent la réponse CD4 dépendamment du type et de la quantité de stimulus. Après activation, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent se différencier en lymphocytes Th1, lesquels sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et aident la réponse CD8 ou en lymphocytes Th2, lesquels produisent de l'IL-4, l'IL-5 et de l'IL-13 et qui conduisent la réponse humorale et diminue la réponse Th1. La direction de la polarisation des lymphocytes T est déterminée par le patron de sécrétion des cytokines des DC, qui lui dépend du sous-type de DC et du type de stimulus.

(D'après O'Neill, Adams et al. 2004)

L'idée que l'origine des DC est responsable de l'orientation de la réponse T pose plusieurs problèmes. Tout d'abord, le type de réponse devrait dépendre du stimulus et non du type de DC rencontré. Deuxièmement les pDC migrent directement du sang aux organes lymphoïdes et ne sont pas reconnues comme résidentes des tissus périphériques. Les pDC sont donc absentes de l'endroit principal où se retrouve l'antigène, c'est-à-dire le lieu d'infection (Dzionek, Inagaki et al. 2002).

Troisièmement, l'IFN $\alpha$ , produit majeur des pDC, a été démontré comme induisant une réponse Th1. Finalement, la sécrétion d'IL-12 par les pDC a été rapportée plus tard (Patterson 2000). Cella *et al.* apportent de nouveaux indices démontrant que les pDC stimulent une forte réponse Th1 et suggèrent donc que les résultats de Rissoan sont dus à la « fatigue » des DC par une culture prolongée en présence d'IL-3 et de CD40L (Patterson 2000). Ensuite, le modèle a donc évolué vers une réponse dirigée par le type de stimulation et non par l'origine des DC.

- Les stimuli

Il a été démontré que la polarisation dépendait plutôt du type de stimulus. Il semble que les pathogènes intracellulaires entraînent une polarisation Th1. Il semble que la capacité à diriger une réponse vers Th1 tient à la sécrétion de l'IL-12, l'IL-18 (Nagai, Devergne et al. 2003; Kaser, Kaser et al. 2004) ou l'IL-27 (Smits, van Beelen et al. 2004; Sun, Walsh et al. 2005) par les DC. Mais il existe d'autres facteurs permettant l'initiation d'une réponse Th1, comme les IFN de type I.

En revanche certains helminthes sont responsables de la différenciation en Th2. Un prérequis pour la différenciation en Th2 semble être la diminution de la sécrétion des membres de la famille de l'IL-12. En effet, l'IL-12 peut restaurer une réponse Th1 à partir de clones Th2 (Kapsenberg 2003; de Jong, Smits et al. 2005).

Amsen *et al.* démontrent que les DC expriment différents ligands de Notch en fonction des stimuli qu'elles reçoivent. Ils démontrent que les DC qui sont en présence de stimuli qui génèrent une réponse Th1 expriment Delta alors que des DC stimulées avec des molécules responsables d'une réponse Th2 expriment Jagged. Ce papier démontre clairement que la réponse Th2 n'est pas produite par défaut ou causée par l'absence d'une réponse Th1, mais constitue une réponse en soi (Amsen, Blander et al. 2004).

- Le temps de stimulation

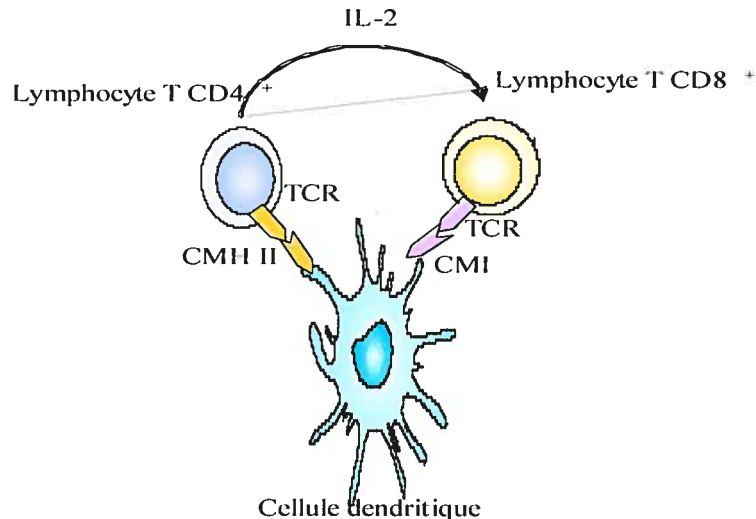
Dans une autre étude, Lanzavecchia et son équipe démontrent que le temps de stimulation des DC détermine non seulement l'étendue de l'activation des lymphocytes T mais aussi le type de réponse générée (Langenkamp, Messi et al. 2000). Dans cette étude, les auteurs soutiennent la proposition de Cella *et al.* démontrant que les DC possèdent un profil différent de sécrétion de cytokines selon le temps d'activation (Cella, Facchetti et al. 2000). Ils démontrent que la même DC selon son temps d'activation peut-être une DC1 puis une DC2. Les DC myéloïdes démontrent une stricte régulation de la sécrétion de cytokines dans le temps. Ils rapportent que 3 à 4 heures après la stimulation, les premières cytokines sécrétées sont le TNF- $\alpha$  et IL-6. L'IL-12 est produite seulement après 10 heures de stimulation et sa production cesse après 24 heures. Un second stimulus initié par l'engagement de CD40 après les 24 heures ne restaure pas la sécrétion d'IL-12. Les DC sont alors considérées comme fatiguées («*exhausted*») et génèrent alors une réponse Th2 (cellules produisant de l'IL-4) et une réponse mémoire. En revanche après 8 heures de stimulation les DC sont considérées comme actives ce qui coïncide avec leur capacité à stimuler les cellules naïves en cellules effectrices Th1 (Cella, Facchetti et al. 2000).

### 1.5.2. Activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

L'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peut avoir lieu soit en présence des DC seules soit lors d'un « ménage à trois » avec les DC et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ce modèle permet l'activation des DC nécessaire à l'activation totale des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Deux modèles d'interaction se dégagent (Figure 7).

Un premier modèle, appelé passif propose que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> interagissent en même temps sur la même APC. Ainsi le lymphocyte T CD8<sup>+</sup> reçoit un signal via la reconnaissance du CMH de classe I-peptide et l'IL-2 nécessaire à son activation (Lanzavecchia 1998). Toutefois, il semblerait que l'éventualité que deux lymphocytes spécifiques pour le même antigène puissent interagir en même temps sur la même APC soit très faible.

### A) Ménagement à trois



### B) Interaction séquentielle

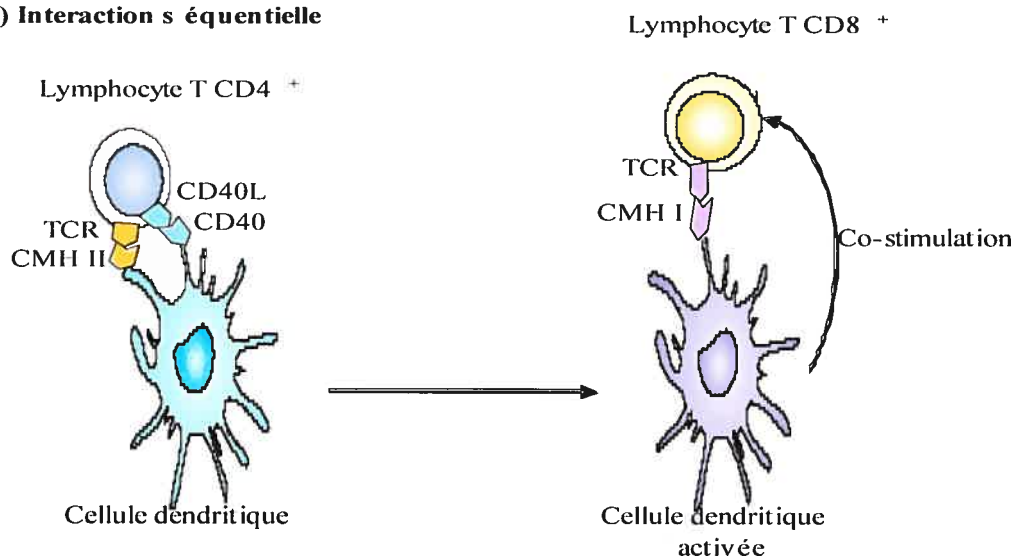


Figure 7 : Modèles du «ménage à trois».

A) Le modèle "passif" dans lequel les DC présentent l'antigène à la fois aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Mais l'IL-2 produite par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> permet la génération de la réponse mémoire (Williams, Tyznik et al. 2006). B) Un modèle dynamique d'interaction, où les DC offrent le signal de co-stimulation aux deux types de lymphocytes. Dans un premier temps, elles sont activées par leur interaction avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> via l'engagement de CD40L-CD40. Puis elles sont activées pour délivrer le signal aux lymphocytes T CD8. (D'après Lanzavecchia 1998).

Malgré cette faible possibilité, ce ménage à trois existe. Peu de temps après une infection, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> expriment le récepteur CCR5, qui lie les chémokines CCL3 et CCL4. Celles-ci forment un gradient qui conduit les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> aux sites d'interaction des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avec les DC (Castellino, Huang et al. 2006).

Un autre modèle appelé séquentiel fut proposé. La DC est habilitée à activer le lymphocyte T CD8<sup>+</sup> après avoir interagi avec un lymphocyte T CD4<sup>+</sup>. Cette habilitation s'accomplit via l'interaction de CD40-CD40L (Bennett, Carbone et al. 1998; Schoenberger, Toes et al. 1998). Cet engagement de CD40 finalise l'activation des DC en leur conférant la capacité d'activer pleinement les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Ridge, Di Rosa et al. 1998).

Il a été démontré qu'une réponse CD8 pouvait être générée en absence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Toutefois, la mémoire CD8 ne pourra pas s'installer. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires ne persisteront pas et ne seront pas capables de contenir une nouvelle re-infection (Janssen, Lemmens et al. 2003; Shedlock and Shen 2003; Sun and Bevan 2003). En fait, la présence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> nécessaire à l'établissement de la mémoire CD8 est surtout vitale lors du premier contact des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> avec l'antigène (Sun, Williams et al. 2004). De même, si l'action des chémokines CCL3 et CCL4 est bloquée lors de la première réaction, l'établissement de cette réponse mémoire CD8 est diminuée (Castellino, Huang et al. 2006). La nécessité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peut être expliquée par la nécessité de la présence de l'IL-2 lors de l'activation primaire pour permettre la génération de la réponse mémoire (Williams, Tyznik et al. 2006).

### 1.5.3. Activation des lymphocytes B

Les lymphocytes B peuvent être activés d'une manière dépendante des lymphocytes T ou indépendamment de ceux-ci. Le rôle des DC dans l'activation des lymphocytes B et dans le changement de classe isotypique des Ig a été démontré à l'aide d'expériences de transferts de DC présentant l'antigène (Wykes, Pombo et al. 1998; Qi, Egen et al. 2006; Lucas, Schachterle et al. 2007). Ces expériences ainsi que des études *in vitro* ont démontré que l'interaction DC-lymphocyte B conduisait à la

la survie des lymphocytes B. Le mécanisme d'action implique l'engagement des récepteurs TNFR (Do, Hatada et al. 2000; Litinskiy, Nardelli et al. 2002) ou l'action de cytokines (Balazs, Martin et al. 2002). De plus, les DC permettent aux lymphocytes B d'avoir accès aux antigènes et maintiennent un pool d'antigènes intracellulaires non dégradés qui peuvent être recyclés vers la surface cellulaire (Wykes, Pombo et al. 1998).

Il a été démontré que l'interaction des DC avec les lymphocytes B *in vitro* conduit à l'augmentation du calcium intracellulaire et à l'augmentation de l'expression de CD86 chez les lymphocytes B. Ce phénomène est dépendant de l'interaction directe avec les DC démontrant clairement que les lymphocytes B peuvent être stimulés par les DC. Cependant le lieu de l'interaction pose problème puisque les DC résident dans les zones T des ganglions. En fait, l'interaction a lieu au niveau des veinules endothéliales, endroit où les lymphocytes B naïfs immigrants peuvent être en contact avec les DC immigrantes (Qi, Egen et al. 2006).

#### 1.5.4. Interaction avec les NK

Les cellules NK ont été en premier lieu décrites comme étant les premières lignes de défense ne nécessitant pas d'activation antigène spécifique. Toutefois, cela n'est pas vrai. En 1999, Fernandez *et al.* démontrent que l'injection de DC arborant le CMH de classe I de cellules tumorales induit l'activation des cellules NK *in vivo* (Fernandez, Lozier et al. 1999). Mais l'interaction DC-NK ne conduit pas seulement à l'activation des NK mais aussi à celle des DC. Il existe donc une régulation mutuelle (Gerosa, Baldani-Guerra et al. 2002; Degli-Esposti and Smyth 2005).

Les cytokines sécrétées par les DC matures activent les cellules NK. L'IL-12 augmente la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  par les cellules NK (Borg, Jalil et al. 2004). Sa combinaison avec de l'IL-18 augmente non seulement la production d'IFN- $\gamma$  mais aussi la cytotoxicité des cellules NK (Yu, Hagihara et al. 2001). L'IL-15 est aussi une cytokine très importante pour les cellules NK. Les DC sont capables de stimuler les NK via l'IL-15 mais à l'aide de l'IL-15R $\alpha$  exprimé à leur surface. Les DC présentent donc l'IL-15 *en trans* aux cellules NK (Lucas, Schachterle et al. 2007). Cette

stimulation stimule la cytotoxicité et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Koka, Burkett et al. 2004; Lucas, Schachterle et al. 2007).

Les cellules NK activées par des cellules tumorales ou des cellules infectées activent la sécrétion d'IL-12 chez les DC, induisant ainsi une réponse Th1 (Mailliard, Son et al. 2003; Mocikat, Braumuller et al. 2003).

La présence des cytokines ne suffit pas pour l'induction de l'activation totale des cellules NK. Il y a aussi besoin de contact cellule-cellule entre les DC et les NK, comme sous-entendu par Fernandez *et al.* (Fernandez, Lozier et al. 1999). Effectivement, l'activation des cellules NK requiert la formation d'une synapse avec les DC pour être totalement activées (Borg, Jalil et al. 2004). La formation de cette synapse forme un lien étroit entre les deux cellules et permet ainsi la concentration des cytokines. Récemment Lucas *et al.* démontrent que l'activation initiale des cellules NK nécessite la présence de DC CD11c<sup>+</sup> (Lucas, Schachterle et al. 2007). Cette interaction est utile pour l'induction des fonctions effectrices des cellules NK.

Toutefois il est démontré que les cellules NK activées peuvent tuer les DC immatures mais pas les DC matures notamment à travers la signalisation induite par le récepteur NKgp130 (Carbone, Terrazzano et al. 1999; Wilson, Heffler et al. 1999; Spaggiari, Carosio et al. 2001; Ferlazzo, Tsang et al. 2002). Nous reviendrons sur ce point plus tard au cours de l'introduction.

## 1.6. Le maintien de la tolérance

Un des atouts importants du système immunitaire est de pouvoir faire la différence entre le soi et le non soi. Cela est possible grâce à la tolérance centrale qui prend place dans le thymus au moment du développement des lymphocytes T et à la tolérance périphérique qui a lieu dans les ganglions par l'induction de l'anergie ou la délétion des cellules autoréactives matures (Steinman, Hawiger et al. 2003).

### 1.6.1. La tolérance centrale

La tolérance centrale prend place dans le thymus. Avant que les thymocytes ne murent pleinement, une interaction avec les antigènes du soi dont la liaison serait trop forte aboutit à l'élimination de ces cellules. Ce processus est référé comme la

sélection négative en opposition à la sélection positive, où le développement de thymocytes dont le TCR présente une faible affinité pour l'antigène du soi est sélectionné (Volkman, Zal et al. 1997). Les DC thymiques sont impliquées dans la sélection négative des thymocytes, ceci fut démontré par des expériences de reconstitution de thymus fœtal (Anderson G 1998). Pendant longtemps il a été supposé que certains antigènes spécifiques d'un tissu (TSA) n'avaient pas accès au thymus et que la tolérance périphérique était responsable de la délétion des cellules autoréactives. Cependant il a été démontré récemment que les TSA étaient exprimés dans le thymus par les cellules épithéliales thymiques corticales (TCE). Cette présence est possible grâce à l'action du régulateur transcriptionnel AIRE (Liston, Lesage et al. 2003). Ce facteur est très faiblement exprimé dans les DC thymiques (Anderson, Venanzi et al. 2002; Kogawa, Nagafuchi et al. 2002; Anderson, Venanzi et al. 2005). De plus, les TCE sont de faibles CPA et seulement quelques TCE expriment un TSA donné. Pour une bonne délétion des cellules auto-réactives, les DC thymiques cross-présentent les TSA (Gallegos and Bevan 2004). Il a aussi été démontré que certaines DC peuvent entrer dans le thymus via le sang ramenant ainsi des antigènes périphériques du soi et du non-soi. Par ce moyen, les DC établissent une tolérance en générant des cellules T régulatrices (Goldschneider and Cone 2003).

#### 1.6.2. La tolérance périphérique

Bien que la tolérance centrale soit efficace, elle est incomplète (Steinman, Hawiger et al. 2003). Il existe plusieurs voies par lesquelles les DC peuvent induire la tolérance périphérique. La capacité des DC à induire la tolérance a été démontré la première fois par des expériences sur des DC immatures résidant dans les tissus lymphoïdes périphériques. Dans des conditions non-inflammatoires, les DC récupèrent les corps apoptotiques et après les avoir transportés dans les ganglions périphériques, elles les présentent aux lymphocytes réactifs pour les inhiber (Steinman, Turley et al. 2000). Les DC induisant la tolérance (TDC) présentent l'antigène mais ne réussissent pas à donner le signal adéquat de co-stimulation (ou donne des signaux inhibitoires) pour permettre la prolifération et l'activation des



lymphocytes T. Ce processus résulte soit à la mort du lymphocyte, soit à son anergie ou soit à la génération et l'activation des lymphocytes T régulateurs (Treg).

Bien que les récepteurs tels que SLAM (signaling lymphocyte activation molecule), PD-L1 (programmed cell death ligand-1), DEC-205 (CD205) et ILT3/ILT4 (inhibitory receptors of the immunoglobulin-like transcript (ILT) family) soient reconnus pour être exprimés par les TDC et utilisés pour les phénotyper, les TDC se définissent plutôt par leur fonction que par leur phénotype (Cella, Dohring et al. 1997; Mahnke, Knop et al. 2003; Probst, McCoy et al. 2005; Smits, de Jong et al. 2005).

Les TDC sont capables de convertir les lymphocytes T naïfs en lymphocytes Treg et d'expandre leur nombre. Elles sécrètent aussi de l'IL-10 et expriment IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) (Munn, Sharma et al. 2002 ; Steinman, Hawiger et al. 2003 ; Lewkowich, Herman et al. 2005).

De plus des DC immatures ou semi-matures peuvent différencier des lymphocytes Treg naturels ou induire des IL-10<sup>+</sup> Treg (Vigouroux, Yvon et al. 2004 ; Battaglia, Gregori et al. 2006). Les antigènes présentés par des DC immatures *in vivo* induisent une prolifération abortive et une anergie des lymphocytes T spécifiques de ces antigènes. Cet état des DC est décrit comme semi-matures. Ces DC semi-matures ont capturé un antigène, le présentent à leur surface en complexe avec le CMH, mais n'ont pas été mises en contact avec un signal de danger. Ces cellules expriment l'antigène associé au CMH mais pas un niveau de molécules de co-stimulation suffisant pour induire une réponse immunitaire (Lutz and Schuler 2002).

De même des DC matures peuvent expandre des lymphocytes Treg (Tarbell, Yamazaki et al. 2004; Brinster and Shevach 2005 ) démontrant ainsi que le pouvoir d'induire la tolérance n'est pas réservé aux DC immatures ou semi-matures.

Les TDC peuvent être générées par leur mise en contact avec de l'IL-10, du TGF- $\beta$ , de la vitamine D3 ou de corticostéroïdes Ces composés induisent un état réfractaire des DC à la maturation et ce via l'augmentation de l'activité du facteur de transcription Stat3 (Figure 8). Ces TDC inhibent l'expansion des lymphocytes T

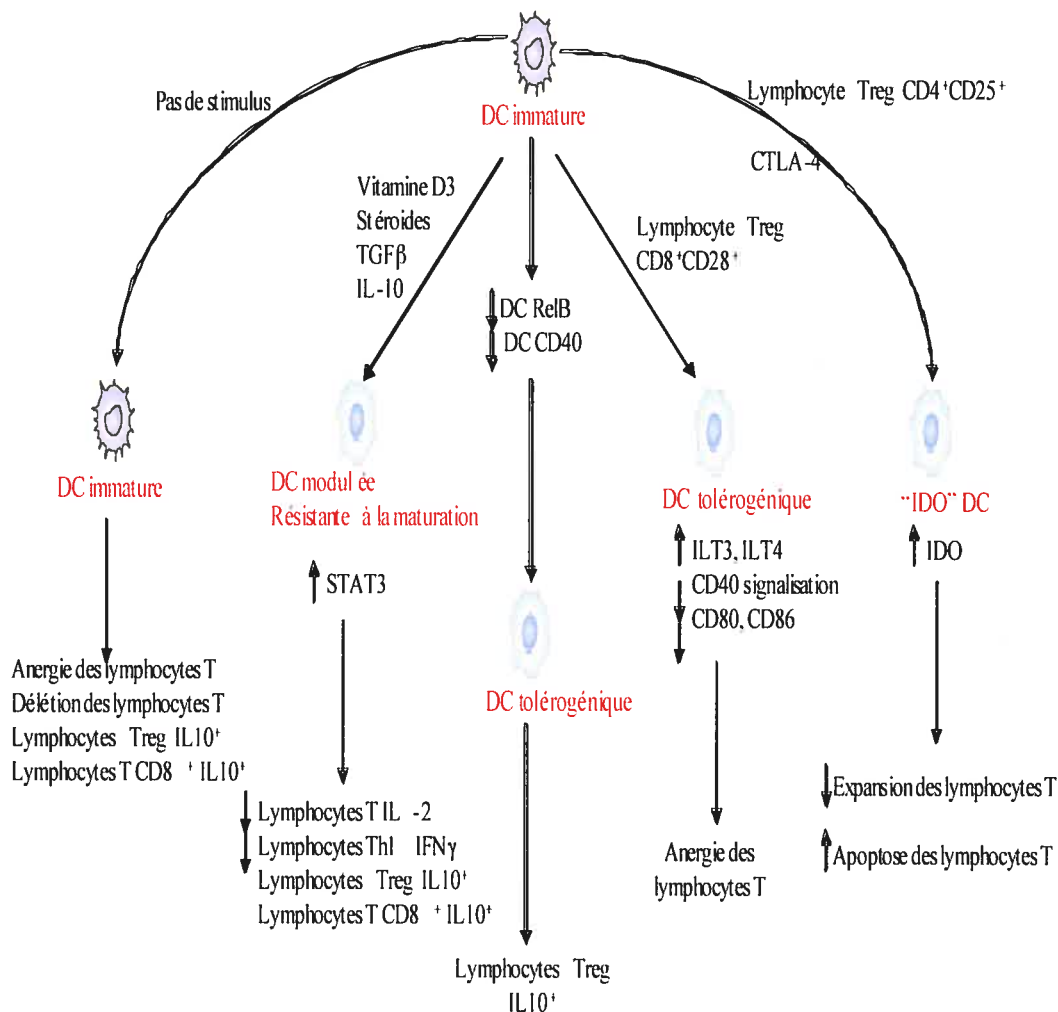


Figure 8 : Mécanismes d'induction des DC tolérantes.

Il existe plusieurs voies par lesquelles les DC deviennent tolérogéniques. Certains mécanismes se superposent. Les cinq mécanismes résumés ici (de gauche à droite) incluent ceux de présentation de l'antigène par les DC non activées; ceux d'exposition des DC aux cytokines tolérantes (IL-10) ou autres substances telles que les stéroïdes; ceux qui inhibent RelB et par conséquent l'expression de CD40; ceux où les DC sont exposées aux cellules tolérantes (lymphocytes Treg (CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>); et ceux d'induction de IDO par l'interaction avec les lymphocytes Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (D'après O'Neill, Adams et al. 2004)

effecteurs et induisent la génération des lymphocytes Treg sécrétant de l'IL-10 (O'Neill, Adams et al. 2004).

L'interaction des DC avec les lymphocytes Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> entraîne le même phénomène. Ceci inhibe l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation suite à l'engagement de CD40 (O'Neill, Adams et al. 2004). Ces lymphocytes Treg sont aussi induits par des DC chez qui l'activité de RelB ou l'expression de CD40 a été diminuée (O'Neill, Adams et al. 2004) (Figure 8).

Les DC qui expriment IDO (2,3-dioxygénaseindoléamine) inhibent la prolifération des lymphocytes T et induisent leur mort (O'Neill, Adams et al. 2004). L'expression de IDO peut-être induite par l'engagement de CD86/CD80 par CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) (O'Neill, Adams et al. 2004). Les lymphocytes Treg naturels sont produits dans le thymus et expriment de manière constitutive les marqueurs CD25, CTLA-4 et Foxp3. De plus, ils exercent leur rôle de suppresseur via un contact direct avec la cellule cible (O'Neill, Adams et al. 2004) (Figure 8). Les DC matures peuvent inhiber ces lymphocytes par la sécrétion d'IL-6 (O'Neill, Adams et al. 2004).

## 2. L'ÉLIMINATION DES DC

Après interaction avec les lymphocytes dans le ganglion, Ingulli *et al.* ont démontré que les DC impliquées dans la réaction disparaissent. Il est supposé que celles-ci meurent par apoptose (Ingulli, Mondino et al. 1997; Josien, Li et al. 2000; Chang, Baumgarth et al. 2007).

L'apoptose est un phénomène crucial pour le développement et l'homéostasie du système immunitaire. Ce processus est initié par divers signaux entraînant l'élimination de cellules indésirables durant le développement ou après l'exécution de leurs fonctions. Durant ce processus, une condensation de la chromatine et du noyau ainsi que du cytoplasme a lieu. De plus, la cellule présente un aspect bourgeonnant, donnant lieu par la suite à la dissémination de la cellule en corps apoptotiques. Par ce moyen, l'organisme élimine les cellules indésirables sans provoquer d'inflammation (Wyllie, Kerr et al. 1980).

La spécificité de ce processus provient de l'implication de protéases, les caspases. Celles-ci présentent une activité catalytique hautement régulée. En plus de leur rôle pro-apoptotique, les caspases exercent aussi une fonction anti-apoptotique encore mal comprise (Kroemer and Martin 2005).

Les signaux peuvent être d'origine intrinsèque impliquant la mitochondrie ou extrinsèque comme l'engagement de récepteurs par leurs ligands (Green and Reed 1998; Randolph, Inaba et al. 1999).

Plusieurs études ont été conduites sur la mort des DC, notamment sur leur élimination via l'apoptose. Les voies de signalisation impliquées restent encore obscures. Cependant il a été supposé que la maturation apportait un sursis aux DC (Rescigno, Martino et al. 1998; McLellan, Heldmann et al. 2000; Kalled, Cutler et al. 2001; Medema, Schuurhuis et al. 2001; Vizzardelli, Pavelka et al. 2006; Chang, Baumgarth et al. 2007).

## 2.1. Rappels sur l'apoptose

### 2.1.1. Les modifications cellulaires

Durant le processus d'apoptose, une condensation de la chromatine et du noyau ainsi que du cytoplasme a lieu. De plus, la cellule présente un aspect bourgeonnant, donnant lieu par la suite à la dissémination de la cellule en corps apoptotiques. Par ce moyen, l'organisme évite le déversement du contenu intracytoplasmique et l'inflammation provoquée par la présence de composés intracellulaires (Danial and Korsmeyer 2004).

L'apoptose fut tout d'abord visualisée par des modifications morphologiques de la cellule. Par la suite, les bases biochimiques et moléculaires de ces changements ont été décrites (Danial and Korsmeyer 2004).

Bien que la membrane conserve son intégrité, elle subit des transformations qui conduisent à l'exposition des molécules de phosphatidylsérine (PS), normalement conservées de manière active sur la face interne de la membrane plasmique. Cette exposition de PS sur la surface externe de la cellule l'identifie comme étant une

cellule à éliminer. Cela permet aux macrophages de les phagocyter (Fadok, Bratton et al. 1998).

Dans le cytoplasme, des protéines du cytosquelette sont altérées, entraînant un repliement de la cellule sur elle-même et une perte de contact avec les cellules voisines. Finalement, la cellule se désagrège en corps apoptotiques renfermant ainsi le matériel cytoplasmique.

De même, la membrane mitochondriale est affectée au cours de l'apoptose. Une chute du potentiel trans-membranaire ( $\Delta\psi$ ) entraîne l'ouverture de pores et la libération de molécules pro-apoptotiques dans le cytoplasme comme le cytochrome c (Kroemer, Zamzami et al. 1997). La respiration oxydative effectuée dans la mitochondrie et qui génère des molécules d'ATP nécessaire à l'apport en énergie des cellules n'est plus assurée. Le cytochrome c forme un complexe moléculaire, appelé apoptosome, entraînant l'apoptose de la cellule (Baliga and Kumar 2003).

La condensation nucléaire est le résultat de la dégradation des protéines structurales du noyau. De plus, l'ADN est fragmenté en morceaux de 180 à 200 paires de bases (Wyllie, Kerr et al. 1980).

Toutes ces modifications ont conduit à l'élaboration de techniques permettant d'identifier l'apoptose, comme la visualisation de la fragmentation de l'ADN, la chute du potentiel trans-membranaire mitochondrial ou la détection des PS sur la face externe de la membrane plasmique.

### 2.1.2. Les caspases

Le mot caspase provient de cysteinyl aspartate-specific proteinase ce qui signifie : protéase dont le site catalytique renferme une cystéine active qui hydrolyse spécifiquement leurs substrats après un résidu aspartate (Riedl and Shi 2004).

À ce jour, quatorze caspases ont été identifiées chez les mammifères dont les caspases 1 à 12 clonées chez l'homme (Riedl and Shi 2004).

### 2.1.2.1. Structure et classification des caspases

Les caspases sont produites sous une forme inactive, appelée proenzyme ou encore zymogène. Leurs tailles varient de 30 à 50 kDa. Elles présentent trois domaines distincts séparés par un site de clivage nécessaire à leur activation (Adam-Klages, Adam et al. 2005).

Le prodomaine situé en N-terminal varie beaucoup d'une caspase à l'autre. Cette variabilité a mené à une classification en sous-familles déterminées selon la longueur de leur prodomaine.

Il existe deux classifications des caspases : structurale et fonctionnelle (Figure 9A et 9B).

#### Classification structurale :

- Le groupe I contient les caspases possédant un long prodomaine (jusqu'à 26 kDa). Celui-ci comprend les caspases-1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11. Le prodomaine comporte des motifs conservés tels que DED ou CARD. Ils permettent aux caspases d'être recrutées au sommet de la cascade signalétique, c'est-à-dire directement après les récepteurs de mort (DR). Pour cette raison, ces caspases sont aussi appelées les caspases initiatrices ou apicales (Figure 9A).

- Le groupe II regroupe les caspases ayant un prodomaine court (3 kDa) (caspase-3, 6, 7). La fonction exacte du prodomaine court reste encore inconnue. Ces caspases sont situées à la fin de la voie signalétique, elles sont donc nommées caspases terminales en opposition aux caspases initiatrices (Figure 9A).

#### Classification fonctionnelle :

- Les caspases-2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10 participent à l'initiation et l'exécution de l'apoptose. Elles constituent donc le groupe des caspases pro-apoptotiques (Figure 9B).

- Les autres caspases (-1, 4, 5 et 11) sont impliquées dans les réactions inflammatoires et composent le groupe des caspases pro-inflammatoires (Figure 9B) (Adam-Klages, Adam et al. 2005).

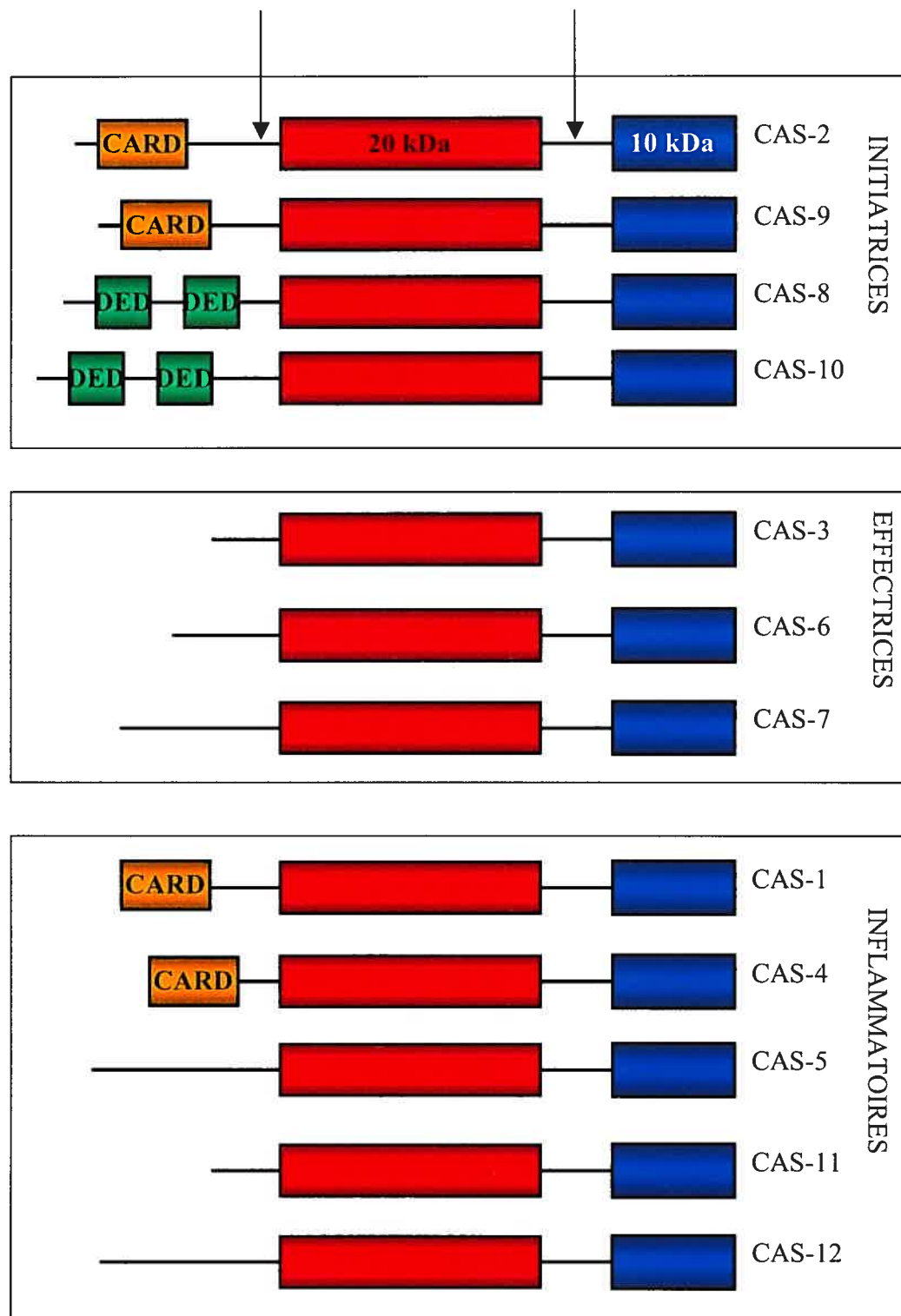


Figure 9 : Structure et classification des caspases

Les caspases se divisent en trois groupes : les caspases initiatrices, les caspases effectrices et les caspases inflammatoires. Toutes les caspases possèdent deux sites de clivages. Lors de leur activation par clivage, trois sous-unités sont libérées. La petite sous-unité (10kDa) s'associe à la grande sous-unité (20kDa) afin de former l'enzyme active.

### 2.1.2.2. Activation avec induction de l'apoptose

Lors de l'activation, le prodomaine est clivé libérant la grande et la petite sous unité qui forment alors un complexe actif. L'analyse du cristal de caspase-3 active démontre un tétramère constitué de deux hétérodimères issus de l'association de la grande et de la petite sous unité. Les deux hétérodimères sont tête-bêche exposants ainsi vers l'extérieur de la molécule les sites actifs (Walker, Talanian et al. 1994; Wilson, Black et al. 1994).

Les sites catalytiques sont des motifs térapeptidiques semblables à ceux qui sont trouvés sur les substrats des caspases. Ceci suggère que l'activation des caspases s'effectue soit par autocatalyse, soit par transactivation à l'aide d'une autre caspase (Adam-Klages, Adam et al. 2005).

Les caspases initiatrices s'activent par autocatalyse lors de leur rapprochement. Une fois activées elles clivent les caspases terminales (transactivation) pour induire leur activation.

Les caspases sont des protéases hautement spécifiques. Un résidu aspartate (Asp) en position 1 du motif térapeptidique (P4-P3-P2-Asp-X) est exigé (Riedl and Shi 2004).

### 2.1.2.3. Activation sans induction d'apoptose

En plus de leur rôle clairement démontré dans l'apoptose, les caspases possèdent aussi un rôle dans des processus non apoptotiques comme la prolifération ou la différenciation (Alam, Cohen et al. 1999).

L'inactivation de FADD (Fas-associated via Death Domain) prévient la prolifération induite par l'activation des lymphocytes T, suggérant un rôle de FADD ainsi que des caspases dans la prolifération des lymphocytes T (Newton and Strasser 2000; Kabra, Kang et al. 2001). L'utilisation d'inhibiteurs de caspases confirme la nécessité de caspases actives pour la prolifération des lymphocytes T (Alam, Cohen et al. 1999). Ceci a été confirmé par Chun *et al.* Ils démontrent que des patients déficients pour l'expression de la caspase-8 montrent une prolifération déficiente des lymphocytes T (Chun, Zheng et al. 2002).



Les caspases sont aussi impliquées dans la différenciation des cellules. En 1998, Ishizaki *et al.* ont démontré pour la première fois que l'activation de la caspase-3 ne conduit pas à l'apoptose mais à la différenciation de cellules épithéliales (Ishizaki, Jacobson *et al.* 1998). Plus récemment, l'implication des caspases lors des derniers stades de maturation des mégacaryocytes et des érythrocytes a été démontrée (Testa 2004).

Les caspases jouent aussi un rôle non apoptotique dans la maturation des DC. Une étude démontre que la stimulation des DC immatures par le LPS induit une activation des caspases, nécessaire non seulement pour la maturation mais aussi pour la survie des DC. Toutefois, les auteurs n'ont pas pu identifier quelles caspases étaient responsables de ce processus (Franchi, Condo *et al.* 2003).

Santambrogio *et al.* viennent très récemment de confirmer ce rôle anti-apoptotique des caspases durant la maturation des DC. Le mécanisme implique AP-1, molécule adaptatrice de la voie des clathrines. Les clathrines sont impliquées dans la distribution et le transfert des molécules entre la voie d'endocytose et d'exocytose. Les protéines adaptatrices permettent l'association des clathrines avec les protéines qui doivent être sécrétées ou internalisées. Lors de la maturation des DC, les molécules de CMH de classe II sont transférées des vésicules vers la surface. L'équipe démontre que les DC immatures expriment des formes tronquées de AP-1 absentes chez les DC matures (Wong, Santambrogio *et al.* 2004). Cette forme tronquée d'AP-1 est incapable de se fixer aux clathrines et permet la conservation des molécules de CMH dans les vésicules. Le clivage d'AP-1 résulte de l'action de caspase-3. Les DC immatures possèdent une faible quantité de la caspase-3 active (plus faible que dans des cellules en apoptose) qui diminue en présence de LPS. Par conséquent la maturation entraîne l'expression de la forme complète d'AP-1 et donc le transfert des molécules de CMH de classe II vers la surface. Toutefois, le mécanisme responsable du contrôle de l'activation de caspase-3 reste encore mal compris (Santambrogio, Potolicchio *et al.* 2005).

### 2.1.3. La famille Bcl2

Les membres de la famille bcl2 (B cell LL/lymphoma 2) se divisent en deux groupes.

- les protéines anti-apoptotiques qui ont une forte homologie avec Bcl2 (Bcl2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1)
- les protéines pro-apoptotiques qui présentent une plus faible homologie (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik). Ce groupe se divise encore en deux sous-groupes:- les membres reliés à Bcl2-X associated protein (Bax) et ceux contenant seulement un domaine Bcl2 homologue 3 (BH3).

Les membres expriment entre un et quatre domaines BH (BH1, BH2, BH3 et BH4). Les membres du sous-groupe anti-apoptotique sont fortement conservés et contiennent entre 3 et 4 domaines BH, ce qui leur confère une localisation au niveau des membranes internes des organelles. L'homologie est moins présente chez les membres de la famille pro-apoptotique auxquels il manque souvent le domaine BH4. Toutefois le domaine BH3 est fortement conservé. Ces domaines BH jouent un rôle important dans la capacité de chaque membre à interagir avec les autres (Ottolie, Diaz et al. 1997; Adams and Cory 1998; Gross, McDonnell et al. 1999).

Le mécanisme d'action met en place des interactions entre les différents membres ainsi qu'une action au niveau de la mitochondrie. Nous allons prendre quelques exemples pour expliquer leur action.

Bcl-2 est un membre de la sous-famille anti-apoptotique. Il est capable de lier la molécule APAF (Zou, Henzel et al. 1997), empêchant ainsi sa liaison avec la caspase-9 et le cytochrome c et de fait la formation de l'apoptosome (Hu, Benedict et al. 1998; Pan, O'Rourke et al. 1998; Cosulich, Savory et al. 1999). Mais il est surtout connu pour sa capacité à former des canaux ioniques (Antonsson, Conti et al. 1997; Schendel, Xie et al. 1997; Schlesinger, Gross et al. 1997; Hu, Benedict et al. 1998; Pan, O'Rourke et al. 1998; Cosulich, Savory et al. 1999). Ceci prévient le bris de membrane mitochondriale et la relâche du cytochrome c (Yang, Liu et al. 1997).

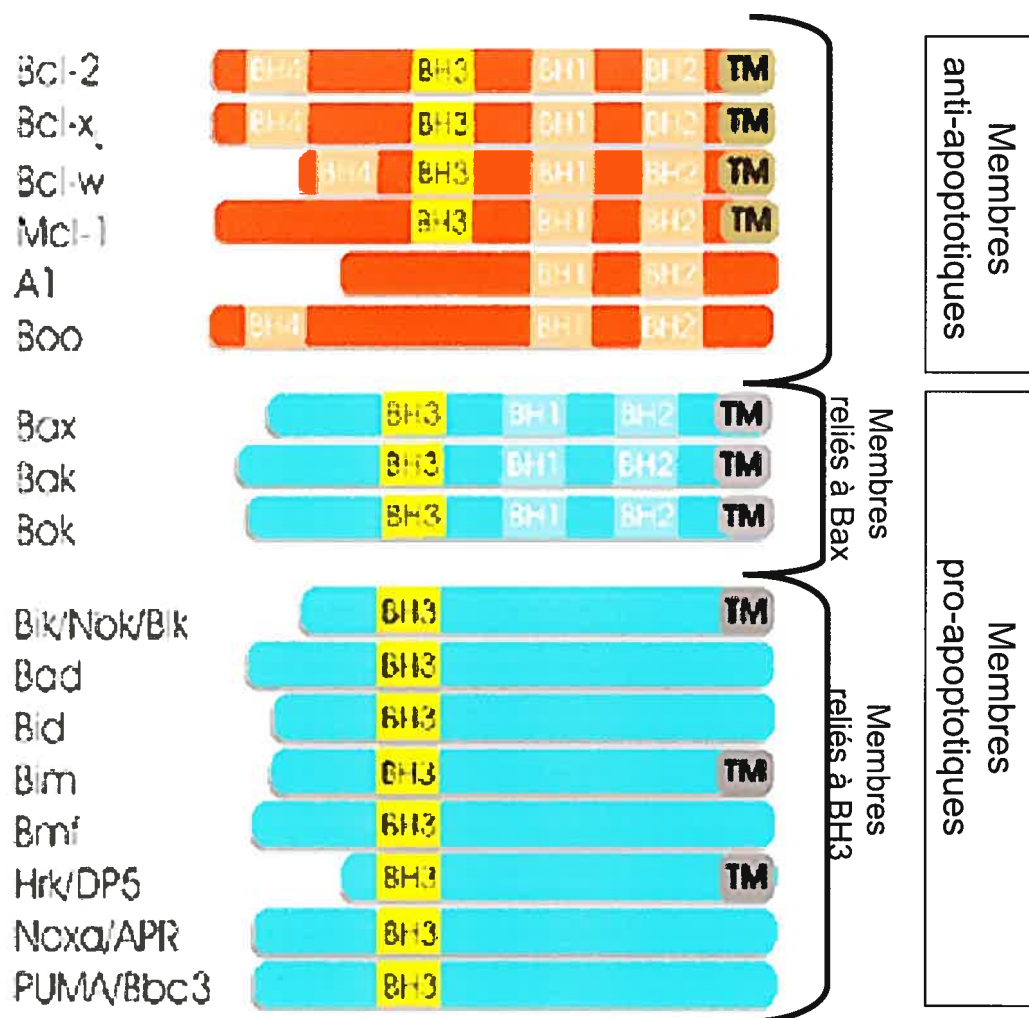


Figure 10 : Classification des membres de la famille Bcl-2.

La plupart des membres de la famille Bcl-2 exprime un ou des domaines BH ainsi qu'un domaine transmembranaire. La famille est divisée en deux groupes : les anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques. Cette sous famille se divise encore en deux sous-groupes : les protéines reliées à Bax et celles ne comportant qu'un domaine BH3.

Bcl-x se présente sous deux formes : Bcl-xL et Bcl-xS. Bcl-xL est une molécule anti-apoptotique souvent exprimée par les cellules qui survivent longtemps comme les cellules nerveuses (Gonzalez-Garcia, Perez-Ballester et al. 1994). Il inhibe Bax par dimérisation (Gross, Jockel et al. 1998). Mais il peut aussi agir au niveau de la mitochondrie comme Bcl-2 (Minn, Velez et al. 1997) et lier APAF-1 (Krajewski, Krajewska et al. 1994; Hu, Benedict et al. 1998). Alors que Bcl-xS a un rôle pro-apoptotique et est exprimé par des cellules avec un haut taux de renouvellement comme dans le système immunitaire (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993; Krajewski, Krajewska et al. 1994). Il exerce son action pro-apoptotique en séquestrant Bcl-2 et Bcl-xL.

La molécule anti-apoptotique Bfl-1 protège les cellules endothéliales de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Karsan, Yee et al. 1996; Zong, Edelstein et al. 1999; Duriez, Wong et al. 2000). Son expression est induite par les molécules pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Karsan, Yee et al. 1996; Karsan, Yee et al. 1996) mais aussi par le CD40L (Kuss, Knodel et al. 1999). Il dimérise avec Bax empêchant ainsi la relâche du cytochrome c (Zhang, Cowan-Jacob et al. 2000). Il peut aussi lier Bid (Werner, de Vries et al. 2002).

#### 2.1.4. La mitochondrie

La mitochondrie possède un rôle central dans l'orchestration de l'apoptose. Elle est responsable de l'apoptose conduite par les signaux intrinsèques comme les céramides. Trois mécanismes d'apoptose mitochondriale sont reconnus à l'heure actuelle : le bris du transport d'électron, de la phosphorylation oxydative et de la production d'ATP ; la relâche de protéines qui activent les caspases et l'altération du potentiel d'oxydation-réduction (REDOX) (Xie, Qian et al. 2003).

- Bris du transport d'électron et du métabolisme énergétique.

La conséquence du bris de la chaîne d'électrons est une diminution de la production d'ATP. Ce phénomène est reconnu pour être tardif dans le processus d'apoptose. Plusieurs signaux sont responsables de cette manifestation. Par exemple les  $\gamma$ -irradiations et les céramides (messagers secondaires impliqués dans l'apoptose)

provoquent ce bris dans la chaîne d'électrons et cette perte d'énergie (Green and Reed 1998).

- Libération de protéines activant les caspases.

L'importance de la mitochondrie lors de l'apoptose a été révélée par des expériences conduites dans des systèmes exempts de cellule. Dans ce cas, l'ajout de Bcl-2 et la présence de la mitochondrie inhibent la condensation du noyau (Newmeyer, Farschon et al. 1994). Plus tard, il a été démontré que l'activation des caspases par le déoxyadénosine triphosphate dépend de la présence du cytochrome c dans la préparation de l'extrait cellulaire. La forme cytosolique du cytochrome c forme un complexe avec Apaf-1 et la caspase-9, nommé apoptosome. Le résultat est l'activation de caspase-9 qui à son tour active d'autres caspases (Li, Nijhawan et al. 1997). Une fois le cytochrome c libéré, la cellule est destinée à mourir soit par un mécanisme rapide incluant la formation de l'apoptosome soit par un processus nécrotique. La mitochondrie libère d'autres protéines inductrices d'apoptose comme AIF (Apoptosis Inducing Factor). AIF est un facteur mitochondrial qui se localise dans le noyau lorsque libéré de la mitochondrie (Susin, Lorenzo et al. 1999). Il induit la condensation nucléaire et la fragmentation de l'ADN (Joza, Susin et al. 2001). Plus récemment, SMAC/Diablo (Secondary Mitochondria-derived Activator of Caspase/diablo) a été démontré comme induisant l'apoptose en prévenant l'inhibition des caspases (Du, Fang et al. 2000).

- Potentiel REDOX

La mitochondrie est une source pour la production des anions superoxydes dans la cellule. Durant le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, il est estimé qu'un à cinq pourcents de ces électrons sont perdus et participent à la production de molécules  $O_2^-$ . N'importe quel agent augmentant cette perte entraîne la production de cet anion. Une quantité importante de cet anion conduit *in fine* à la mort de la cellule (Green and Reed 1998).

#### 2.1.5. Les récepteurs de mort (TNFR) et leurs ligands (TNF)

Ces récepteurs et leurs ligands constituent les signaux extrinsèques d'apoptose.

Les ligands (TNF) constituent une famille de cytokines contenant une vingtaine de membres dont FasL (Fas ligand), LT $\alpha$  (LymphoToxin  $\alpha$ ), TNF $\alpha$ , CD27L, CD30L, CD40L, TRAIL et RANKL (Locksley, Killeen et al. 2001). Ces cytokines sont des homotrimères. Bien que la plupart existe sous forme membranaire, certaines comme le TNF $\alpha$  existe sous forme soluble.

Les récepteurs TNFR de ces ligands représentent une famille comprenant entre autre Fas (le récepteur de FasL), CD40 (le récepteur de CD40L) ou encore TNFR-I qui lie le TNF $\alpha$  (Locksley, Killeen et al. 2001). Les TNFR se caractérisent par la présence d'un domaine extracellulaire riche en cystéines. Les récepteurs de mort (DR ou Death Receptor) forment une sous-famille déterminée par la présence d'un domaine de mort DD (ou Death Domain) intracellulaire. C'est la présence de ce domaine qui permet aux DR d'engager la cellule sur la voie de l'apoptose. Dans certains cas, leur engagement peut aussi mener à une fonction différente de l'apoptose voire opposée (Hsu, Shu et al. 1996). L'engagement des DR par leur ligand entraîne leur réticulation et par conséquent l'activation d'une cascade protéolytique. Ces récepteurs et leurs ligands sont largement exprimés par les cellules du système immunitaire. Fas et TNFR-I représentent les récepteurs les plus étudiés de cette famille.

#### 2.1.5.1. Mécanisme général

La forme fonctionnelle des DR est un trimère ou un oligomère (Figure 10) (Kischkel, Hellbardt et al. 1995). Il a longtemps été pensé que la fixation du ligand entraînait cette trimérisation. Cependant, il a été démontré que le récepteur existait aussi sous forme pré-assemblée (Siegel, Frederiksen et al. 2000). La partie intracellulaire des TNFR n'est pas dotée d'une activité catalytique de type kinase ou phosphatase. En revanche, des expériences de mutagenèse ont démontré que le domaine DD était indispensable à l'induction de l'apoptose par cette voie (Tartaglia, Ayres et al. 1993). C'est via ce domaine que le récepteur recrute les molécules adaptatrices telles que FADD (Fas-Associated via DD) ou TRADD (TNFR-I Associated DD molecule) (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995; Hsu, Shu et al. 1996) (Figure 10). Ces protéines adaptatrices possèdent aussi un domaine appelé DED

(Death Effector Domain) (Hsu, Shu et al. 1996). Par ce domaine DED, les molécules adaptatrices recrutent les caspases. Lors d'expériences d'immunoprécipitation avec l'engagement de Fas, la caspase-8 a été identifiée comme membre du complexe immun, la plaçant ainsi à l'apex de la cascade (Chen and Wang 2002) protéolytique issue de l'engagement de Fas et de TNFR-I (Danial and Korsmeyer 2004). Il existe une seule autre caspase apicale : la caspase-10 (Danial and Korsmeyer 2004). Ces deux protéines se différencient des autres caspases par un domaine DED leur permettant d'interagir avec les molécules adaptatrices recrutées par le TNFR (Danial and Korsmeyer 2004).

Ces différentes études ont permis de reconstituer un mécanisme général de signalisation apoptotique des TNFR. Après son engagement par son ligand, le DR sous forme de trimère recrute FADD par des interactions homotypiques entre les domaines DD ; puis la fixation de caspase-8 ou de caspase-10 intervient via les domaines DED. Ce complexe tripartite (TNFR/FADD/caspase-8 ou de caspase-10) est appelé DISC (Death Inducing Signaling Complexe).

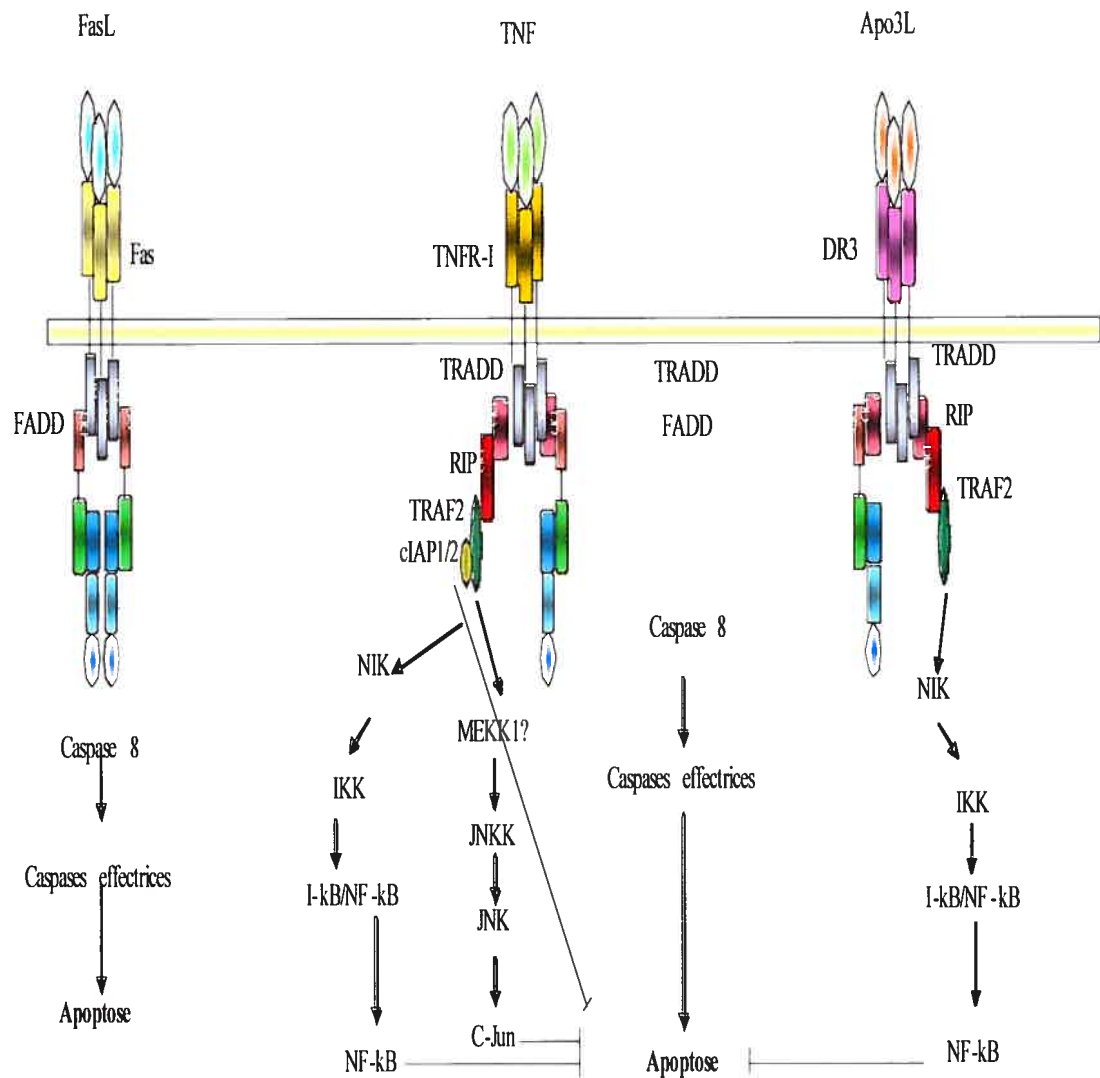


Figure 11 : Description des TNFRs.

Ce schéma représente les trois principaux TNFRs assurant la voie apoptotique. À gauche du schéma est représenté le récepteur Fas engagé par son ligand FasL. Au milieu le TNFR-I est lié à son ligand TNF- $\alpha$ . À droite, le récepteur DR3 est engagé par son ligand Apo3L. Fas représente la voie apoptotique commune aux trois récepteurs. TNFR-I et DR3 représentent aussi la voie non apoptotique issue de ces récepteurs.



Grâce à ce complexe, l'activation de caspase-8 ou caspase-10 est rendue possible par un clivage autocatalytique dû au rapprochement des caspases (Danial and Korsmeyer 2004). Par la suite, la caspase-8 ou caspase-10 sous sa forme active clive d'autres caspases, responsables de l'exécution de l'apoptose.

La signalisation via TNFR-I et DR3 diffère légèrement. Le recrutement de FADD s'effectue via TRADD qui se fixe en premier (Danial and Korsmeyer 2004).

#### 2.1.5.2. Les voies de signalisation parallèles à l'apoptose

FADD et TRADD ne sont pas les seules molécules adaptatrices qui se lient aux TNFR.

Il existe d'autres molécules adaptatrices capables d'interagir avec les DR dont la protéine DAXX (Death Associated protein 6). Cette protéine est dépourvue de domaine DD. Elle semble capable d'initier l'apoptose de manière indépendante des caspases grâce à l'activation de la kinase JNK (Yang, Khosravi-Far et al. 1997).

RIP est une autre molécule adaptatrice qui s'associe à TRADD via son DD (Luo, Budihardjo et al. 1998). Elle contient aussi un motif CARD (Caspase Recruitment Domain) qui lui permet de lier une autre molécule adaptatrice RAIDD/CRADD (RIP-Associated ICH1 Protein with DD/Caspase and RIP Adaptator with DD). Cette dernière recrute alors caspase-2 (Duan and Dixit 1997; Riedl and Shi 2004).

L'activation des TNFR ne conduit pas forcément à l'apoptose. En effet, TNFR-I, TNFR-II et DR3 sont aussi capables d'induire une réponse d'activation et ce dans un bon nombre de types cellulaires du système immunitaire (Jelinek and Lipsky 1987; Hackett, Davis et al. 1988).

Cette activation est le résultat de l'activation des voies de NF-kB ou de JNK/AP-1. La signalisation est assurée par d'autres molécules adaptatrices comme RIP et TRAF-2 (Hsu, Huang et al. 1996).

Il semble que TRADD soit un intégrateur du signal, dirigeant la réponse soit vers l'induction de la mort en recrutant FADD, soit vers la prolifération en interagissant avec TRAF (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003).

Fas démontre aussi cette capacité à induire deux fonctions antinomiques selon les conditions dans lesquelles son engagement s'effectue. Il peut induire la prolifération des lymphocytes T et servir ainsi de molécules de co-stimulation. Cette fois, l'activation de la voie de NF- $\kappa$ B s'effectue par le biais de FLIP (Leverkus, Walczak et al. 2000), molécule recrutée dans le DISC, dont nous reparlerons par la suite (Alderson, Tough et al. 1995; Kataoka, Budd et al. 2000).

#### 2.1.6. Le système Fas/FasL

Le système Fas/FasL représente le modèle d'étude pour déterminer le mécanisme d'apoptose induit par les DR. Fas est abondamment exprimé dans le thymus, le foie, le cœur, le poumon, le rein et l'ovaire mais de nombreux autres tissus l'expriment aussi de manière plus faible (Ashkenazi and Dixit 1999).

Dans des conditions normales, l'expression de FasL est limitée aux lymphocytes T activés, aux cellules NK et aux sites immuno-privilegiés (les yeux, les testicules) (Ashkenazi and Dixit 1999).

Ce système joue un rôle crucial dans trois phénomènes différents :

- Il assure l'élimination des lymphocytes T activés périphériques après la réaction immunitaire et met ainsi un terme à la réaction.
- Il élimine les cellules reconnues indésirables comme les cellules infectées par un virus, ou cancéreuses.
- Il assure encore la protection des sites immuno-privilegiés en tuant les cellules inflammatoires (Ashkenazi and Dixit 1998).

Comme décrit ci-dessus, la liaison de FasL au récepteur Fas entraîne le recrutement de FADD et de caspase-8, d'où le déclenchement de l'apoptose (Figure 11).

Toutefois, ce système présente une particularité : l'implication de la mitochondrie. En effet, il a été démontré que dans certains cas Bcl-2 peut inhiber l'apoptose induite via Fas ; son rôle au niveau de l'apoptose induite via les DR a donc été évalué (Scaffidi, Fulda et al. 1998).

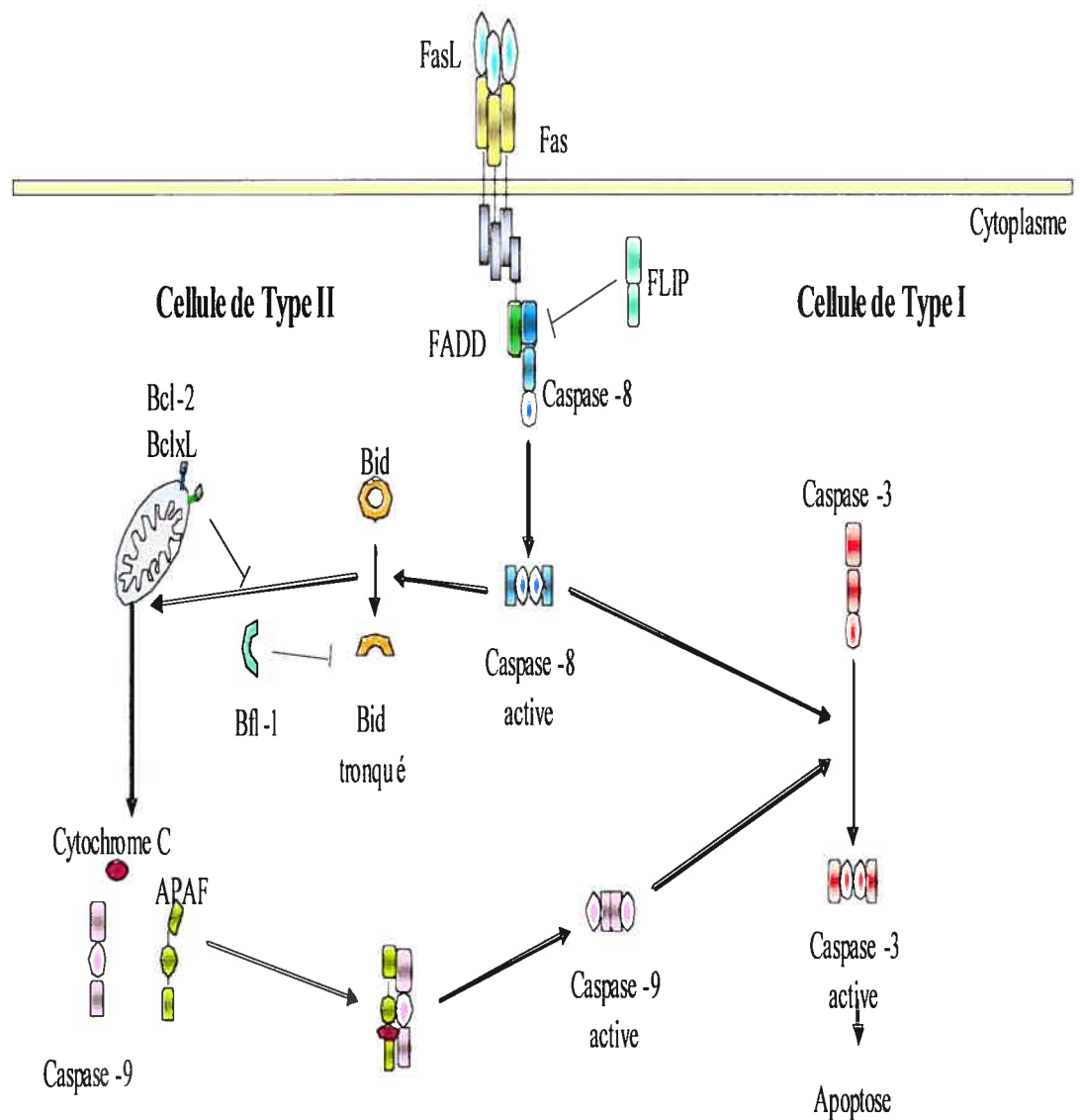


Figure 12 : La voie Fas/FasL.

Les cellules sensibles à Fas se divisent en deux sous-types: celles de type II et celles de type I. La signalisation dans les cellules de type II implique la mitochondrie. EN revanche les cellules de type I n'ont pas besoin de l'intervention de la mitochondrie pour mourir.

Dans un premier temps, les résultats se sont avérés très contradictoires. Une résistance face à l'apoptose induite via Fas par la surexpression de Bcl-2 a été observée mais le contraire aussi. Le groupe de Peter M. a découvert que le type cellulaire était à la base de cette contradiction. Dans leur étude seulement 2 lignées sur 4 ont démontré une résistance à Fas suite à la surexpression de Bcl-2. Le type cellulaire qui nécessite l'activation de la mitochondrie a été baptisé cellule de type II, en opposition aux cellules de type I qui ne nécessitent pas l'intervention de la mitochondrie (Scaffidi, Fulda et al. 1998). Cette activation de la mitochondrie est une amplification du signal apoptotique. En effet, pour des raisons encore mal comprises, dans certains cas, l'engagement de Fas produit une quantité insuffisante de caspase-8 active (Scaffidi, Fulda et al. 1998). Plus tard, l'équipe de Luo *et al.* a démontré que le lien entre le récepteur et la mitochondrie est assuré par la molécule Bid, un facteur cytosolique et membre de la famille Bcl-2 (Luo, Budihardjo et al. 1998). Si la quantité de caspase-8 active n'est pas suffisante pour cliver les caspases terminales, elle est suffisante pour induire l'activation de Bid par son clivage. Une fois activé, Bid permet la formation de pores dans la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome c (Luo, Budihardjo et al. 1998).

#### 2.1.7. Régulation de l'activité des caspases

Comme les caspases sont exprimées constitutivement et que leur action est fatale, elles font l'objet d'une régulation précise. Il existe plusieurs niveaux de régulation des caspases. Tout d'abord, elles sont présentes sous forme inactive de zymogène et leur activation répond à des commandes bien précises comme l'engagement des DR (Ashkenazi and Dixit 1999). D'autre part, elles sont leur propre régulateur puisqu'elles s'autocatalysent. Enfin le dernier niveau de régulation repose sur des molécules extérieures qui, à l'aide d'interactions directes, prennent la place du substrat (IAPs, SMAC/Diablo) ou agissent comme dominant négatif (FLIP) (Willems, Amraoui et al. 2000).

- FLIP:

Le groupe de molécules vFLIP (viral FLIP) a été trouvé par criblage de banque de données pour le motif DED. Les virus de la famille des  $\gamma$ -herpesvirus comme

l'herpesvirus-2 équidé (EHV-2), l'herpesvirus Saïmiri (HVS) expriment ces molécules. Ces molécules sont capables d'arrêter l'apoptose induite par les TNFR-1, DR3 et DR4 (Thome, Schneider et al. 1997).

L'homologue de ce gène a été identifié chez l'homme par plusieurs groupes d'où une multitude de noms différents : FLAME-1, I-FLICE, CASH, CASPER, CLARP, MRIT et Ursupin, pour finir par le nom retenu cFlip. Parmi plusieurs isoformes au niveau transcriptionnel d'ARN, seulement deux isoformes sont retrouvés au niveau protéique : la forme longue FLIP<sub>L</sub> et la forme courte FLIP<sub>S</sub> (Kataoka 2005).

Son rôle fut longtemps incertain. Des expériences utilisant un niveau physiologique d'expression de FLIP dans les cellules ont permis de régler l'ambiguïté et d'approuver son rôle anti-apoptotique. Ces résultats furent confirmés par le knock-out de FLIP chez la souris (Yeh, Itie et al. 2000).

- La famille des IAPs (Inhibitors of apoptosis):

La famille se compose de 8 membres : cIAP-1, c-IAP-2, XIAP, NAIP, Apollon, Survivin, ML-IAP. La structure des IAP est caractérisée par la présence de deux motifs : d'une part BIR (Baculovirus IAP Repeat) qui est une séquence N-terminale de liaison au zinc représenté 1 à 3 fois et est essentielle à l'activité anti-apoptotique des IAP et d'autre part, un motif C-terminal RING capable lui aussi de lier le zinc. cIAP-1 et cIAP-2 ont également un motif CARD. cIAP-1, cIAP-2 et XIAP agissent directement en inhibant les caspases-3,7 et 9 (Deveraux, Takahashi et al. 1997; Deveraux, Takahashi et al. 1997).

- SMAC (Second mitochondrial activator of apoptosis)/DIABLO (Direct IAP binding protein with low pI):

La mitochondrie ne participe pas à l'apoptose seulement en activant la caspase-9 par la libération du cytochrome c, mais aussi en levant l'inhibition éventuelle exercée par les IAP en libérant un autre facteur : SMAC/Diablo. Il est libéré dans le cytoplasme en même temps que le cytochrome c lors de l'apoptose. Il séquestre XIAP et sûrement d'autres IAP rétablissant ainsi l'activité des caspases (Du, Fang et al. 2000; Srinivasula, Hegde et al. 2001).

Cependant les souris SMAC/Diablo<sup>-/-</sup> conservent la sensibilité face à plusieurs stimuli d'apoptose y compris via Fas (Okada, Suh et al. 2002). Ces contradictions

fonctionnelles rendent difficile l'appréciation de la contribution de cette protéine à l'apoptose via les DR.

## 2.2. L'élimination des cellules dendritiques

Comme les lymphocytes spécifiques sont rares, la durée de vie des DC ainsi que leur stade de maturation sont des paramètres essentiels à la bonne marche de la réponse immunitaire. Durant leur cycle de vie, le destin des DC est influencé par plusieurs facteurs environnementaux qui affectent leur homéostasie et leur viabilité. Selon le stade de maturation des DC, les mêmes signaux peuvent exercer des effets pro- ou anti-apoptotiques.

La survie des DC est augmentée autant par les signaux pro-inflammatoires (Dzionek, Inagaki et al. 2002; Park, Lee et al. 2002; Franchi, Condo et al. 2003; De Trez, Pajak et al. 2005) que par ceux provenant des lymphocytes T (Ludewig, Graf et al. 1995; Bjorck, Banchereau et al. 1997; Koppi, Tough-Bement et al. 1997; Wong, Josien et al. 1997; Esche, Gambotto et al. 1999; Kalled, Cutler et al. 2001; Kim, Choe et al. 2001; Chen, Xu et al. 2004; Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004). Ces signaux permettent l'expression de molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bjorck, Banchereau et al. 1997; Wong, Josien et al. 1997), de la famille des IAP (Park, Lee et al. 2002), mais aussi de FLIP (Bjorck, Banchereau et al. 1997; Ashany, Savir et al. 1999). Toutefois, l'utilisation de signaux reconnus pour induire la survie des DC immatures peut sous certaines conditions induire l'apoptose des DC matures (de Goer de Herve, Durali et al. 2005). Ceci permet de mettre un terme à la réponse immunitaire en éliminant la source d'activation : les DC matures.

Les mécanismes moléculaires conduisant à la survie/mort des DC restent encore obscurs. Effectivement, il semble difficile de distinguer quelles sont les voies impliquées dans la survie et celles qui mènent à la maturation des DC. Ces deux phénomènes semblent fortement liés. Quatre voies de signalisation impliquant les molécules de la famille des MAPK, des ERK et de Akt/PI3K, mais aussi de NF- $\kappa$ B ont été étudiées (Ardeshna, Pizzey et al. 2000; Park, Lee et al. 2002; Guo, Zhang et al. 2003; Kriehuber, Bauer et al. 2005). Il existe aussi une autre famille de molécules

qui semblent impliquer dans la survie des DC lors de la maturation, ce sont les caspases (Franchi, Condo et al. 2003; Wong, Santambrogio et al. 2004).

### 2.2.1. Les signaux sur le site d'infection

Lors d'une infection, des cytokines et des médiateurs pro-inflammatoires tels que le  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{IL-1}\beta$  sont sécrétés par les cellules environnantes. La présence de ces cytokines sur le site d'infection permet d'induire la maturation des DC immatures recrutées sur le site (Sallusto and Lanzavecchia 2000). En plus de ces molécules, les DC immatures sont exposées aux produits pathogènes comme le LPS ou les oligonucléotides CpG. Comme mentionné précédemment ces molécules, appelés aussi PAMP, signalent à travers les TLR, conduisant ainsi à la maturation des DC. Mais en plus d'induire la maturation, ces signaux sont aussi responsables de signaux de survie.

Durant l'inflammation, les prostaglandines (Baratelli, Krysan et al. 2005) ont été identifiées comme des régulateurs clé de la réponse immunitaire et pouvant moduler la survie des cellules immunitaires (Harris, Padilla et al. 2002). La  $\text{PGE}_2$  est à l'origine de différents effets qui sont spécifiques du type cellulaire et qui dépendent de la phase de maturation. Cette cytokine produite entre autre par les macrophages inhibe notamment l'apoptose des monocytes et des DC (Vassiliou, Sharma et al. 2004; Baratelli, Krysan et al. 2005). Baratelli *et al.* ont démontré que la  $\text{PGE}_2$  induit la survie des DC via l'augmentation de l'expression de survivine, molécule anti-apoptotique de la famille des IAPs. Suite au traitement des DC immatures avec la  $\text{PGE}_2$ , l'expression de survivine est augmentée alors que des traitements avec d'autres agents de maturation comme le LPS ou le  $\text{TNF}\alpha$  n'induisent pas cette expression. De plus, il est intéressant de souligner qu'une exposition des DC déjà maturées avec la  $\text{PGE}_2$  n'induit pas l'augmentation de survivine. Il semble donc que l'effet soit non seulement dépendant du type de stimulus mais aussi du stade de maturation des DC. De même, l'ordre dans lequel les stimuli sont ajoutés est important, puisque l'ajout des stimuli tous en même temps n'augmente pas significativement l'expression de survivine. De plus, la survivine est bien responsable de l'effet protecteur de  $\text{PGE}_2$  comme démontré par des expériences de siRNA. Si l'expression de la survivine est

inhibée, les cellules ne sont plus capables de résister à l'apoptose. Parmi les 4 récepteurs pour la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1-4</sub>), seuls les ARNm d'EP<sub>2</sub> et d'EP<sub>4</sub> ont été détectés chez les DC. Grâce à des agonistes de ces récepteurs, les auteurs démontrent une implication de ces deux récepteurs dans l'augmentation de l'expression de survivine. De plus, l'inhibition de la signalisation via PI-3K annule l'effet de PGE<sub>2</sub> sur l'expression de survivine (Baratelli, Krysan et al. 2005). La PGE<sub>2</sub> induit donc la survie des DC via l'augmentation de la molécule survivine résultant de l'activation de la voie PI-3K.

Cet effet de PGE<sub>2</sub> est confirmé par une étude chez la souris. Les DC issues de la moelle osseuse, stimulées avec de la PGE<sub>2</sub> sont résistantes aux stimuli d'apoptose comme les céramides. Cette résistance est aussi dépendante de l'activation des récepteurs EP<sub>2</sub> et EP<sub>4</sub> et implique la voie de signalisation de PI-3K. En fait, les auteurs ont démontré que la stimulation par PGE<sub>2</sub> diminue l'expression de certaines molécules pro-apoptotiques telles que Bad, de certaines caspases et de granzyme B (Vassiliou, Sharma et al. 2004).

Ces deux études démontrent la fonction de la PGE<sub>2</sub> lors d'une réaction. Effectivement, en plus d'induire l'expression de CCR7, récepteur nécessaire pour l'entrée dans les ganglions, elle induit une survie des DC immatures, prolongeant ainsi le temps de capture de l'antigène. La PGE<sub>2</sub> représente donc un facteur de survie des DC immatures.

La cytokine IL-2 est connue pour ses actions sur les lymphocytes T. Récemment il a été démontré que l'IL-2 est impliquée dans la régulation de l'expression de son récepteur CD25 à la surface des DC. Son action conduit à la survie des pDC et induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telle que le TNF $\alpha$  par des pDC déjà stimulées avec du CD40L ou CpG (Naranjo-Gomez, Oliva et al. 2007).

L'action de l'IL-10 sur l'inhibition de la maturation des DC est déjà connue (Buelens, Verhasselt et al. 1997; Morel, Quaratino et al. 1997) ainsi que son action apoptotique (Ludewig, Graf et al. 1995). Récemment il a été démontré que les DC traitées avec de l'IL-10 durant leur maturation sont plus sensibles à l'apoptose spontanée. Cette sensibilité provient de l'inhibition de l'augmentation de



l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x et Bfl1 (Chang, Baumgarth et al. 2007).

### 2.2.2. Les signaux dans les ganglions

CCR7 est le récepteur permettant aux cellules de migrer vers les ganglions. Il est exprimé par les DC matures en réponse à la PGE<sub>2</sub>. Mais il est aussi connu pour induire la survie des DC matures (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004). Il a été démontré que les DC matures résistent au manque de sérum si elles sont incubées avec les ligands de CCR7, CCL19 et CCL21. En fait, la fixation des ligands sur leur récepteur entraîne l'activation de Akt et par conséquent celle de NF-κB. Ces deux chémokines sont présentes dans le ganglion au niveau des zones riches en lymphocytes T. Il est connu que les DC terminent leur vie dans les ganglions après avoir interagi avec les lymphocytes T (Ingulli, Mondino et al. 1997; Kamath, Henri et al. 2002; Garg, Oran et al. 2003). La présence de ces deux facteurs permet la survie des DC suffisamment longtemps pour qu'elles puissent initier la réponse immunitaire.

Très tôt, il fut démontré que l'engagement de CD40 par son ligand CD40L, présent sur les lymphocytes T activés, conduisait à un signal de survie pour les DC (Ludewig, Graf et al. 1995; Esche, Gambotto et al. 1999; Miga, Masters et al. 2001). Non seulement, CD40 inhibe l'apoptose spontanée des DC immatures (Ludewig, Graf et al. 1995), mais aussi celle induite par les tumeurs (Esche, Gambotto et al. 1999). L'expression de CD40 par les cellules tumorales résulte en l'inhibition de la croissance tumorale ; cet effet est inhibé chez les souris IL-12<sup>-/-</sup>. Les analyses immunohistochimiques démontrent une infiltration de DC dans la tumeur exprimant CD40. Ce phénomène est expliqué par une protection des DC face à l'apoptose induite par la tumeur, suite à leur stimulation via CD40 (Esche, Gambotto et al. 1999). Cette protection a été confirmée par une autre étude où la persistance des DC et des lymphocytes T dépend de l'interaction CD40-CD40L (Miga, Masters et al. 2001). L'absence de cette interaction n'influence pas l'expansion initiale des lymphocytes T, mais celle-ci n'est pas soutenue au cours du temps, sûrement parce que les DC disparaissent. Par conséquent, l'engagement de CD40 sur les DC immatures entraîne non seulement l'augmentation de la capacité de présentation des

DC, en d'autre terme la maturation mais aussi une survie de celle-ci pour qu'elles effectuent leur travail de cellule présentatrice d'antigène (Miga, Masters et al. 2001).

En fait, la communication entre les DC et les lymphocytes T dans des conditions inflammatoires induit la survie des DC. Moser M. *et al.* ont émis l'idée que suite à un signal pro-inflammatoire, (comme le LPS) les DC sont programmées à mourir (De Smedt, Pajak et al. 1998). Suite à l'injection de LPS *in vivo*, les DC de la rate migrent vers les ganglions, où elles meurent très rapidement après être entrées dans la zone T du ganglion. Toutefois, l'injection de l'antigène ovalbumine (OVA) retarde grandement cette disparition. Les auteurs en concluent que l'interaction avec les lymphocytes T sauve les DC de cette apoptose prématurée.

Ces expériences posent l'hypothèse que la survie des DC est continuellement remise en question. Les signaux pro-inflammatoires peuvent être inducteur de survie comme la PGE<sub>2</sub> (Kierstcher, Luo et al. 2000) ou IL-2 (Naranjo-Gomez, Oliva et al. 2007). Toutefois *in vivo*, il est démontré que le LPS induit une diminution dans le nombre de DC à moins que celles-ci n'interagissent avec les lymphocytes T de manière antigène spécifique. Puis les DC matures disparaissent du ganglion, sûrement éliminées par apoptose (Ingulli, Mondino et al. 1997; de Goer de Herve, Durali et al. 2005).

### 2.2.3. Le lien entre survie/maturation: MAPK, ERK, Akt/PI3K

D'après plusieurs études, il semble que les agents inducteurs de la maturation des DC, que ce soit des cytokines ou des molécules exprimées par les lymphocytes T, soient aussi responsables de la survie des DC. Suite à la découverte de ces inducteurs, les voies de signalisation furent explorées. L'implication de chacune des voies de signalisation (MAPK, ERK, Akt/PI3K ou NF- $\kappa$ B) a été étudiée, mais il a été difficile de déterminer leur rôle soit dans la survie soit dans la maturation.

Une étude de Ricciardi-Castagnoli a démontré que le LPS activait les voies de signalisation de NF- $\kappa$ B et de ERK (Rescigno, Martino et al. 1998). Dans leurs expériences, le LPS induit la maturation des DC via la voie NF- $\kappa$ B. Une inhibition de cette voie au cours de la stimulation entraîne un blocage de la

surexpression du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation, évènement clé de la maturation. En revanche, bloquer la voie ERK conduit à l'apoptose des DC. Les auteurs corrèlent cette mort des cellules avec un blocage de la sécrétion du TNF $\alpha$ , facteur de survie connue des DC. Cette étude est contredite par une autre effectuée *in vivo*, suggérant les limites entre les expériences *in vitro* et *in vivo*. Comme mentionné précédemment, De Smedt *et al.* démontrent qu'*in vivo*, les DC stimulées par le LPS disparaissent très rapidement des ganglions, à moins d'interagir avec les lymphocytes T (De Smedt, Pajak *et al.* 1998). Les résultats ne sont pas non plus reproductibles chez l'humain (Ardeshna, Pizzey *et al.* 2000). L'activation de DC dérivées à partir de monocytes conduit effectivement à l'activation des voies de p38SAPK, de Akt/PI3K mais aussi de NF-kB. La voie p38SAPK est impliquée, elle aussi, dans la régulation de l'expression des molécules de co-stimulation mais pas du CMH de classe II. Quant à la survie, elle est sous la dépendance de la voie d'Akt/PI3K. L'inactivation de la voie NF-kB touche la maturation (pas d'augmentation du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation). Toutefois, la survie n'a pas été évaluée dans ce cas-ci où la voie NF-kB est inhibée. Il n'est donc pas certain que la voie Akt/PI-3K soit la seule voie responsable de la survie des DC. Plus récemment, il fut démontré que la survie des DC dépendait de la balance entre la voie NF-kB et JNK/AP-1 (Kriehuber, Bauer *et al.* 2005). Cette étude confirme le rôle anti-apoptotique de NF-kB. Il semble que la stimulation de la voie NF-kB bloque la voie JNK/AP-1, source de radicaux libres induisant la mort de la cellule. Ce papier décrit donc un contrôle au niveau transcriptionnel de la survie des DC, qui résulte du dosage de la voie NF-kB et de JNK/AP-1.

#### 2.2.4. Le rôle controversé de Fas

Fas appartient à la superfamille des TNFR. Son premier rôle décrit est celui d'inducteur d'apoptose (McLellan, Terbeck *et al.* 2000). Suite à son engagement par son ligand, FasL, des signaux de mort cellulaire sont transmis à la cellule. Il est considéré comme jouant un grand rôle dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire et dans la protection des sites immunitaires privilégiés. Plus récemment,

une autre fonction, antithétique a été attribuée à Fas : celle de transmettre des signaux d'activation, de prolifération et ainsi de contribuer à la réaction inflammatoire. Ces deux rôles ont été décrits chez les DC. Plusieurs travaux permettent d'affirmer que seules les DC immatures sont sensibles à l'apoptose induite via Fas alors que d'autres études montrent que les DC sont résistantes à Fas quel que soit leur stade de maturation (Bjorck, Banchereau et al. 1997; Koppi, Tough-Bement et al. 1997; Kawamura, Azuma et al. 1999; Matsue, Edelbaum et al. 1999; Chattergoon, Kim et al. 2000; Kawamura, Azuma et al. 2000; Leverkus, Walczak et al. 2000; McLellan, Terbeck et al. 2000; Servet-Delprat, Vidalain et al. 2000; Frasca, Scotta et al. 2002; Lundqvist, Choudhury et al. 2002; Nat, Radu et al. 2002; Hoves, Krause et al. 2003; Yokota, Oikawa et al. 2003; Chen, Xu et al. 2004).

- Rôle anti-apoptotique de Fas

Ashany *et al.* ont démontré que les DC murines dérivées de la moelle osseuse (bmDC) traitées avec GM-CSF, de l'IFN $\gamma$  ou du TNF $\alpha$  sont résistantes à l'engagement de Fas par l'anticorps Jo-2 malgré l'expression de Fas à leur surface (Ashany, Savir et al. 1999). Pour vérifier si d'autres signaux via les molécules d'adhésion ou les co-récepteurs sont nécessaires pour induire une apoptose, les bmDC ont été mises en présence de lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th1 exprimant FasL après activation. Même avec ce système plus physiologique, les bmDC n'entrent pas en apoptose. Comme les DC représentent une population hétérogène, des DC extraites de la rate de souris ont été testées pour leur sensibilité face à l'engagement de Fas dans le même système que cité précédemment. Que les cellules soient utilisées tout de suite ou qu'elles soient gardées en culture durant toute la nuit avec du GM-CSF, leur résistance face à Fas est équivalente et ce, même si les DC expriment Fas à leur surface durant la nuit. Ceci démontre que les DC sont insensibles à l'apoptose via Fas et ce, quelle que soit leur origine. Cette résistance pourrait représenter une aide pour les DC en les protégeant face aux lymphocytes T activés qui expriment FasL et en leur laissant plus de temps pour activer la réponse (Ashany, Savir et al. 1999).

Cette observation a été confirmée et complétée par une autre étude. Il a été démontré que lors de l'engagement de Fas sur des DC, qu'elles soient humaines, murines, immatures ou matures non seulement celles-ci ne mourraient pas mais cela

induisait la maturation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Cet effet a été démontré tant chez l'humain que chez la souris. En présence de FasL, les marqueurs de maturation des DC tels que CD83, CD86 ou HLA-DR augmentent et les DC sécrètent beaucoup plus d'IL-1 $\beta$  que des cellules stimulées avec du LPS. En revanche, la quantité de TNF- $\alpha$  reste la même et le taux d'IL-12 est vraiment très bas. De plus, les deux stimulations (LPS +FasL) entraînent une réponse cumulative. En fait, le groupe de Ricciardi-Castagnoli a démontré un effet pro-inflammatoire de Fas sur les DC (Rescigno, Piguet et al. 2000). Il existe d'autres études où l'engagement de Fas induit une prolifération des cellules et non une apoptose. Lors d'une stimulation au-dessus du seuil optimal du TCR, Fas se comporte comme un récepteur activateur, dont l'engagement induit la prolifération cellulaire. De plus, il a été proposé que Fas soit impliqué dans la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T activés (Alderson, Armitage et al. 1993). Les DC seraient protégées de l'apoptose induite via Fas grâce à l'expression constitutive de FLIP (Rescigno, Piguet et al. 2000). Par la suite, le mécanisme par lequel l'engagement de Fas produit un tel effet a été élucidé. La maturation induite par l'engagement de Fas serait le résultat de la phosphorylation de kinase régulée par les signaux extracellulaires ERK1/2, l'activation de caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$ . Effectivement, l'inhibition spécifique d'ERK1/2 lors de la stimulation via Fas entraîne une diminution de l'activation de caspase-1, ainsi que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et du phénotype de maturation. En revanche, le blocage de l'IL-1 $\beta$  par un anticorps entraîne seulement la perte de la maturation. En fait, l'engagement de Fas entraîne la phosphorylation d'ERK1/2 puis l'activation de caspase-1, d'où la sécrétion d'IL-1 $\beta$  qui induit la maturation d'une manière autocrine. En revanche, la protection des DC immatures face au signal pro-apoptotique de Fas est assurée par l'activation de NF-kB. Effectivement si la voie NF-kB est bloquée, l'engagement de Fas entraîne l'apoptose des DC sans toutefois modifier la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et la maturation (Guo, Zhang et al. 2003). En conclusion, l'engagement de Fas conduit à l'activation de la voie ERK d'où la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et l'induction du phénotype mature. En revanche, la survie des DC immatures est indépendante de la présence d'IL-1 $\beta$ , mais est la conséquence de l'activation de la voie NF-kB. La raison pour laquelle l'engagement de Fas induit

l'activation de NF-kB et non les voies apoptotiques reste un sujet non éclairci (Guo, Zhang et al. 2003). Plus récemment, une équipe propose que le signal via Fas fasse le pont entre la réponse immunitaire innée et acquise par l'induction de la sécrétion de chémokines CC et CXC (MIP-2, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 et RANTES) par les DC stimulées. De ce fait, ces cellules sont une source attractive et activatrice pour les neutrophiles ainsi que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et ce autant *in vitro* qu'*in vivo*. Démontrée par des expériences d'inhibition des voies de signalisation, cette sécrétion est dépendante de l'activation des cascades d'activation de Ras/Raf/MEK/ERK et non de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ . En revanche, NF-kB ne joue pas de rôle dans cette sécrétion de cytokines (Guo, Zhang et al. 2005), tout comme dans l'étude précédente (Guo, Zhang et al. 2003). Cependant les auteurs n'ont pas testé l'apoptose suite à l'inhibition de NF-kB (Guo, Zhang et al. 2005). Il semble donc que l'engagement de Fas sur des DC immatures entraîne l'induction de la maturation et de la survie, mais aussi le recrutement et l'activation de neutrophiles et de lymphocytes T via la sécrétion de cytokines et de chémokines. L'activation de la voie ERK, mais aussi des caspases et de NF-kB joue des rôles différents dans ces deux fonctions (maturation et survie) conduisant à une amplification de la réponse acquise et innée (Guo, Zhang et al. 2003; Guo, Zhang et al. 2005). La résistance à l'apoptose des DC face à l'engagement de Fas est expliquée par une expression constitutive de FLIP, molécule inhibant l'apoptose induite par l'engagement de Fas (Rescigno, Piguet et al. 2000; Willems, Amraoui et al. 2000).

- Rôle pro-apoptotique de Fas

Une partie de la littérature rapporte aussi une fonction mortelle de Fas. Il semble donc que la fonction de Fas chez les DC soit comme chez les lymphocytes T : dépendante des conditions de culture et d'activation. Fas peut aussi bien être à l'origine d'un signal activateur que d'un signal pro-apoptotique.

D'après plusieurs études, les DC immatures sont sensibles à l'apoptose induite via Fas, alors que les DC matures sont protégées contre cette mort (Bjorck, Banchemereau et al. 1997 ; Koppi, Tough-Bement et al. 1997 ; Kawamura, Azuma et al. 1999 ; Matsue, Edelbaum et al. 1999 ; Chattergoon, Kim et al. 2000 ; Kawamura, Azuma et al. 2000 ;

Leverkus, Walczak et al. 2000 ; McLellan, Terbeck et al. 2000 ; Servet-Delprat, Vidalain et al. 2000 ; Frasca, Scotta et al. 2002; Lundqvist, Choudhury et al. 2002 ; Nat, Radu et al. 2002 ; Hoves, Krause et al. 2003 ; Yokota, Oikawa et al. 2003 ; Chen, Xu et al. 2004 ). Toutefois, les DC immatures et matures expriment le même taux de Fas à leur surface, et il en est de même pour d'autres récepteurs de mort comme les TRAIL-R1-4 (Leverkus, Walczak et al. 2000). Durant leur différenciation les DC perdent leur sensibilité à Fas. Au jour 3 de culture les DC sont très sensibles à l'apoptose induite via Fas mais aussi via TRAIL. Au jour 7 de culture, où les DC sont considérées immatures, elles sont encore sensibles alors qu'au jour 10 de culture avec un agent de maturation, elles deviennent insensibles à l'apoptose quel que soit le stimulus. Cette résistance concorde avec une augmentation de l'expression de FLIP durant la maturation (Leverkus, Walczak et al. 2000). Cette sensibilité différentielle selon le stade de différenciation a été confirmée chez la souris (McLellan, Terbeck et al. 2000). En fait, au cours de leur maturation, les DC perdent leur sensibilité à Fas, mais en acquièrent une face à l'engagement du CMH de classe II. Les auteurs proposent ce système pour expliquer l'élimination des DC suite à leur rencontre avec le lymphocyte T (Leverkus, Walczak et al. 2000 ; McLellan, Terbeck et al. 2000).

Il est démontré dans la littérature que RANK/RANKL induit la maturation et la survie des DC (Anderson, Maraskovsky et al. 1997). Récemment un lien direct entre les voies de signalisation de RANKL et de Fas vient d'être établi (Izawa, Ishimaru et al. 2007). Les souris déficientes pour Fas (MLR/lpr) présentent un taux plus élevé de DC ainsi qu'une sécrétion de cytokines plus importante et une meilleure activation de NF- $\kappa$ B en présence de RANKL (Izawa, Ishimaru et al. 2007). En fait, la stimulation des DC via RANK augmente l'expression de Bcl-2 et de Bcl-xL et diminue celle de Bax et de Bid. Cette régulation des membres de la famille Bcl-2 induit un statut anti-apoptotique des DC. Toutefois RANKL induit aussi l'expression de Fas sur les DC et par conséquent augmente la sensibilité des DC à l'apoptose induite par Fas lorsque les deux stimuli sont utilisés en même temps. L'effet pro-apoptotique des stimuli utilisés en même temps semble dépendant de l'inhibition de l'expression de FLIP<sub>L</sub> (Izawa, Ishimaru et al. 2007).

#### 2.2.4.1. Élimination par les lymphocytes activés

Il est reconnu que lorsque les DC sont matures, elles stimulent les lymphocytes. Mais il est démontré que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés (Medema, Schuurhuis et al. 2001) et les cellules NK activés (Carbone, Terrazzano et al. 1999; Wilson, Heffler et al. 1999; Spaggiari, Carosio et al. 2001; Ferlazzo, Tsang et al. 2002) étaient capables de lyser les DC mais seulement les immatures.

Medema *et al.* démontre que la maturation permet l'augmentation de l'expression de PI-9 (protease inhibitor-9), une serpine qui confère une résistance à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques. Les serpines sont connues pour bloquer l'action des granzymes. Son expression est induite par la maturation causée par CD40L ou par LPS et elle est maintenue pendant très longtemps (72h post-maturation).

Il en est de même pour les cellules NK. Des NK activées lysent les DC immatures par exocytose des granules cytotoxiques. La maturation des DC les protègent contre cette lyse (Wilson, Heffler et al. 1999). De plus, il est démontré que l'IL-10 qui dirige la fonction des DC vers l'induction de la tolérance augmente fortement l'effet apoptotique des NK alors que le TNF $\alpha$  n'a pas d'effet (Carbone, Terrazzano et al. 1999). Une autre étude démontre que les récepteurs NKp46 et NKp30 interviendraient dans cette lyse. Effectivement, des NK exprimant fortement ces récepteurs induisent une meilleure lyse que des NK exprimant faiblement ces récepteurs. L'action de ces récepteurs activerait la PI-3K (phosphatidylinositol-3 kinase) (Spaggiari, Carosio et al. 2001). Les mécanismes d'interaction sont mieux décrits dans une étude de Ferlazzo et al. Les auteurs démontrent que des NK non activés sont activés autant par des DC immatures que matures. Toutefois il existe une boucle de régulation négative. Une fois activé, les NK sont capables de lyser les DC immatures mais pas les matures. La protection des DC matures vient de la forte expression du CMH de classe I. Il semblerait que NKp30 est impliqué dans ce phénomène de lyse (Ferlazzo, Tsang et al. 2002).



- Cette lyse des DC par les NK permettrait de réguler la réponse immunitaire. Il est déjà prouvé que les NK exercent une action régulatrice. Effectivement l'EAE (experimental autoimmun encephalitis) se développe de manière plus agressive chez des souris déplétées en NK. Ceci démontre que les NK ont une action négative sur la réponse inflammatoire (Zhang, Yamamura et al. 1997).

#### 2.2.4.2. Effet de la survie des DC sur la réponse immunitaire

Il est démontré que la dérégulation du statut apoptotique des DC résulte en la génération de maladies.

La persistance des DC due à une résistance à l'apoptose provoque la génération de syndromes autoimmuns (Wang, Zheng et al. 1999; Kalled, Cutler et al. 2001; Chen, Wang et al. 2006; Chen, Huang et al. 2007).

En fait la résistance à l'apoptose soit par l'expression forcée d'une molécule anti-apoptotique comme p35 (baculoviral inhibitory caspase protein) ou l'extinction d'une protéine pro-apoptotique comme Bim conduit à l'activation spontanée des lymphocytes T et à une autoimmunité systémique (Chen, Wang et al. 2006; Chen, Huang et al. 2007).

Chez l'homme, il existe un syndrome autoimmun lymphoprolifératif de type II (ALPS de type II). IL est dû à une mutation non sens dans le gène de caspase-10. Celle-ci intervient au niveau de la voie de signalisation des TNF-R. Son absence provoque l'accumulation de DC matures dans les ganglions. Ces DC sont résistantes à l'apoptose induite via TRAIL (Wang, Zheng et al. 1999).

Chez la souris, il existe un modèle pour le lupus érythémateux systémique, les souris SNF. Ces souris présentent un nombre élevé de DC au niveau de la rate. Par ailleurs un traitement avec un anti-CD40L provoque une amélioration de la maladie (Kalled, Cutler et al. 2001).

Une meilleure connaissance de l'apoptose chez les DC peut conduire à l'élaboration de traitement pour des maladies.

## **JUSTIFICATIONS ET OBJECTIFS**

Chaque étape de la vie des DC est soumise à un point de contrôle pour éviter qu'une réponse inadéquate ne soit générée. Comme nous l'avons décrit précédemment, de nombreux stimuli influencent la survie et la mort des DC.

La survie des DC semble cruciale pour la longévité de la réponse immunitaire. En effet l'interaction CD40-CD40L engendre la survie des DC, d'où une persistance des lymphocytes T et une réponse immunitaire plus soutenue (Miga, Masters et al. 2001). Comme présenté par De Smedt *et al.*, suite à leur activation par le LPS et à leur migration dans le ganglion, les DC disparaissent rapidement mettant ainsi fin à la réponse. Si la stimulation via le LPS est soutenue par un antigène spécifique, la disparition des DC est ralentie, prolongeant de fait la réponse. Cette étude nous démontre clairement que le contrôle de la survie des DC influence la réponse immunitaire (De Smedt, Pajak et al. 1998). De même, Chen *et al.* démontrent qu'une survie prolongée des DC engendre l'apparition de syndrome auto-immun (Chen, Wang et al. 2006). De fait il devient important de mieux connaître les mécanismes qui régissent la survie et la mort des DC.

### **I-Implication de la voie Fas lors de la maturation des DC**

Fas est le TNFR le plus étudié. Il est impliqué dans plusieurs processus immunologiques comme le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T (Adam-Klages, Adam et al. 2005) mais la voie Fas est aussi utilisée par les CTL pour tuer leurs cellules cibles (Danial and Korsmeyer 2004). La différence entre le phénotype d'une souris déficiente pour le gène Fas et celui d'une souris déficiente pour ce gène seulement chez les lymphocytes T sous-entend qu'il existe un autre sous-type cellulaire impliqué dans le développement de l'autoimmunité des souris déficiente pour Fas (Hao, Hampel et al. 2004). Effectivement une souris déficiente pour l'expression de Fas dans tout son système conduit au développement d'une autoimmunité systémique, alors qu'une souris déficiente pour Fas seulement dans les cellules T aboutit à une sévère lymphopénie ainsi qu'à la surexpression de FasL sur les cellules T activées et une infiltration massive de leucocytes dans les poumons (Hao, Hampel et al. 2004). Cette déficience de Fas seulement dans les cellules T alors que l'environnement exprime Fas conduit donc à un bri dans l'homéostasie des

cellules T (Hao, Hampel et al. 2004). En outre, des patients possédant une mutation dans le gène caspase-10 démontrent une accumulation de DC dans les ganglions (Wang, Zheng et al. 1999). Il est probable qu'une survie prolongée des DC conduise à un état d'activation chronique des lymphocytes T ou B, d'où le développement de l'autoimmunité (Chen, Wang et al. 2006). Toutefois le rôle de Fas chez les DC reste très controversé. Nous avons donc voulu étudier le rôle de Fas lors de la maturation des DC.

- Dans un premier temps, nous avons vérifié l'expression de Fas sur les DC immatures et matures. L'aboutissement de la stimulation via Fas sur les DC était un sujet à controverse, nous avons vérifié l'effet de l'engagement de Fas sur les cellules dans notre système. Pour cela, nous avons utilisé la cytométrie en flux. Nous avons également cherché pourquoi les résultats divergeaient d'une étude à l'autre.

- Nous avons démontré que l'engagement de Fas provoque l'apoptose des DC immatures, mais pas des DC matures. Nous avons voulu déterminer le mécanisme d'action.

- Nous avons tout d'abord déterminé l'implication de la mitochondrie dans ce processus et ce par des techniques biochimiques et de cytométrie en flux.

- Puis nous avons étudié les composants du DISC. Pour cela, nous avons utilisé des techniques biochimiques.

- Finalement, nous avons essayé d'identifier ce qui conférait la résistance aux DC matures.

Nous avons donc étudié l'expression des gènes anti-apoptotiques. Nous avons utilisé des biopuces à ADN pour déterminer le contenu en ARN et confirmer par une autre technique, la protection à la RNase (RPA). Ensuite, nous avons étudié le contenu protéique par la technique de powerblot.

## **II- Modulation de l'expression génique des DC par la maturation**

Les DC immatures et matures sont différentes de par leur localisation, phénotypes et fonctions suggérant un changement dans le profil d'expression génique. Nous avons déterminé que la maturation induisait une protection des DC face à l'apoptose induite par Fas. Il était déjà démontré que lors de la maturation, les

DC sont protégées de la lyse induite par les CTL par la surexpression de PI9 (protease inhibitor-9) (Medema, Schuurhuis et al. 2001). Dans le but de mieux connaître les changements apportés par la maturation au niveau de l'apoptose, nous avons décidé d'étudier le transcriptome des DC, déterminant majeur de la fonction et du phénotype cellulaire (Staudt and Brown 2000). La différence observée dans l'expression des gènes peut être indicative des changements de phénotype et de fonctions induits par des facteurs environnementaux. Des études précédentes ont exploitées la technologie des biopuces à AND pour découvrir de nouveaux partenaires impliqués dans la régulation de la réponse innée et adaptative. Ces études ont permis identifier des gènes impliqués dans la discrimination des sous-types de réponses Th1 et Th2 chez l'humain (Rogge, Bianchi et al. 2000) et dans la séparation des lymphocytes B activés et anergiques chez la souris (Glynne, Akkaraju et al. 2000). Cette technologie de biopuce à ADN est donc une approche valide pour étudier les différences entre les sous-types cellulaires. Dans le cas des DC, le profil transcriptionnel des DC immatures et matures a déjà été étudié (Hashimoto, Suzuki et al. 2000). Cette approche est donc utile pour l'étude de l'effet de la maturation sur les DC au niveau de l'expression des gènes reliés à l'apoptose.

- Nous avons confirmé que la résistance des DC face à l'apoptose induite via Fas pouvait être générée par d'autres stimuli de maturation. De plus, nous avons déterminé quelles molécules anti-apoptotiques conféraient en partie la résistance.

- Comme la maturation induisait une protection face à l'apoptose induite par l'engagement de Fas, nous avons voulu savoir si d'autres voies d'apoptose étaient modifiées durant la maturation. Pour obtenir une idée plus claire de ces modifications dues à la maturation, nous avons comparé l'expression génique des DC traitées par des cytokines pro-inflammatoires, du LPS ou non-traitées au cours du temps par puces d'ADN.

- Suite à l'analyse des données, nous avons déterminé des voies de signalisation reliées à l'apoptose. Nous avons confirmé les changements observés par une autre méthode de quantification de l'ARN : des protections à la RNase.

# **CHAPÎTRE 1**

## CONTRIBUTIONS

Les auteurs de ce papier sont au nombre de cinq. En tant que premier auteur, j'ai planifié et pensé les expériences. Mais j'ai également effectué le travail technique, c'est-à-dire les expériences citées dans le papier mais aussi toutes les mises au point. De plus, j'ai écrit la première version du papier et participé aux corrections de l'écriture du papier. Le deuxième auteur, Ehssan Sharif-Askari, a corrigé et amélioré la version écrite du papier. Gaëlle Breton a été impliquée dans des expériences portant sur l'activation de NF- $\kappa$ B et de diverses kinases durant la maturation ; celles-ci ont été exécutées après mon départ, mais ne sont pas incluses dans le papier. Rafick-Pierre Sékaly a dirigé les expériences en tant que directeur de laboratoire et corrigé la version écrite papier. De même, Sylvie Beaulieu a co-dirigé le travail.

## RESUMÉ

Les cellules dendritiques (DC) sont de plus en plus utilisées comme adjuvants dans le traitement contre le cancer et contre les maladies infectieuses chez l'homme et les primates non humains. L'utilisation clinique des DC comme vaccins anti-tumorales peut dépendre de leur potentiel de survie. Celui-ci est en outre régulé par les membres de la famille des "tumor necrosis factor (TNF) ligands/receptor" (TNFR). Cependant les mécanismes régissant la protection des DC face à l'apoptose durant leur maturation sont mal déterminés. L'analyse des voies de signalisation apoptotiques des DC immatures et matures révèle que la maturation des DC apporte une protection à plusieurs niveaux contre l'apoptose induite par les TNFRs. La formation du complexe apoptotique périmembranaire (DISC) est inhibée par l'augmentation de c-FLIP lors de la maturation. La voie apoptotique dépendante de la mitochondrie est fortement inhibée par l'augmentation des niveaux d'expression des molécules anti-apoptiques de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, et Bfl-1. Pour assurer une protection complète face à l'apoptose, l'expression des molécules appartenant à la famille des IAP est aussi augmentée, en particulier celle de IAP2. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'un changement moléculaire dans la cascade apoptotique relié à la maturation des DC. Ce nouvel état confère une protection complète contre l'apoptose induite par les TNFRs, conduisant à une survie éventuelle des DC en présence des lymphocytes T effecteurs ou d'autres stimuli apoptotiques.



**Multi-level regulatory mechanisms of dendritic cell survival: role of mitochondrial anti-apoptotic pathways**

**Running title:** Protection from Fas engagement during DC maturation

Sandrine Crabé<sup>1,3</sup>, Ehssan Sharif-Askari<sup>2</sup>, Gaëlle Breton<sup>1,3</sup>, Sylvie Beaulieu<sup>1,3</sup>, and Rafick-Pierre Sékaly<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'immunologie, Centre de Recherche CHUM Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada, H2X1P1. <sup>2</sup>Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T3J7. <sup>3</sup>Laboratoire d'immunologie, Département de Microbiologie et d'Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T1J4. <sup>4</sup>INSERM U743, CR-CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2X1P1.

\* **Corresponding Author:** Dr. Rafick-Pierre Sékaly, Centre de Recherche, Hôpital St. Luc, Pavillon Edouard-Asselin, 264, Boulevard René Lévesque Est, Bureau 1307D, Montréal, Québec, H2X 1P1, Canada. Tel: (514) 890-8000 Ext: 35289, Fax: (514) 412-7415. e-mail: [rafick-pierre.sekaly@umontreal.ca](mailto:rafick-pierre.sekaly@umontreal.ca)

**Text word count:**

**Abstract word count: 199**

**Scientific Heading:** Immunobiology

**Abstract**

Dendritic cells (DCs) are used as adjuvants for the treatment of cancer and infectious diseases in human and nonhuman primates. The clinical use of DC as tumor vaccines is highly dependent on their survival potential that is mainly regulated through members of the tumor necrosis factor (TNF) receptor/ligands superfamily. However, little is known about the underlying mechanisms by which DC are protected from death during their maturation. Analysis of apoptotic pathways in immature and mature DC revealed that DC maturation provides a multi-level protection against death receptor-induced apoptosis. The plasma membrane proximal DISC formation was inhibited by the upregulation of c-FLIP in mature DC. The mitochondrial-dependent apoptotic pathway was tightly inhibited by the increased expression levels of anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family such as Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, and Bfl-1. To assure a full protection from unregulated mitochondrial cell death during DC maturation, the expression levels of IAP family members in particular c-IAP-2 were also increased. These data provide evidence for a molecular switch in signaling pathway of apoptotic cascade concomitant with DC maturation that offers complete protection from death receptor-mediated cell death; thus, allowing DCs to survive in the presence of effector T cells and others bystander apoptotic stimuli.

## Introduction

Dendritic cells (DCs) constitute the most efficient antigen-presenting cells found in all peripheral organs and lymphoid tissues. *In vivo*, DCs are found in two states: immature (iDC), and mature DCs (mDC). iDC reside in peripheral tissues, such as the skin where they capture antigen, and then migrate to the draining lymphoid organs, where they prime both CD4<sup>+</sup> as well as CD8<sup>+</sup> T cells<sup>1</sup>. During this process, DCs rapidly undergo a process called maturation which is highlighted by the increase in their antigen-presenting ability and a decreased capacity to process antigen (mDC). This process of maturation can be induced by several stimuli including pro-inflammatory cytokines, ligands of Toll like receptor family like bacterial membrane and cellular products or upon the engagement of surface molecules such as CD40<sup>2</sup>. Knowledge of the fate of DCs after activation of cognate T cells is sparse. The mechanisms implicated in DC survival are poorly understood. One to two days after antigen presentation, DCs disappear from the lymph node, presumably by apoptosis<sup>3</sup>. It was demonstrated recently that effector memory CD8<sup>+</sup> T cells could migrate and enter into reactive lymph nodes, where they kill antigen-bearing DCs in a cognate-dependent manner<sup>4</sup>. Furthermore, revealing the mechanisms regulating DC survival and cell death during the maturation process is crucial for a better understanding of the regulation of antigen presentation in a physiologic as well as a therapeutic context.

Tumor necrosis factor (TNF) receptor/ligand families are critical players in the regulation of the immune response. The TNF receptor member Fas (CD95/APO-1) was originally identified through its role in mediating cell death known as

apoptosis, a programmed process that is regulated through a complex mechanism involving a family of cysteine proteases known as caspases <sup>6</sup>. Two main pathways of caspase activation leading to apoptosis have been described <sup>7</sup>. The intrinsic pathway (mitochondrial pathway) involves the disruption of the outer mitochondrial membrane barrier function, thus permitting the release of pro-apoptotic molecules such as cytochrome *c*, apoptosis-inducing factor (AIF), Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding protein with low PI), or endonuclease G from the mitochondria to the cytosol <sup>8</sup>. The release of cytochrome *c* into the cytosol triggers caspase-3 activation through the formation of the cytochrome *c*/Apaf-1/caspase-9-containing apoptosome complex, whereas Smac/DIABLO and Omi/HtrA2 promote caspase activation through neutralizing the inhibitory effects to the IAPs <sup>8</sup>. The extrinsic pathway (receptor pathway) is initiated by the engagement at the cell surface of death receptors such as Fas, tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors DR4 and DR5. In the presence of their respective ligands, death receptors recruit the adaptor molecule Fas-Associated Death Domain protein (FADD), which, in turn, recruits and activates an initiator enzyme, usually caspase-8, in the Death-Inducing Signaling Complex (DISC). Caspase-8 either directly activates the caspase cascade or connects the extrinsic to the intrinsic pathway through cleavage of the sentinel BH3-only protein Bid <sup>9</sup>. Cell death via death receptors can be regulated at different levels, including altered surface expression or through the inhibition of intracellular signaling events.

Signaling through Fas receptor have been shown to stimulate the proliferation of human T lymphocytes <sup>10,11</sup>, human chronic B lymphocytic leukemia cells <sup>12</sup>, and diploid fibroblasts <sup>13</sup>. Furthermore, Fas triggering can induce the secretion of cytokines by human fibroblasts (IL-6) <sup>14</sup>, and peritoneal exudate cells (IL-1 $\beta$ ) <sup>15</sup>. The mechanisms underlying the fate of DCs following the engagement of death receptor remain unclear. Several reports have demonstrated that engagement of Fas does not lead to cell death, but rather to DC maturation <sup>16-19</sup>. However, iDCs have been shown to be sensitive to engagement of the TNF receptor family resulting to the death by apoptosis. In contrast, the outcome of Fas triggering on mDCs is not clear <sup>20-25</sup>.

In the present study, we evaluated Fas responsiveness of DC along with their maturation process to identify the parameters that regulate DC viability during antigen presentation. Here, we show that DC maturation results in the rapid upregulation of anti-apoptotic proteins at different levels of the mitochondrial-dependent apoptotic cascades, ultimately leading to enhanced resistance of mDC against death receptor-mediated agonists.

## Materials and Methods

**Isolation of DCs.** CD14<sup>+</sup> cells were separated from peripheral blood mononuclear cells by using CD14 microbeads and AutoMACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) following the manufacturer's protocol and were cultured in RPMI medium 1640 (Sigma, St. Louis, MO) with L-glutamine, and non-essential amino acids (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario), and supplemented with 1% human serum (GemCell, Woodland, CA), GM-CSF (1500 U/ml, Cangene, Mississauga, Ontario, Canada) and IL-4 (10 ng/ml, R&D System, Minneapolis, MN) to generate DCs. Cells were fed on days 2 and 4 with the same concentration of cytokines. At day 6, most none adherent cells still expressed an immature HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, and CD83<sup>-</sup> DC markers. DC were matured by using an inflammatory cytokine mixture (MCM-mimic) consisting of IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), IL-6 (1,000 units/ml), and TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) (all from Biosource, Camarillo, CA) and prostaglandin E<sub>2</sub> (1  $\mu$ g/ml, Sigma, St. Louis, MO).

**Apoptosis Assay.** Apoptosis was induced with anti-Fas Abs (CH11) (1 $\mu$ g/ml, Immunotech, Marseille, France) added for the indicated times. Where indicated, cells were incubated with ZVAD-FMK (50 $\mu$ M, MP Biomedicals, Aurora, Ohio) for 2 hr before added anti-Fas Abs. Cells were also stimulated by recombinant human TRAIL (1 $\mu$ g/ml, R&D System, Minneapolis, MN) for the indicated time. Cell aliquots from each condition were resuspended and incubated for 15 min in binding buffer (10 mM of HEPES, 150 mM of NaCl, 5 mM of KCl, 1 mM of MgCl<sub>2</sub>, and 1.8 mM of

CaCl<sub>2</sub>/pH 7.4) containing 1 µg/ml propidium iodide (Sigma, St. Louis, MO) and 1 µg/ml FITC-conjugated annexin V (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada). Apoptosis was monitored by FACS using the FL-1 and FL-3 detectors on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada). Changes of mitochondrial membrane potential difference were measured by employing JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide), based on the living cell staining in a membrane potential-dependent fashion: green fluorescence ( $\lambda_{em} = 527$  nm) of JC-1 monomer and the red fluorescence ( $\lambda_{em} = 590$  nm) of JC-1 aggregates. Cell suspensions were incubated for 10 min at 37°C in PBS containing JC-1 (5µg/ml, Molecular Probes, Eugene, OR). The staining was monitored by FACScan flow cytometry using the FL-1 and FL-2 detector.

**DISC Immunoprecipitation.** DC ( $10 \times 10^6$ ) were left untreated or stimulated with 1 µg/ml anti-Fas Ab (CH-11, Immunotech, Marseille, France) for the indicated time points. The stimulation was then stopped with ice-cold PBS and cells were lysed on ice for 30 min in PBS containing 0.1% Nonidet P-40 detergent and protease inhibitors. Lysates from untreated cells were incubated with 1µg/ml of anti-Fas on ice for 30 min . Lysates were then centrifuged at 15000 rpm for 15 min at 4°C. Supernatants were incubated for 1 hr at 4°C with agarose beads coupled to goat anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) to immunoprecipitate CH-11 immune complexes. The beads were washed extensively with lysis buffer and subsequently recovered by centrifugation, resuspended in no reducing 2x loading

buffer, and boiled for 10 min. The composition of Fas complexes in different DISC elements was then analyzed by Western blot using the appropriate Abs.

**Immunoblotting.** Cell lysates (10–50  $\mu$ g protein/lane) and immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE on 12–15% gels and transferred to PVDF membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d’Urfé, Quebec, Canada). Membranes were blocked with 5% skimmed milk in PBS/0.5% Tween 20 (PBST) for 1 hr at room temperature, and then incubated with the appropriate Ab in the same solution overnight at 4°C. After three washes in PBST, blots were incubated for 1 hr at room temperature with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG, goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), goat anti-mouse IgG1 (SouthernBiotech, Birmingham, AL) or goat anti-rat IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL). Blots were then washed three times with PBST, revealed by incubation with ECL-Plus Western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d’Urfé, Quebec, Canada), and then developed on Kodak films. Values were obtained using ImageJ program (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007). Protein expression levels from iDC and mDC were normalized on  $\beta$ -actine values and fold increase were calculated (mDC/iDC).

**RNase protection assay.** DCs were treated in the presence or absence of LPS (20ng/ml), and MCM-mimic for 48 hr. Detection of specific mRNA was performed using 10  $\mu$ g mRNA as described in the procedures supplied by PharMingen. Scanning



of the radioactive gel was carried out with Phosphor imager analyzer. Values were obtained using ImageQuant 5.1 program. mRNA expression levels from iDC and mDC were normalized on GAPDH values.

**Antibodies.** All antibodies are used according to the instructions of the manufacturer: anti-FLIP mAbs (Dave 2; Alexis Biochemicals, San Diego, CA), anti-Fas (B-10, Santa Cruz, CA), anti-caspase8 (Ab-3, Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA), anti-Bid (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA), anti-FADD (BD Pharmingen, San Diego, CA), anti-caspase3 (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA), anti-Bcl-2 (Dako, Glostrup, Denmark). Anti-Bfl-1 was generated in our laboratory as previously described <sup>26</sup>.

**Flow cytometry analysis.** Surface markers expressed by DC were determined by flow cytometry using the following mAbs: FITC-conjugated anti-HLA-DR, FITC-conjugated anti-Fas (BD Pharmingen, San Diego, CA), and PE-conjugated anti-CD83 (Immunotech, Marseille, France). Cells were incubated with mAbs for 30 min on ice. After washing twice with PBS, cells were fixed in PBS containing 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and analyzed using FACSCalibur (BD biosciences, San Diego, CA).

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using the Student *t* test. *P* values of less than .05 were considered to indicate statistically significant differences.

## Results

### *DC maturation determines the effect of Fas signalling*

In order to explore the impact of DC maturation on Fas signaling, we employed an experimental system based on the activation and maturation of primary human iDC. PBMCs from leukapheresis samples were used to obtain CD14<sup>+</sup> cell-enriched fractions by magnetic bead separation. The purified monocytes were cultured for 6 days in medium supplemented with GM-CSF and IL-4. The generation of mDC was achieved by incubating human iDC with the maturation stimulus, a cocktail of proinflammatory cytokines to an additional 24 hr. MCM-mimic induces the homogeneous maturation of human DCs and yields high numbers of differentiated cells<sup>27</sup>. DC maturation was confirmed by flow cytometry. Incubation of DCs with the maturation cocktail led to the expression of several phenotype markers characteristic of mDCs such as HLA-DR, CD83, and CD86. Incubation of iDCs with MCM-mimic resulted in an increased expression of CD83 on HLA-DR<sup>+</sup> cells, confirming that iDC had matured to become mDC (n=3; Fig. 1A)<sup>1,5,28</sup>. This increase was not seen in the absence of MCM-mimic treatment (n=3; Fig.1A). Of note, levels of Fas receptor cell surface were not affected by the process of DC maturation as previously reported (n=3; Fig. 1B)<sup>16</sup>. We next examined the impact of Fas receptor engagement on iDC and mDC survival. iDC and mDC were treated with anti-Fas (CH-11) antibody for 18 hr and cell death was monitored by flow cytometry using annexin V/ PI staining. As shown in Figure 1C, results revealed that while iDC viability significantly decreased (76%) after 18 hr of Fas engagement, mDC viability rate was not significantly

affected (8%) as compared to mock-treated cells ( $n=3$ ,  $p<0,001$ ). Because DC maturation can be achieved by other molecular pathways, we also examined the effect of DC maturation with LPS or CD40 Ligand on Fas-induced apoptosis. We found that all stimuli rendered mDCs resistant to Fas-induced apoptosis as compared to iDC (data not shown). These findings clearly suggested that the maturation process of iDC to mDC negatively affects the mDC ability to be 'licensed' for cell death through Fas receptor despite expressing comparable levels of CD95. We next utilized the wide-range caspase inhibitor, zVAD to determine whether the induction of cell death in iDC after anti-Fas treatment was caspase-dependent. As shown in Figure 1D), pre-treatment of iDC with zVAD significantly prevented iDC from apoptosis ( $n=3$ ,  $p<0,001$ ). In contrast, zVAD had little impact on the viability of Fas treated mDC. Mock-treated iDC and mDC in the presence of zVAD were used as controls.

Both immature and mature DCs express tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL-R)<sup>29</sup>. To determine the impact of DC maturation on TRAIL-mediated apoptosis, iDC and mDC were treated with recombinant TRAIL or anti-Fas for 18 hr and cell death was monitored by flow cytometry using annexin V/ PI staining. Similar to anti-Fas, exposure of DCs to TRAIL resulted in cell death of iDC (55%) but not of mDC (36,3%;  $n=3$ ; Fig. 1C). However, iDC were less susceptible to TRAIL-induced apoptosis as compared to Fas-triggered cell death (55% versus 83%;  $n=3$ ; Fig. 1C). Together our results demonstrate that DC maturation renders cells resistant to Fas- and TRAIL-receptor mediated cell death.

***Fas engagement on iDC leads to mitochondrial-dependent apoptosis***

Caspases are intracellular proteases that work as executioners of cell death in response to several apoptotic stimuli<sup>30</sup>. To identify the molecular pathways that protect mDC from apoptosis, we first used Western blotting to confirm the cleavage of caspase-8 and caspase-3 after anti-Fas treatment. At the molecular level, the cleavage of caspase-8 and caspase-3 are hallmarks of Fas-induced apoptosis<sup>7,9</sup>. iDC and mDC were treated with or without anti-Fas for 18 hr, lysed and the lysates were subjected to immunoblotting. Consistent with the cell death results, anti-Fas treatment strongly induced caspase-8 (p54/52 procaspase-8 to the p43/41 and p18 active subunits) and caspase-3 (p32 procaspase-3 to the p19 and p17 active subunits) cleavage only in iDC but not in mDC cells (n=3; Fig. 2A). Of note the minimal processing of procaspase-8 (p54/52) to p43/41 detected in mDC lysates (n=3; Fig. 2A) was shown previously to have no pro-apoptotic activity<sup>31</sup>.

To characterize apoptotic pathways involved in the regulation of DC survival, we evaluated mitochondrial integrity in iDC and mDC exposed to anti-Fas treatment. Consistent with previous observations, anti-Fas was found to induce significant mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) loss only in iDC but not in mDC (Fig. 2B, 17% versus 4%, n=3). Receptor-mediated apoptosis induces mitochondrial damage through Bid activation, a member of Bcl-2 proapoptotic family, through its cleavage via caspase-8. Therefore, we next examined Bid cleavage in iDC versus mDC in the presence or absence of anti-Fas treatment. As shown in Figure 2C, the full-length Bid protein level almost completely disappears when iDC were treated with anti-Fas (n=3; Fig. 2C). Conversely, we detected an almost complete absence of

Bid processing when mDC were treated with anti-Fas (n=3; Fig. 2C). Together, these results indicated that mitochondrial damage occurred upstream of caspase activation induced by anti-Fas in iDC. In addition, we confirmed that mitochondrial damage in iDC was mediated through the cleavage of Bid.

### ***Inhibition of functional DISC assembly in mDC***

Death receptors of the TNF receptor superfamily signal for apoptosis via the ordered recruitment of FADD and caspase-8 to the DISC. C-FLIP prevents apoptosis induced by TNF family death receptors by binding to FADD and/or caspases-8 and -10 at the level of the DISC<sup>32</sup>. The above experiments investigated the impact of DC maturation on Fas-induced cell death and confirmed the role of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in iDC sensitivity to TNF receptor family molecules. Next we examined the mechanisms by which DC maturation led to the protection of mDCs from Fas-mediated cell death. As Fas receptor expression levels remain constant during DC maturation (n=3; Fig. 1A), we assessed the impact of DC maturation on the initial biochemical events that follow Fas engagement, i.e DISC formation. C-FLIP has been shown to interfere with caspase-8 activation at different stages of DC maturation within the DISC; thus, we examined the level of c-FLIP expression upon DC maturation. Western blot analysis revealed that 24 hr DC maturation resulted in a significant upregulation of c-FLIP expression (Fold increase: 5; n=3; Fig. 3A). Of note, c-FLIP long was not the only c-FLIP isoform induced within 24 hr of DC maturation; indeed we also detected an increase in the c-FLIP

short isoform expression in mDC as compared to iDC (Fold increase: 16; n=3; Fig.3A). Both isoforms have been described to have anti-apoptotic properties<sup>33</sup>.

We next determined whether the upregulation of c-FLIP during DC maturation led to the inhibition of the assembly of DISC after anti-Fas treatment. To this end, iDC and mDC were stimulated for 30 min with anti-Fas; the DISC complex was then immunoprecipitated. Prior to immunoprecipitation, we controlled for equal levels of Fas and caspase-8 proteins in lysates from iDC and mDC (Fig. 3B, 30 min post-anti-Fas treatment; n=3), Immunoblot results revealed that despite exhibiting similar binding of anti-Fas to Fas receptor as indicated by the levels of Fas-dimer formation, caspase-8 recruitment to DISC was severely abolished in mDC cells stimulated with anti-Fas (Fig. 3C). Conversely, under similar condition, caspase-8 was significantly recruited to the DISC in iDC (Fold increase: 0,1; n=3; Fig. 3C). The adaptor molecule FADD recruitment to the DISC following anti-Fas treatment displayed similar pattern as to that observed with caspase-8. Recruitment of FADD was reduced in mDC as compared to iDC after anti-Fas treatment (Fold increase: 0,5; n=3; Fig. 3C). Under these conditions, when the immunoprecipitates were blotted against c-FLIP, significant levels of the molecule were associated to Fas receptor in mDC (Fold increase: 1,45; n=3) , whereas, no detectable levels of c-FLIP were associated with the receptor in iDC (Fig. 3B). These data strongly indicate that the upregulation of c-FLIP during DC maturation is involved in mDC resistance to receptor-mediated apoptosis by inhibiting the recruitment of FADD and caspase-8.

#### ***Upregulation of mitochondrial protective responses during DC maturation***

Bcl-2 family members act at the mitochondrial membrane to inhibit cytochrome *c* release, while the inhibitor of apoptosis (IAP) family members are catalytic inhibitors of caspases<sup>34,35</sup>. To address the relative impact of DC maturation on the expression levels of anti-apoptotic proteins at the mitochondrial level, we assessed the levels of expression of these anti-apoptotic proteins downstream of Fas. IDC and mDC lysates were first immunoblotted against Bcl-2, Bcl-xL, and Bfl-1 proteins, all of which function to inhibit apoptosis. As shown in Figure 4A, DC maturation (24 hr) resulted in the significant upregulation of the expression levels of targeted anti-apoptotic proteins (Fold increase: 4, 2, 75 for Bcl-2, Bcl-xL and Bfl-1, respectively; n=3). To evaluate whether DC maturation also affected IAP family members, RNase protection assay was performed after 48 hr of DC maturation (Fig. 4B). We found that DC maturation induced significant and specific increase in the expression levels of the IAP gene c-IAP-2. Thirty folds more c-IAP-2 mRNA was detected in mDC as compared to levels found in iDC (n=2; Fig. 4B). Taken together, these data suggest that DC maturation upregulates anti-apoptotic proteins at different steps of the apoptotic cascade to ensure the proper survival of mDC.

## Discussion

DC maturation is a continuous process initiated in the periphery upon antigen encounter and/or the presence of inflammatory cytokines and completed during the DC-T cell interaction. While it is widely accepted that mDC by presenting antigens to T cells constitute important interface for critical interaction between cells from the innate and adaptive immune system, controversial data exist regarding the mechanism(s) regulating their functional survival during this particular phase. The present study shows that DC maturation provides a multi-level protection against death receptor-induced cell death to assure DC survival during maturation (Fig. 5). Strikingly, Bid cleavage was severely impaired in mDC, suggesting the neutralization of the mitochondrial-dependent pathway of cell death in these cells. The formation of DISC required for the initiation of receptor-induced cell death was inhibited by the upregulation of c-FLIP. Furthermore, the mitochondrial-dependent pathway is tightly protected in during DC maturation by increased expression levels of anti-apoptotic proteins of Bcl-2 family members such as Bcl-2, Bcl-xl, and Bfl-1. To assure a full protection from unregulated mitochondrial cell death during DC maturation, the expression levels of IAP family members in particular c-IAP-2 were also increased.

The elimination of antigen-bearing DCs has been always considered an important mechanism for the regulation of T cells response<sup>38,39</sup>. It is possible that the life span of DCs can influence their duration for stimulating lymphocytes, thereby affecting the outcome of lymphocyte activation and immune responses. In agreement with this possibility, ablation of DCs with diphtheria toxin in transgenic mice has



been shown to impair the priming of antigen-specific cytotoxic T cells <sup>36</sup>, while inhibition of apoptosis in DCs by Bcl-2 overexpression enhances the antigen-specific immune responses <sup>37</sup>. Importantly, Guerda et al. clearly demonstrated that mDCs which present the relevant MHC-peptide complexes would be potential targets for their cognate CTLs <sup>4</sup>. Therefore, death receptor engagement may be implicated in DC clearance and any defects in cell death pathway might perturb the process of DC elimination and T cell function. In this regard, mDCs were found to be protected against *in vitro* CTL lytic activity by the up-regulation of the proteinase inhibitor-9 (PI-9), the granzyme B inhibitor <sup>40</sup>. In addition, samples from patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) type II by means of caspase-10 mutations showed more CD83<sup>+</sup> DC in the lymph nodes that were resistant to Fas and TRAIL engagement compared to that wild-type DC <sup>41</sup>. In consequence, resistance to Fas-mediated apoptosis would be an additional way to prevent mDC from the CTL-induced apoptosis, a process that seriously might limit the DC capacity to prime CTL immunity <sup>4</sup>. In this regards, our data clearly demonstrate that inhibition of DISC assembly post Fas stimulation might provide the first stage of DC protection to assure proper immune stimulation. Interestingly, Rescigno reported similar mechanism of Fas-mediated cell death inhibition in human and mouse DC induced for maturation <sup>16</sup>. These results revealed that DC employ similar strategy of blocking death receptor-induced apoptosis at earliest level of cell death triggering throughout the maturation process.

Multiple mechanisms may contribute to the brevity of DC life spans *in vitro* and *in vivo* <sup>44,3,45</sup>. First, pathogen stimuli sensed through Toll receptors on DCs have

been shown to activate an internal "clock" that limits their remaining life span through upregulation of the proapoptotic "Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only protein" Bim<sup>46</sup>. Second, once in lymphoid tissue and after Ag presentation, depletion of DC cytokine secretion and/or costimulatory capacity may lead to apoptosis by exhaustion<sup>47</sup>. Both of these rely on the intrinsic passive cell death pathway. A third possibility is that an active process of extrinsic death signals derived from successfully activated T cells hastens the demise of DCs<sup>48</sup>. Thus, the critical question that could be raised concerns the advantages of blocking receptor-mediated cell death during DC maturation. The molecular switch in signaling pathways during DC maturation from iDC to mDC selectively favours cellular activation. The maturation process of DC is associated with several coordinated events including: (a) loss of endocytic/phagocytic receptors; (b) upregulation of costimulatory molecules CD40, CD58, CD80, and CD86; (c) change in MHC-II compartments; and (d) change in morphology<sup>5</sup>. However, all these changes can not be possible without the tight regulation of DC survival against apoptosis. Our data clearly demonstrate that DC maturation counteracts Fas-mediated apoptosis at different levels of the cell death cascade, emphasizing the crucial aspect of this pathway during DC maturation. Likewise, Izawa *et al.* propose recently that maintenance of DCs in the periphery is regulated by the crosstalk between RANKL and Fas through controlling the level of FLIP expression<sup>42</sup>.

The expression of death receptor such as Fas and TRAIL on DC have been documented previously<sup>29,49</sup>, but their role on DCs is still a matter of debate<sup>18,48,50</sup>. Of interest, stimulation of Fas receptor on T cells does not always induce a death signal

<sup>51</sup>. Indeed, depending on the state of T cell activation, Fas–FasL interaction can also lead to T cell activation and proliferation <sup>11,52,53</sup>. Of note, we have shown previously that T lymphocyte stimulation results in an early activation of caspases in non-apoptotic cells <sup>11</sup>. Aiming to identify the mechanism of cell death inhibition in activated T cells, we found that the expression levels of anti-apoptotic proteins were significantly upregulated, hence, tightly preventing mitochondrial collapse and cell death (Jennifer Ma, and Rafick Sekaly, unpublished data). In agreement with previous reports, we found that iDC are highly susceptible to Fas- and TRAIL-induced cell death. We further established that the mitochondrial-dependent apoptotic pathway during DC maturation is tightly inhibited via two anti-apoptotic family proteins prior to mitochondrial collapse: a) Bcl-2 anti-apoptotic family members, and b) IAP family members. The involvement of IAP is of particular importance in the process of DC maturation. Tightly controlled mitochondrial apoptotic pathway emphasizes that even if caspase-3 was cleaved during the maturation process, its activation would be prevented by the IAP proteins, which are inhibitors of catalytically active caspases <sup>54</sup>.

It has been recently demonstrated that caspase-8 prevents sustained activation of NF- $\kappa$ B in monocytes undergoing macrophage differentiation <sup>56</sup>. Thus, extrapolating these findings to DC, one can suggest that the inhibition of Fas-mediated cell death during DC maturation is essential to allow sustained NF- $\kappa$ B activation that is required for proper antigen presentation. It is worth noting that c-FLIP, Bcl-2, Bcl-<sub>xL</sub> and Bfl-1 are all target genes of the NF- $\kappa$ B activation pathway <sup>57</sup>. Taken together, our findings reveal an important role for anti-apoptotic proteins along the mitochondrial apoptotic cascade in regulating DC survival. DCs are receiving

increasing scientific and clinical interest due to their key role in anti-cancer and anti-viral host responses and potential use as biological adjuvants in tumor vaccines. In this respect, the significance of our findings stems from their potential implications on the enhancement of DC survival. This is critical for improving the clinical efficacy of DC-based vaccine therapy as a recent study by Park et al <sup>58</sup> clearly demonstrated the prolongation of DC lifespan through Akt activation. Thus, a better understanding of the DC survival and the mechanism of regulation would help in the design of new cellular vaccine approaches.

**Acknowledgment**

The authors would like to thank Drs. Lama Fawaz and Walter Rocha for critical comments. This work was supported by grant from the Canadian Network for Vaccines and Immunotherapeutics (CANVAC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). R-P.S. holds the Canada Research Chair in Human Immunology. E.S-A is supported by a postdoctoral fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

**Authorship**

Contribution: S.C. designed and performed research, analyzed data, and wrote the paper; E.S-A. analyzed data, and wrote the paper; G.B. performed research; S.B. designed research, and analyzed data; R-P.S. designed research, analyzed data, and wrote the paper.

**Conflict-of-interest disclosure:** The authors declare no competing financial interests.

## References

- (1) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-252.
- (2) Yu Q, Gu JX, Kovacs C et al. Cooperation of TNF family members CD40 ligand, receptor activator of NF-kappa B ligand, and TNF-alpha in the activation of dendritic cells and the expansion of viral specific CD8+ T cell memory responses in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals. *J Immunol*. 2003;170:1797-1805.
- (3) Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med*. 1997;185:2133-2141.
- (4) Guarda G, Hons M, Soriano SF et al. L-selectin-negative CCR7(-) effector and memory CD8(+) T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nat Immunol*. 2007;8:743-752.
- (5) Banchereau J, Briere F, Caux C et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- (6) Los M, Stroh C, Janicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K. Caspases: more than just killers? *Trends Immunol*. 2001;22:31-34.
- (7) Adam-Klages S, Adam D, Janssen O, Kabelitz D. Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. *Immunol Res*. 2005;33:149-166.
- (8) Saelens X, Festjens N, Vande WL et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23:2861-2874.
- (9) Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 1998;17:1675-1687.

- (10) Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E et al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1993;178:2231-2235.
- (11) Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med.* 1999;190:1879-1890.
- (12) Mapara MY, Bargou R, Zugck C et al. APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *Eur J Immunol.* 1993;23:702-708.
- (13) Aggarwal BB, Singh S, LaPushin R, Totpal K. Fas antigen signals proliferation of normal human diploid fibroblast and its mechanism is different from tumor necrosis factor receptor. *FEBS Lett.* 1995;364:5-8.
- (14) Ahn JH, Park SM, Cho HS et al. Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem.* 2001;276:47100-47106.
- (15) Miwa K, Asano M, Horai R et al. Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med.* 1998;4:1287-1292.
- (16) Rescigno M, Piguet V, Valzasina B et al. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med.* 2000;192:1661-1668.
- (17) Guo Z, Zhang M, An H et al. Fas ligation induces IL-1beta-dependent maturation and IL-1beta-independent survival of dendritic cells: different roles of ERK and NF-kappaB signaling pathways. *Blood.* 2003;102:4441-4447.

- (18) Ashany D, Savir A, Bhardwaj N, Elkon KB. Dendritic cells are resistant to apoptosis through the Fas (CD95/APO-1) pathway. *J Immunol.* 1999;163:5303-5311.
- (19) Guo Z, Zhang M, Tang H, Cao X. Fas signal links innate and adaptive immunity by promoting dendritic-cell secretion of CC and CXC chemokines. *Blood.* 2005;106:2033-2041.
- (20) Koppi TA, Tough-Bement T, Lewinsohn DM, Lynch DH, Alderson MR. CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1997;27:3161-3165.
- (21) Bjorck P, Banchereau J, Flores-Romo L. CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int Immunol.* 1997;9:365-372.
- (22) Lundqvist A, Choudhury A, Nagata T et al. Recombinant adenovirus vector activates and protects human monocyte-derived dendritic cells from apoptosis. *Hum Gene Ther.* 2002;13:1541-1549.
- (23) Hoves S, Krause SW, Halbritter D et al. Mature but not immature Fas ligand (CD95L)-transduced human monocyte-derived dendritic cells are protected from Fas-mediated apoptosis and can be used as killer APC. *J Immunol.* 2003;170:5406-5413.
- (24) Yokota A, Oikawa A, Matsuda C, Shinohara N, Eshima K. Cell-mediated fas-based lysis of dendritic cells which are apparently resistant to anti-Fas antibody. *Microbiol Immunol.* 2003;47:285-293.
- (25) Chen A, Xu H, Choi Y, Wang B, Zheng G. TRANCE counteracts FasL-mediated apoptosis of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol.* 2004;231:40-48.



- (26) Sharif-Askari E, Alam A, Rheume E et al. Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *EMBO J.* 2001;20:3101-3113.
- (27) Lee AW, Truong T, Bickham K et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine.* 2002;Suppl 4:A8-A22.
- (28) Chen W, Antonenko S, Sederstrom JM et al. Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood.* 2004;103:2547-2553.
- (29) Leverkus M, Walczak H, McLellan A et al. Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood.* 2000;96:2628-2631.
- (30) Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770-776.
- (31) Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis.* 2002;7:313-319.
- (32) Abe K, Kurakin A, Mohseni-Maybodi M, Kay B, Khosravi-Far R. The complexity of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;926:52-63.
- (33) Kataoka T. The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol.* 2005;25:31-58.
- (34) Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* 2006;13:1378-1386.
- (35) Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene.* 2003;22:8568-8580.

- (36) Jung S, Unutmaz D, Wong P et al. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. 2002;17:211-220.
- (37) Nopora A, Brocker T. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J Immunol*. 2002;169:3006-3014.
- (38) Chen M, Huang L, Wang J. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood*. 2007;109:4360-4367.
- (39) Hermans IF, Ritchie DS, Yang J, Roberts JM, Ronchese F. CD8+ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J Immunol*. 2000;164:3095-3101.
- (40) Medema JP, Schuurhuis DH, Rea D et al. Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells. *J Exp Med*. 2001;194:657-667.
- (41) Wang J, Zheng L, Lobito A et al. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*. 1999;98:47-58.
- (42) Izawa T, Ishimaru N, Moriyama K et al. Crosstalk between RANKL and Fas signaling in dendritic cells controls immune tolerance. *Blood*. 2007;110:242-250.
- (43) de Goer de Herve MG, Durali D, Tran TA et al. Differential effect of agonistic anti-CD40 on human mature and immature dendritic cells: the Janus face of anti-CD40. *Blood*. 2005;106:2806-2814.

- (44) Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA et al. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol.* 2000;165:6762-6770.
- (45) Kamath AT, Henri S, Battye F, Tough DF, Shortman K. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood.* 2002;100:1734-1741.
- (46) Hou WS, Van Parijs L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol.* 2004;5:583-589.
- (47) Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.* 2000;1:311-316.
- (48) Matsue H, Edelbaum D, Hartmann AC et al. Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4+ T cells. *J Immunol.* 1999;162:5287-5298.
- (49) Winzler C, Rovere P, Rescigno M et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med.* 1997;185:317-328.
- (50) Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:255-260.
- (51) Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today.* 1995;16:569-574.
- (52) Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell.* 1994;76:969-976.

- (53) Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med.* 1999;190:1891-1896.
- (54) Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.* 2004;13:1979-1987.
- (55) Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang X. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J.* 2003;22:4132-4142.
- (56) Rebe C, Cathelin S, Launay S et al. Caspase-8 prevents sustained activation of NF- $\kappa$ B in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood.* 2007;109:1442-1450.
- (57) Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol.* 2004;1:343-350.
- (58) Park D, Lapteva N, Seethammagari M, Slawin KM, Spencer DM. An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat Biotechnol.* 2006;24:1581-1590.

## Figure legends

**Figure 1: *DC maturation confers resistance to Fas-induced apoptosis.*** Following 6 days of cellular differentiation, DC maturation was achieved by culturing iDC in the presence or absence of MCM-mimic for additional 24 hr as described in Materials and Methods. (A) The expression levels of maturation markers (CD83 and HLA-DR) were assessed by flow cytometry. (B) The levels of surface Fas receptor expression were assessed using anti-Fas-FITC on both iDC and mDC by flow cytometry. Results are representative of three independent experiments. (C) iDC and mDC were incubated with anti-Fas antibody for 18 hr and the level of cell survival was monitored by flow cytometry using annexin V/ PI staining. Cells were considered viable if they stain negative for both annexin V/ PI. (D) iDC and mDC were pre-treated for 2 hr with zVAD caspase inhibitor to examine their role during DC apoptosis. DMSO was used as mock treatment. Fas-induced apoptosis was triggered in iDC and mDC as above, and the level of cell viability was assessed as in C. Results are mean of triplicate reading  $\pm$  SD. Significant differences between samples are indicated (\*) for  $p \leq 0,001$ . Results are representative of three independent experiments.

**Figure 2: *Anti-Fas triggers mitochondrial-dependent cell death in DC.*** DC maturation was achieved as described in Materials and Methods. (A) iDC and mDC were incubated for 18 hr with anti-Fas antibody. Treated and untreated cells were then lysed and resolved by SDS-PAGE in reducing conditions. Blots were revealed

using anti-caspase-8 and anti-caspase-3 Abs. Anti- $\beta$ -actin was used to assure equal protein loading. Molecular masses are indicated in kilodaltons on the right side of each blot. (B) After treatment with anti-Fas as in A, iDC and mDC were stained with JC-1, and analysed for the mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) loss using FACScan. Results are representative of three independent experiments. (C) Lysates from iDC and mDC treated as in A were resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted against Bid. Anti- $\beta$ -actin was used to assure equal protein loading. Results are representative of three independent experiments.

**Figure 3: DC maturation inhibits Fas-induced DISC formation.** DC maturation was achieved as described in materials and methods. (A) Cells were incubated with anti-Fas antibody for 30 minutes at 37°C, then lysed and resolved by SDS-PAGE in reducing conditions. Blots were revealed using antibodies against different FLIP isoforms as indicated. Anti- $\beta$ -actin was used to assure equal protein loading. (B) Anti-Fas and anti-caspase-8 immunoblotting on total lysates before immunoprecipitation was used to assure equal protein loading (30 minutes post-anti-Fas stimulation). (C) iDC and mDC were incubated with anti-Fas antibody for the indicated time at 37°C. Cells were then lysed and DISC was immunoprecipitated as described in materials and methods. Immune complexes were resolved by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting against Fas, caspase-8, FADD, and FLIP using respective Abs. Molecular masses are indicated in kilodaltons on the right side of each blot. Results are representative of three independent experiments.

**Figure 4: DC maturation induces anti-apoptotic protein expression.** DC maturation was achieved as described in materials and methods. (A) Treated and untreated cells were then lysed and resolved by SDS-PAGE in reducing conditions. Blots were revealed using antibodies against different anti-apoptotic proteins as indicated. Anti- $\beta$ -actin was used to assure equal protein loading. Results are representative of three independent experiments. (B) DC maturation was achieved as described in materials and methods. RNase protection assay was performed as per manufacturer instruction using 10  $\mu$ g mRNA. Scanning of the radioactive gel was carried out with Phosphor imager analyzer. Values were obtained using ImageQuant 5.1 program. Fold increases were calculated after average of two independent experiments and normalization by L32 expression.

**Figure 5: Schematic model of DC maturation effect at multi-level steps on Fas-mediated mitochondrial apoptotic pathway.** (A) Immature DC. (B) Mature DC

Sandrine Crabé *et al*

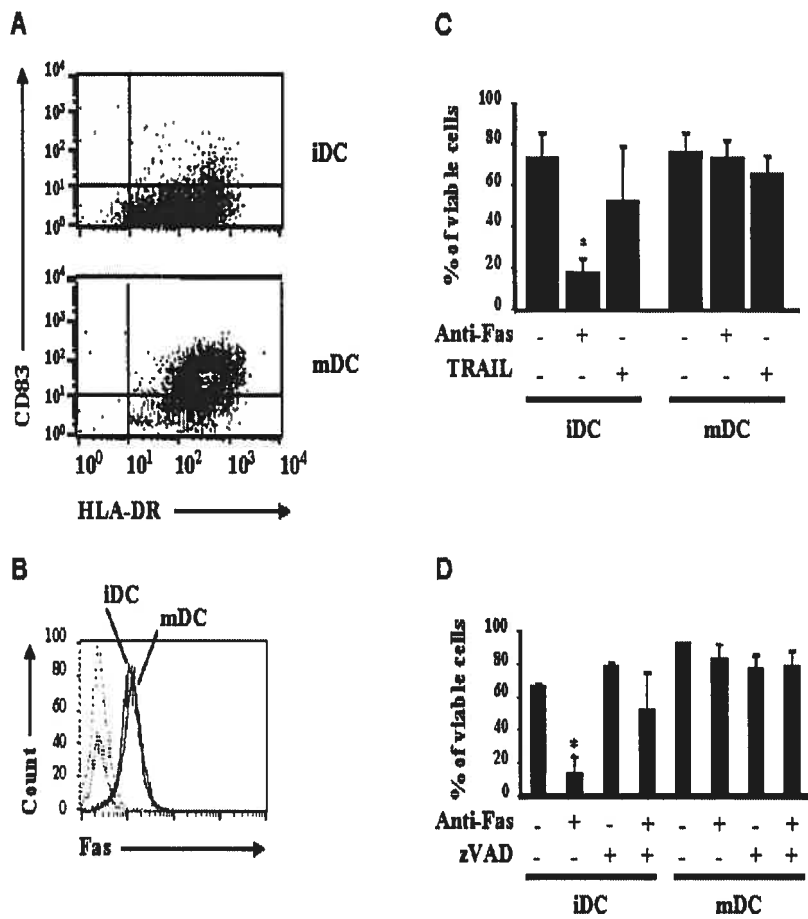
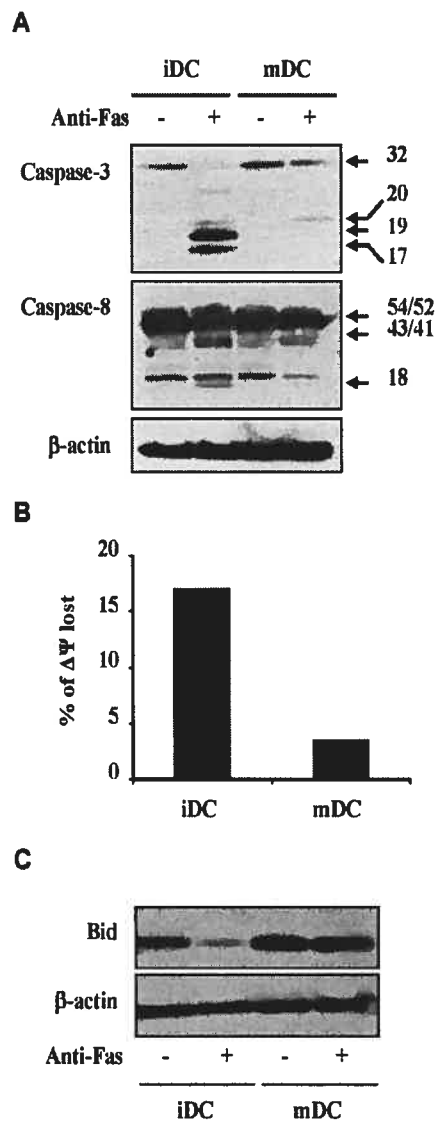


Figure 1: DC maturation confers resistance to Fas-induced apoptosis.



Sandrine Crabé *et al.*Figure 2: *Anti-Fas triggers mitochondrial-dependent cell death in DC.*

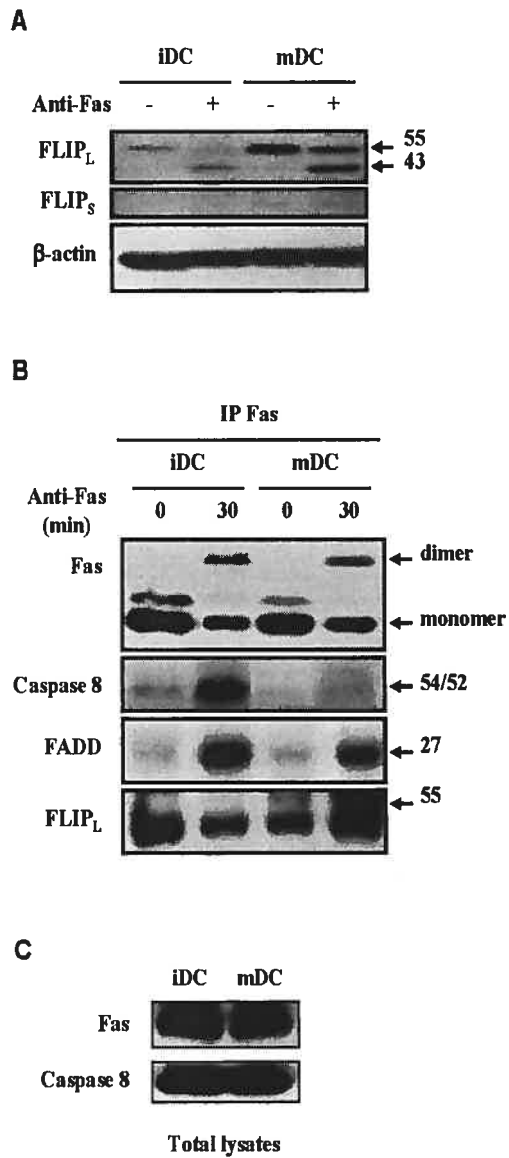
Sandrine Crabé *et al.*

Figure 3: DC maturation inhibits Fas-induced DISC formation.

Sandrine Crabé *et al.*

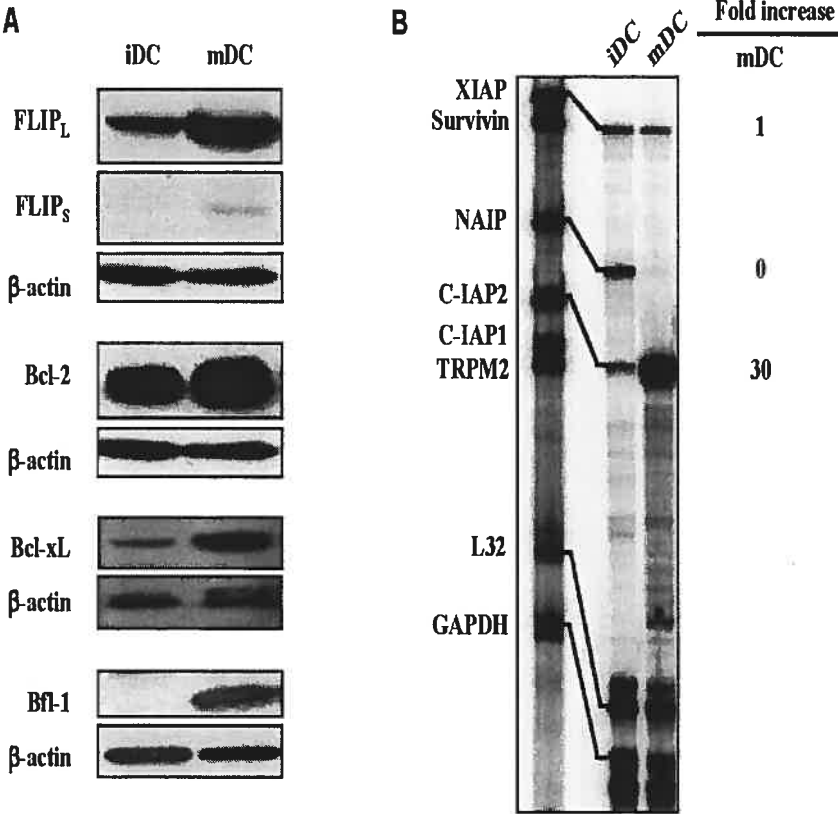


Figure 4: DC maturation induces anti-apoptotic protein expression.

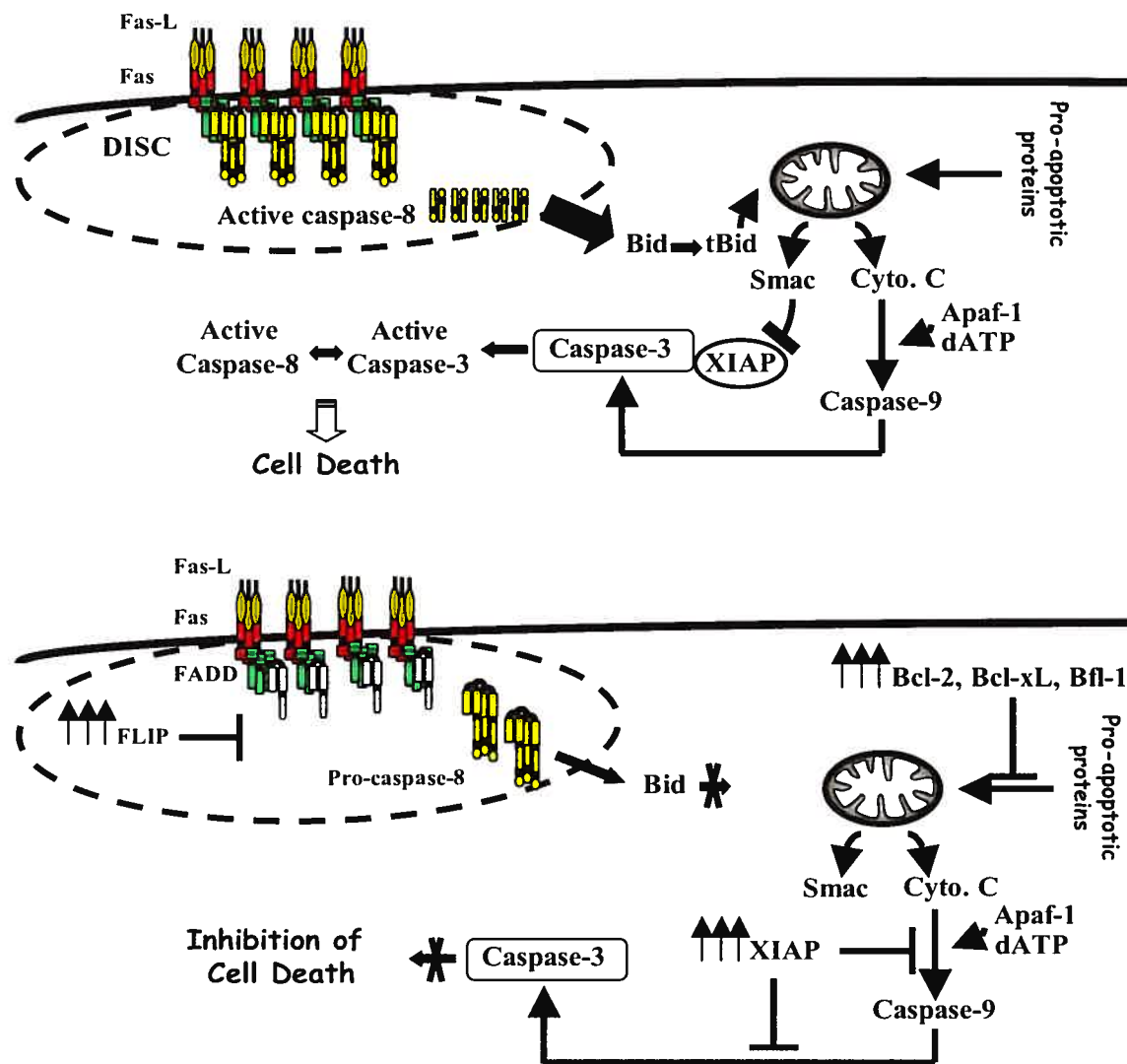


Figure 5: Schematic model of DC maturation effect at multi-level steps on Fas-mediated mitochondrial apoptotic pathway.

## CHAPÎTRE 2

## CONTRIBUTIONS

Les auteurs de ce papier sont au nombre de quatre. En tant que premier auteur, j'ai planifié et pensé les expériences. Mais j'ai également effectué le travail technique, c'est-à-dire les expériences mais aussi toutes les mises au point. J'ai également analysé les résultats des biopuces. De plus, j'ai écrit et corrigé le papier. Le deuxième auteur, Geneviève Boucher, a effectué l'analyse bioinformatique des biopuces à ADN. Elias Haddad est le chercheur responsable des projets génomiques dans le laboratoire de Rafick-Pierre Sékaly et a participé à la correction du papier. Rafick-Pierre Sékaly a dirigé les expériences en tant que directeur de laboratoire et donné les ressources nécessaires au projet .

## PREFACE

Précédemment, nous avons démontré que selon leur état de maturation, les DC sont résistantes ou non à l'apoptose via les TNFRs. En fait, la maturation protège les DC de l'apoptose induite par l'engagement de Fas ou de TRAIL. Cette protection est reliée à des changements de l'expression protéique des certaines molécules reliées à l'apoptose. Nous avons voulu savoir si l'effet protecteur de la maturation s'exerçait qu'au niveau des TNFRs (signaux extrinsèques) qu'à d'autres types d'apoptose (signaux intrinsèques).

Ce projet a pour but d'étudier l'action de la maturation sur l'expression des gènes reliés à l'apoptose chez les DC. Pour cela, nous disposons de trois stimuli de maturation. En premier, le LPS; celui-ci est un composant des membranes de bactérie et est bien connu pour induire une maturation chez les DC. Il est utilisé pour schématiser les effets des infections bactériennes sur les DC. En deuxième, nous avons utilisé des cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE2). Ces molécules sont présentes lors d'une réponse immunitaire sur le site d'inflammation et entraînent la maturation des DC. Elles représentent l'effet de la réaction inflammatoire sur l'état des DC. Finalement pour certaines expériences, nous avons utilisé le CD40L. C'est une molécule exprimée par les lymphocytes T activés et qui induit la maturation des DC. Ce ligand représente l'influence des cellules T sur la maturation des DC.

Pour mieux cerner l'effet de la maturation sur l'expression génique des DC, nous avons employé deux méthodes : les biopuces à ADN et les protections à la RNase (RPA). Puis nous avons également réalisé des powerblot, méthode d'étude de l'expression de centaines de protéines en même temps.

### *Analyse des biopuces*

Les biopuces ont été réalisées par la plateforme génomique du CANVAC. Plusieurs types de biopuce ont été développés. Nous avons choisi d'utiliser : ImmuneArray. Celle-ci contient 7256 spots doubles représentant 3628 étiquettes de séquences transcrites ("expressed sequence tags" (ESTs)).

Cette étude fait partie d'un grand projet (Genome Canada/Quebec project title 'S2K') mené au sein du CANVAC visant l'établissement des différentes signatures géniques de plusieurs types cellulaires. Ce projet regroupe de nombreux laboratoires. Pour faciliter la circulation des données et leur comparaisons, les études ont été effectuées en comparant les échantillons à un ARN référence commercial.

Dans le laboratoire du Dr Sékaly, cette étude comprenait au départ des DC issues de patients atteints du VIH (stade primo infection, infection avec un taux de virus non contrôlé, infection avec un taux de virus contrôlé et infection non progressante (LTNP)). Le projet consiste à établir la signature génique et les différences des DC maturées ou non issues de patients atteints du VIH. Pour des besoins de consistance de la thèse, seuls les résultats concernant les donneurs sains et l'apoptose sont présentés dans ce papier.

Nous disposons de deux donneurs. Nous avons effectué une cinétique de maturation: 0, 3, 8, 18, 24 et 48 heures avec deux stimuli différents: le LPS et le MCM-mimic (mélange de cytokines proinflammatoires). Nous avons perdu certains échantillons (8 heures de LPS et 18 heures de LPS). La perte de ces échantillons ne nous pas permis de les garder pour effectuer des analyses statistiques. Nous avons dû les éliminer de l'étude. Nous avons marqué 18 échantillons: 0, 3, 24 et 48 heures pour les deux patients (8 échantillons); l'échantillon référence, ce qui fait un total de 9 échantillons. Nous avons testé le marquage avec les deux fluorochromes possibles: Cy3 et Cy5, d'où un total de 18 échantillons marqués et analysés sur biopuces à ADN.

Dans un premier temps, les résultats sont comparés à l'ARN référence. Après le scanning, la qualité des résultats est examinée, puis ils sont normalisés. Sur les 3756 transcripts présents sur la puce, 3583 sont exprimés par les DC tous temps et types de maturation confondus. Il y en a 3161 référencés dans la base de données NCBI.

Les 3161 transcripts exprimés ont été classés en différents groupes à l'aide de la base de données KREGG. Nous avons dénombré 162 groupes et certains transcripts peuvent appartenir à plusieurs classes à la fois. Nous avons choisi de représenter seulement 13 classes dans la figure 4; ces classes sont reliées au système immunitaire.



Pour les études suivantes, nous avons comparé les DC matures aux DC immatures. En utilisant le programme statistique LIMMA, nous avons établi une liste de gènes différentiellement exprimés (DEG) entre les différents échantillons comparés en utilisant une pvalue  $< 0.05$  et/ou un fold change  $> 1.5$

## RESUMÉ

Le lipopolysaccharide (LPS) et les cytokines proinflammatoires sont des inducteurs de la maturation des cellules dendritiques (DC). Les stimuli de maturation induisent l'expression de molécules de co-stimulation et protègent les DC matures (mDC) de l'apoptose. Cependant les mécanismes impliqués dans ce processus de protection sont encore mal élucidés. Dans le but de déterminer les programmes d'expression des gènes de survie qui sont régulés durant la maturation, nous avons effectué une analyse protéomique et génique du transcriptosome des DC immatures (iDC) et des DC maturées à l'aide du LPS et de cytokines pro-inflammatoires. Nos résultats démontrent que la maturation induit deux programmes anti-apoptotiques. Le premier conduit à l'augmentation de l'expression de gènes connus pour inhiber l'apoptose dépendante des caspases (CFLAR (Casper or FLIP) BIRC3 (cIAP2), BIRC6, BCL2A1 (Bfl1) and the downregulation of BCL2L11 (Bim)). Le deuxième programme met en jeu des gènes conduisant à l'induction de molécules impliquées dans la protection de l'induction du clivage de l'ADN (ATM, GADD45b) et des phases tardives de l'apoptose (NFKB1, NFKB2, MAP2K1, MAPK1, MAPKAPK). Nous rapportons aussi que la maturation conduit à l'induction de nombreuses cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-11, IL-23), de récepteurs de cytokine (IL-10R, IL-15RA) ainsi que de chémokine (CCL1, CCL2, CCL13). En conclusion, nous démontrons que la maturation des DC conduit à l'activation de multiples programmes importants pour les fonctions des DC mais aussi pour leur survie

**Title: Maturation stimuli induce a survival transcriptional profile of human dendritic cells**

**Running title:** Gene expression profiles in human dendritic cells

Sandrine Crabé<sup>1,2,3</sup>, Geneviève Boucher<sup>1,3</sup>, Sylvie Beaulieu, Elias K. Haddad<sup>1,2,3</sup> and Rafick-Pierre Sékaly<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'immunologie, Centre de Recherche CHUM Saint-Luc, Montréal, H2X 1P1, Canada. <sup>2</sup>Laboratoire d'immunologie, Département de Microbiologie et d'Immunologie, Université de Montréal, Québec, Canada. <sup>3</sup>INSERM U743, CR-CHUM, Université de Montréal, Montréal, Canada.

\* **Corresponding Author:** Dr. Rafick-Pierre Sékaly, Centre de Recherche, Hôpital St. Luc, Pavillon Edouard-Asselin, 264, Boulevard René Lévesque Est, Bureau 1307D, Montréal, Québec, H2X 1P1, Canada. Tel: (514) 890-8000 Ext: 35289, Fax: (514) 412-7415. e-mail: [rafick-pierre.sekaly@umontreal.ca](mailto:rafick-pierre.sekaly@umontreal.ca)

**Research grant:** This study was supported by

**Conflict of Interest:** The authors declare that they do not have a conflict of interest.

**Text word count:**

**Abstract word count:**

**Scientific Heading:** dendritic cells, transcriptome, maturation, microarray, power-blot

**Abstract**

Lipopolysaccharide (LPS) and pro-inflammatory cytokines are both well known inducers of dendritic cell (DC) maturation. Maturation stimuli induce the expression of co-stimulatory molecules and protect mature DC (mDCs) from apoptosis. However, the mechanisms underlying the survival of mDCs are poorly understood. In order to identify the survival expression programs that are elicited during the maturation process, we performed a global transcriptome analysis on immature DC (iDCs) and DCs matured through LPS and pro-inflammatory cytokines using genomics and proteomics analyses. Our results showed that maturation of DCs induced two anti-apoptotic programs. The first program involves the increase of molecules which have been shown to inhibit caspase-dependent apoptosis namely the upregulation of CFLAR (Casper or FLIP) BIRC3 (cIAP2), BIRC6, BCL2A1 (Bfl1) and the downregulation of BCL2L11 (Bim). The second survival program involves the induction of molecules that protects against the induction of DNA cleavage, the ultimate phase of apoptosis, and this includes genes of the NF $\kappa$ B (NFKB1, NFKB2), MAPK (MAP2K1, MAPK1, MAPKAPK) and DNA machinery (ATM, GADD45b) pathways. We also report that DC maturation induces the activation of multiple cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-11, IL-23), cytokine receptors (IL-10R, IL-15RA), and chemokines (CCL1, CCL2, CCL13). Overall, our results show that maturation of DC leads to the activation of multiple programs which are important for DC function in antigen presentation. Here we show that maturation of DCs by LPS and inflammatory cytokines induces multiple survival programs and ensures the survival of mature DC.

## INTRODUCTION

Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells (APC) able to initiate the innate and adaptive immune responses (Banchereau and Steinman 1998; Rescigno, Granucci et al. 1999). IDCs (immature DCs) are strategically located in tissues that represent pathogen entry routes, mainly the skin and mucosal surfaces, where they continuously monitor the environment through the uptake of particulate and soluble products (Banchereau and Steinman 1998; Banchereau, Briere et al. 2000). DC maturation is associated with reduced endocytic and phagocytic capacities, enhanced production of inflammatory cytokines and chemokines, and acquisition of migratory functions allowing antigen-loaded DCs to move from non-lymphoid to lymphoid tissues or, within lymphoid tissues, to migrate from the marginal zones to the T cell areas. Migrated and mDCs (mature DCs) express high levels of cell surface major histocompatibility complex (MHC) and costimulatory proteins. Thus, they have the potency to activate CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell responses (Ingulli, Mondino et al. 1997; Ridge, Di Rosa et al. 1998). Aberrant DC functions lead to the dysregulation of immune responses such as in chronic viral infections and autoimmune diseases (Ludewig, Odermatt et al. 1998).

Once they have interacted with T cell, DCs are supposed to be eliminated by programmed cell death (Winzler, Rovere et al. 1997), suggesting that their half-life is controlled. Previous studies have illustrated the importance of cell death in the immune system and have identified molecular pathways critical in the regulation of lymphocyte apoptosis. Recently, Chen *et al.* demonstrated that extended DC life leads to autoimmune symptom appearance, which was also reported when lymphocyte survival is increased (Chen, Wang et al. 2006). Thus, DC apoptosis regulation seems to be important not only for the immune response termination but also for the maintenance of immune tolerance.

Among numerous studies concerning DC functions, few are available on DC homeostasis. However, it appears in some reports that maturation and apoptosis are intimately related. Also, we and others have found that in particular DC culture conditions, maturation can protect DCs from TNFR-dependent apoptosis (Bjorck, Banchereau et al. 1997; Koppi, Tough-Bement et al. 1997; Hoves, Krause et al. 2003;

Chen, Xu et al. 2004; Crabe, El-Sharif et al. 2007). Moreover, Kastenmuller *et al.* demonstrated that MVA infected iDCs but not mDCs undergo apoptosis (Kastenmuller, Drexler et al. 2006) indicating that maturation may delay DC apoptosis onset.

Immature and mDCs are distinct by their localization, phenotype and functions suggesting changes in the gene expression profiles during the maturation process. The transcription profile or transcriptome, is a major determinant of cellular phenotype and function (Staudt and Brown 2000). Differences in gene expression reflect morphological, phenotypical and functional cellular changes induced by environmental perturbations. In the past, several studies were based on microarrays to discover the maturation stimuli implication in the regulation of DC activities (Hashimoto, Suzuki et al. 2000; Granucci, Vizzardelli et al. 2001; Huang, Liu et al. 2001; Vizzardelli, Pavelka et al. 2006). Thus, microarray technology is a valid approach to investigate possible differences induced in particular cell types by diverse external factors. This approach was useful to understand how maturation influences DC functions. However, effect of the maturation on apoptosis related gene expression was poorly exploited.

Here, we show that DC maturation induces changes in the expression of multiple programs and signaling pathways. In particular, we observed significant changes in MAPK, TLR, IFN, NF $\kappa$ B, and survival pathways.

To determine how maturation impacts DC functions, we performed kinetic study (0, 3, 24, and 48h) with two different maturation stimuli (MCM-mimic and LPS). For the microarray analysis, the samples were in first compared to a reference RNA during the preprocessing analysis and after we compared mDCs versus iDCs for all the others comparisons. We investigated more precisely the expression profile of three apoptotic gene family members by RNase protection assay (RPA). Finally, we also did a powerblot analysis on iDCs and 48h matured DCs (matured with LPS, MCM-mimic or CD40L). We observed that maturation leads to several modifications in signalling pathways especially for the apoptosis and NF- $\kappa$ B.

## MATERIAL AND METHODS

### **In vitro differentiation of monocyte-derived dendritic cells (MDDC)**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation on Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) from fresh apheresis obtained with informed consent from healthy donors. After, monocytes were isolated from PBMCs by magnetic cell sorting using anti-CD14-conjugated-microbeads (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA). The purity of the CD14<sup>+</sup> monocyte population was assessed by flow cytometry and was typically 98% or greater in the absence of any contaminating TCR<sup>+</sup> cells and CD19<sup>+</sup> cells. Monocytes were cultured for 6 days in RPMI 1640 supplemented with 1% human serum AB (GemCell, Woodland, CA, USA), GM-CSF (1500 U/ml) (Cangene, Mississauga, Ontario, Canada), IL-4 (10 ng/ml) (R&D System, Minneapolis, MN, USA), L-glutamine 2mM, HEPES 10mM, nonessential MEM, penicillin and streptomycin (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario). The cells were fed with IL-4 and GM-CSF on days 2 and 4. IDC were collected on day 6. Most of the cells are non adherents. The maturation was induced by adding proinflammatory cytokine cocktail called MCM-mimic ((IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), IL-6 (1000 units/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) (all from Biosource, Camarillo, CA) and prostaglandin E<sub>2</sub> (1  $\mu$ g/ml)) (Sigma, St. Louis, MO, USA) or by adding LPS (20 ng/mL) (Sigma, St. Louis, MO, USA) or CD40L (500ng/mL) (a kind gift of Dr Réjean Lapointe) during the indicated time.

### **Flow cytometry analysis**

The expression of surface markers on DCs was determined by flow cytometry using the following mAbs: FITC or PE-conjugated anti-HLA-DR, PE-conjugated anti-CD86 and PE-conjugated anti-TCR, PE-conjugated anti-CD14, PE-conjugated anti-CD19 (all purchased from BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada); PE-conjugated anti-CD83 (clone HB15As; Immunotech). Cells were incubated with mAbs for 30 min on ice. After washing twice with PBS, cells were fixed in PBS containing 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and were analyzed using a FACSCalibur (BD biosciences, Mississauga, ON, Canada).

**Primary allogenic Mixed Leukocyte Reaction (MLR)**

For primary MLR,  $5 \times 10^4$  PBMCs were incubated with different numbers of allogenic DC (DC) from the same donor at stimulator-responder ratios ranging from 1:3060 to 1:40 in 96-well round-bottom tissue culture plates (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) in a total volume of 200  $\mu$ l of RPMI 1640 containing 5% FBS in a humidified incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). On day 5 of co-culture, 1  $\mu$ Ci of [*methyl*-<sup>3</sup>H]thymidine/well (PerkinElmer, Wellesley, MA, USA) was added. After 18 h, labelled DNA of proliferating cells was harvested onto glass fibre filters (Printed Filtermat B; PerkinElmer, Wellesley, MA, USA) using a Vacusafe IH-280 harvester (Inotech Biosystems International, Rockville, MD, USA). Filters were transferred to scintillation liquid (Betaplate Scint; WallacPerkinElmer, Wellesley, MA, USA), and incorporated radioactivity was determined with a liquid scintillation counter (1450 MicroBeta JET; PerkinElmer, Wellesley, MA, USA). All samples were tested in triplicates, and values are indicated as mean  $\pm$  SD.

**Cytokine Binding Assay (CBA)**

The supernatant used for the analyses of cytokine production were harvested after 48 h of maturation. The cytokine group, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  were measured with Cytometric Bead Analysis (CBA) using the Human Inflammation Kit (according to the manufacturer's instructions, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). The lower detection limit of the assay for each cytokine was 5 pg/ml.

**Microarray experimental design**

Microarray analyses were independently performed on two donors. Briefly, iDC were stimulated with LPS or MCM-mimic for different time (0, 3, 24 and 48 h) and total RNA was extracted. A focused immune array was provided by CANVAC as part of a larger study (Genome Canada/Quebec project title "S2K"), whose purpose was to build a model of immune response based on viral infection by HIV, HCV, SARS and Yellow Fever as well as bone marrow and solid organ transplantation. The array contained an assortment of genes from different pathways and functional classes. The



larger study covered approximately 300 samples to be incorporated into the modeling and for this reason samples were analysed through an indirect design using a universal human RNA probe as reference (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Samples and the universal RNA were labelled with Cy5 and Cy3, respectively. Dye-swap was performed to investigate the proportion of dye incorporation between Cy3 and Cy5; no significant differences between the dyes were observed (data not shown).

### **RNA isolation, amplification and hybridization**

Total RNA was extracted from total of  $2 \times 10^5$  monocyte derived DC per sample at each time point using the RNasy kit (Quiagen, Mississauga Canada). Total RNA was amplified using the MessageAmp mRNA kit (Ambion, Austin, USA). The quality and quantity of RNA were measured by Agilent bioanalyser and the optic density was measured. Sample and human RNA probes for microarray hybridization were prepared by labelling the 3  $\mu\text{g}$  of amplified RNA with Cy3 or Cy5, respectively, by reverse transcription and hybridizing the labelled cDNA on the CANVAC (<http://www.canvac.ca>) human Immunoarray version 2 manufactured by the Microarray Center (UHT, Toronto, ON, Canada) containing 7256 duplicate spots representing 3628 expressed sequence tags (ESTs). Details of the labelling and hybridization procedures can be obtained at <http://transnet.uhnres.utoronto.ca>.

### **Microarray data preprocessing and analysis**

Microarrays were scanned using Scanarray Express Scanner (Packard BiosciencesPerkinElmer, Wellesley, MA, USA) at 10- $\mu\text{m}$  resolution. QuantArray (Packard BiosciencesPerkinElmer, Wellesley, MA, USA) version 3 was used to quantify the scanned images, producing quantarray output file in text format. Microarrays were analyzed for the quality by visual inspection of the array to flag poor quality spots during scanning, followed by the use of automated scripts that scanned the quantified output files and measured overall density distribution on each channel and number of flagged spots. Each quantified output file was then run through the following processing using R (<http://www.r.project.org>) and Linear Models for Microarray Analysis (LIMMA) (Smyth, Michaud et al. 2005). In brief, (1) Cy3 and

Cy5 signals were filtered for low signal intensities using a surrogate replacement policy that replaces values less than or equal to 256 with 257. (2) Merge duplicate probes: for each green (Cy3 control) and red channel (Cy5 sample), duplicate spots for each probes were merged; all probes that exceeded the lower minimal filter were almost identical. (3) Normalize within arrays: the raw merged red and green channels were then lowness normalized (by subgrid) and transformed to log<sub>2</sub> ratios. (4) Normalize between chips: the average brightness of each array was corrected using quantile normalization. LIMMA was used to identify differentially expressed genes (p-value < 0.05 or/and absolute fold change > 1.5) among the preprocessed data. The lists were then manually refined according to known functions and pathways.

#### **RNase protection assay (RPA)**

DC were obtained from 2 donors and treated with or without proinflammatory cytokines or LPS during 48h at concentration indicated above. RPA were performed as described by the manufacturer (Pharmingen, La Jolla, CA, USA) using 10 µg total RNA. Gel scans were assessed by Phosphorimager (Typhoon 8600, Amersham Biosciences, Québec, Canada). Band intensity quantification were done using ImageQuant 5.1 software (Amersham Biosciences, Québec, Canada) and normalized on ribosomal L32 mRNA level.

#### **Sample preparation for PowerBlot analysis.**

DC preparation was done as described before for RNase protection experiments. Whole-cell lysates were prepared as follows: after medium removal by centrifugation, cells were rinsed with phosphate-buffered saline three times. Boiling lysis buffer (10 mM Tris [pH 7.4], 1.0 mM sodium orthovanadate, and 1.0% SDS) was added to the pellets to denature cellular proteins rapidly. The cell lysates were collected into an eppendorf and heated briefly in boiling water. The lysates were then sonicated for 10 s to shear genomic DNA. The protein concentration was determined with the Bio-Rad protein assay kit, and the samples were frozen at -80°C and sent on dry ice to BD Biosciences/Pharmingen (San Diego, CA) for PowerBlot analysis.

**BD PowerBlot Array Analysis**

BD PowerBlot Western array screening (<http://www.bdbiosciences.com>) was used to analyze 4 different groups (iDC, MCM-, LPS-, CD40L-treated DC) of lysates, each composed of 500 µg of protein samples. After SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and protein transfer, the filters were blotted with around 900 primary antibodies. Alexa 680-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Paisley, UK) were then applied. The signal was visualized with an Odyssey Infrared Imaging System and analyzed by densitometry by using PDQuest software (Bio-Rad). Triplicates of each antibody reaction visualized by chemiluminescence were evaluated by densitometry and compared between two samples. After normalization, the data for iDC were compared with those treated with MCM-mimic, LPS and CD40L. This was performed between each triplicate reading for each sample, giving a 3x3 comparison matrix for each pair of proteins. These comparisons were then ranked, based on the size of the change observed, the reproducibility of that change between each of the triplicate repeats and the absolute strength/quality of the signal on the PVDF membrane. These analyses were performed both by computer analysis and by visual inspection of the membranes. In this manner changes were ranked into 10 levels (Table 2).

## RESULTS

### **Functional characterization of dendritic cell matured with LPS, MCM-mimic or CD40L stimuli *ex vivo*.**

Human DCs were derived from monocytes, obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Quality control of monocyte isolation by flow cytometry indicated that the purity of 98% using anti-CD14 staining (data not shown). Purified monocytes were differentiated into iDCs for 6 days in medium supplemented with IL-4 and GM-CSF. It is well known that direct contact with many signals stimulate the DC maturation, which is characterized by an increase in antigen presentation, expression of costimulatory molecules, and subsequent stimulation of naïve T cells in lymphoid organs (Banchereau and Steinman 1998). In order to mirror the physiopathological DC activation process, we chosen three different stimuli: 1) a pro-inflammatory molecule cocktail mimicking inflammation signal composed of IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  and IL-6 (MCM-mimic); 2) the lipopolysaccharide (LPS) which is a component of the bacterial wall and 3) the CD40L, protein expressed by activated T-cells.

As largely documented in the literature, iDCs are CD14<sup>-</sup> (Fig. 1B), HLA-DR<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> (Fig. 1A). A minority of matured CD83<sup>+</sup> cells was detected in a donor-dependent manner (Fig. 1A). As expected, a strong increase in the expression of HLA-DR, CD86 and CD83 was observed following the maturation of DCs with the three different maturation stimuli (Fig. 1A). Nevertheless, it is noticeable that LPS did not lead to a homogenous mature DC population as indicated by the presence of a CD83<sup>-</sup> subpopulation at 48 h of maturation (Fig. 1A). This incomplete maturation may be due to the low LPS concentration used (20ng/mL). However, higher concentrations are known to induce DC apoptosis *in vivo* and could interfere with our experimental purpose (De Smedt, Pajak et al. 1998). DC population purity was assessed by FACS analysis using anti-TCR, CD19 and CD14 antibodies. Ours results clearly indicate that the DC culture was devoid of T-cell, B-cell and monocyte contamination (Fig. 1B).

Mature and immature DCs were subjected to functional assays: Mixed Leukocyte Reaction (MLR) and IL-12p70 secretion. DCs matured with the MCM-mimic induced the highest rate of T cell proliferation rate in MLR (Fig. 1C), but they did not secrete IL-12p70 (Fig. 1D) as already reported by other groups (Kalinski, Vieira et al. 2001; Jongmans, Tiemessen et al. 2005). Moreover, the CCR7 receptor, a migration marker, was induced under MCM-mimic maturation as previously described (data not shown and (Scandella, Men et al. 2002)). In contrast to MCM-mimic, LPS and CD40L were very good DC-inducers of IL-12p70 secretion (Fig. 1D), however they induced sub-optimal proliferation levels of PBMC (Fig. 1C). These results demonstrate that DCs matured under different maturation conditions have different functional abilities.

#### **MCM-mimic and LPS induced gene expression profiles in DC.**

##### *CANVAC microarray design*

To evaluate the contribution of different inducers on the global transcriptional profiling of mDCs, we performed microarray analysis on iDCs stimulated for 3, 24 and 48 h with LPS or MCM-mimic. MCM-mimic is a cocktail of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  and IL-6), which induces DC maturation. Stimulation was repeated on two independent donors. So we obtained 4 RNA samples per donor and 1 reference RNA sample that were converted into dye-labeled cDNA (as dye-swap was performed, we get 8 RNA samples per donor and 2 RNA references). The 18 samples were then hybridized to human ImmuneArray cDNA arrays (UHN Microarray Center, University of Toronto, ON, Canada). This focused immune array was provided by CANVAC as part of a larger study (Genome Canada/Quebec project title 'S2K'). The array contained an assortment of genes from different pathways and functional classes. The larger study covered approximately 3000 samples to be incorporated into the modeling and for this reason samples were analyzed through an indirect design using a commercial universal human RNA probe as a reference. Samples and the universal RNA were labeled with Cy5 and Cy3, respectively. Dye-

swap was performed to investigate the proportion of dye incorporation between Cy3 and Cy5; no significant differences between the dyes were observed (data not shown).

#### *Preprocessing of microarray data*

First, we did a preprocessing analysis to determine genes that are modulated in comparison to reference RNA. After scanning, microarray data were screened for quality, and normalized within and between arrays using Lowess and quantile normalization respectively. Outliers were removed before subsequent analysis. Among 3756 transcripts present on the microarray, 3583 answered to the inclusion criteria imposed by the preprocessing analysis and 3161 genes are indexed by NCBI. The 3161 NCBI reference genes of the chips were grouped according to known functions and pathways using the KEGG classification. The genes were then arranged into 162 different functional groups, some genes were members of more than one group. Thirteen immune system-related groups were represented (Fig. 4). The genes belonging to signalling pathways (MAPK, cytokine-cytokine receptors and Jak-Stat pathways) were among the most regulated by the maturation stimuli. The maturation process also affected transcripts associated to the DC function (NK cell mediated cytotoxicity or T and B cells receptor signalling pathway) as well as genes associated to the apoptosis pathway (73 of the total genes found in the different comparisons) (Fig.4).

We then looked at specific maturation related genes like CD83, CD86, IL-12 that we had detected by FACS (Fig. 1). Unfortunately, we were unable to establish a correlation between the microarray data and the cytometry analysis. At the protein level, we observed as expected an up-regulation of these molecules during the maturation process (Fig. 1).

#### *Analysis of maturation effect on gene expression*

For the following analyses, LPS- and MCM-mimic- treated DCs were compared to iDCs and were compared together at three time points (3, 24 and 48 hours). Differentially expressed genes (DEG) were identified using LIMMA statistical package in R (moderated t-statistic pvalue < 0.05 and/or fold change > 1.5). The

Venn diagram in Fig. 2 shows that largest number of genes (345 genes) is affected with MCM-mimic during the time course, whereas LPS was responsible for the smallest number of DEG induction (253 genes). However, if we are doing a comparison at different time points, LPS has larger effect on gene expression very earlier than MCM-mimic (98 modulated gene with LPS versus 57 genes with MCM-mimic at 3 h; Fig. 3). As for MCM-mimic, its action was optimal later at 24 and 48h. 157 and 171 DEG were detected at 24 and 48h compared to 30 and 27 DEG in presence of LPS, respectively (Fig. 3). The diagram also shows that MCM-mimic and LPS stimuli shared more DEG during the time course (at 3 hours : 28 DEG ; at 24 hours ; 68 DEG and at 48 hours : 63 DEG ; Fig. 3). These data suggest that LPS, compared to MCM-mimic induces very early gene expression changes. However, ending the time course, both stimuli have more targets in common.

#### **Apoptosis related gene expression during maturation**

Among the genes found for the different classes, 73 genes were members of the apoptosis pathway. (Fig. 4). It was already demonstrated that apoptosis pathway was regulated by maturation (Vizzardelli, Pavelka et al. 2006). We observed that LPS treatment induces a significant number of apoptotic related DEG at the beginning of the time course (20 DEG at 3 hours) and this number diminished with the maturation time (8 DEG at 48 hours) (Table 1C). The reverse phenomenon occurs with MCM-mimic stimulus. At 3 hours, only 8 DEG were induced whereas 13 DEG were detected at 48 hours (Table 1C). Among these genes, many are anti-apoptotic. For the majority of these genes the expression increases with the maturation stimuli, especially with the MCM-mimic. In particular, we observed a significant upregulation of anti-apoptotic genes which inhibit caspase dependent death. In particular, we observed the down-regulation of the pro-apoptotic genes CASP7 and Bim and the upregulation of survival genes BIRC3 (cIAP-2), BIRC6, CFLAR (Casper or FLIP) and BCL2A1 (Bfl1). All of these genes inhibit caspase dependent apoptosis. Unexpectedly, we observed an increase in CASP8 and CASP3 expression by both

stimuli and over the time course. However, the increase in the expression of the caspase 8 inhibitors CFLAR (FLIP) and BIM would neutralize the effect of these effector caspases, especially with MCM-mimic treatment (Table 1C). MCM-mimic stimulus decreased CASP7 expression and increased BIRC3 (IAP-2) expression at the same time. BIRC3 (cIAP-2) is known to block CASP7 activity. The maturation is also responsible for the increase of BCL2A1 (Bfl1) expression that prevents mitochondrial depolarization.

To validate and better characterize apoptosis-related gene expression profile, we have performed RPA on iDCs, MCM-mimic, LPS and CD40L matured DCs. The experiments were done at 48 h maturation, which is the time point when CD83 expression level is the highest (Fig 1A). Caspase, Bcl-2 and IAP related members expression profiles were assessed using RPA kits. We observed that MCM-mimic stimulation does not modify the expression of CASP2, -3, -6 and -9. We could observe a decrease of the expression of CASP1, -4, -8 and -10 (Fig. 5A). Of interest, LPS stimulation induces an overall increase of several caspases (Fig. 5A). We did not see caspase RNA expression increases with CD40L stimulation (Fig. 5A). Interestingly, RPA experiments showed that the CASP7 was largely increased by MCM-mimic and LPS but not by CD40L (Fig. 5A) and suggest that maturation stimulus classes trigger different apoptosis-related gene expression programs. These data did not confirm the CASP8 variations observed with the microarray.

We also analyzed the expression of the member of the Bcl-2 family (Fig. 5B). We observed that the anti-apoptotic members are strongly increased during the maturation particularly under MCM-mimic maturation except for Mcl-1, which is upregulated by the three stimuli (Fig. 5B). Thus, Bcl-x(L,S), Bfl-1 (BCL2A1), Bcl-2 and Mcl-1 expression are strongly increased under MCM-mimic induced maturation (Fig. 5B). Every mRNA expression changes except for Mcl-1 was already confirm at a protein level (Crabe, El-Sharif et al. 2007). On the other hand, the pro-apoptotic Bak, Bax and Bid were also induced under MCM-mimic condition but to a lower extent (Fig 5B). Bid and Bak were also upregulated by LPS treatment (Fig. 5B). Of interest, LPS stimulation induces a slight decrease of Bcl-x(L,S) expression. As a general rule,



CD40L does not seem to have a clear effect on Bcl-2 family member expression at least at 48 h long maturation.

Overall, we clearly demonstrate that DC maturation strongly increases the cIAP-2 (BIRC3) RNA expression in every conditions; MCM-mimic seems to be a better inductor than LPS (Fig. 5C). IAP-1 expression was also increased by MCM-mimic and LPS but less than cIAP-2 (BIRC 3) (Fig. 5C). Interestingly, IAP family member are not similarly regulated by the maturation stimuli. Indeed, XIAP and more clearly NAIP messenger levels are downregulated at 48 h (Fig. 5C) only in the presence of MCM-mimic. Finally, cIAP-1, TRPM2 were detected only in one RPA of the two RPA analyzed. These data confirm the clear cIAP-2 (BIRC3) increase observed by microarray (Table 1C).

#### *Influence of maturation on MAPK and NFkB pathway*

We observed that the MAPK response is immediately induced (around 20 DEG at 3 and 24 hours) and diminished later (around 10 DEG) (Table 1A). The NFkB pathway is also strongly regulated by maturation as shown by the large increase in NFKB1 and NFKB2 expression (Table 1A). We also demonstrated a clear up-regulation of GADD45B (Table 1A), a NFkB target gene (De Smaele, Zazzeroni et al. 2001). However, we showed that the expression of RELA is decreased especially with MCM-mimic for the later time points (24 and 48 hours) (Table 1A). RELA is the NFKB1 and NFKB2 partner to form the active complex NFkB (Hoffmann and Baltimore 2006). At later time points (24 and 48 hours) and only with MCM-mimic stimulus, we observe an increase of MAPK8 (JNK1) and MAPK9 (JNK2) expression (Table 1A). This increase corresponds with the decrease of RELA. We also detect a drastic decrease of MAP3K14 (NIK) during the maturation. MAP3K14 is responsible of NFkB activation by forming a complex with IKK $\gamma$  (Hoffmann and Baltimore 2006). The NFkB/MAPK pathway induces the expression of genes associated with DNA repair including GADD45B and ATM, both of which were upregulated in mDCs suggesting a second apoptotic program induced by maturation stimuli.

*Maturation effect on cytokine-cytokine receptor molecules expression*

Another important functional group is the one constituted by the cytokines. We found that the cytokine response is significantly upregulated at the beginning of the culture (3 hours), especially for LPS treatment (Table 1B). The stimulation of DCs with LPS leads to a significant induction of DEG as shown in Table 1B. A significant number of these cytokines are pro-inflammatory chemokines like CCL15, CCL2, CXCL3, CCL20 and CCL3, which are upregulated with LPS treatment (Table 1B). The chemokine CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), which is upregulated with the maturation (Napolitani, Rinaldi et al. 2005) is well increased with both stimuli (Table 1B). In addition, we observed that LPS treatment is a stronger inducer than MCM-mimic (LPS versus MCM-mimic:1,5; Table 1B). With the time of maturation, we noticed the down-regulation of CCR1 (Table 1B), surely due to the stimulation by the chemokines produced in autocrine manner. With MCM-mimic, we could also notice that the stimulation induces a lot of chemokines at the beginning (3 hours), but this response diminishes with time and is replaced by the induction of TNFR expression (24 and 48 hours) (Table 1B). The chemokine expression up-regulation correlates with the pro-inflammatory roles of mDCs. It was already demonstrated that the maturation leads to the increase of IL2RA (Crowley, Inaba et al. 1989; Pollard and Lipscomb 1990; Kronin, Vremec et al. 1998). We observe the same effect with both of the stimuli and for the entire period of culture (Table 1B). Very early after the stimulation, we notice that TNFRSF5 (CD40) is upregulated (Table 1B) confirming the maturation status of the DCs. At 48 hours, we observe that MCM-mimic stimulation augments the co-stimulatory molecule expression like TNFSF7 (CD70), TNFSF13B (BAFF), TNFSF4 (OX40L) and TNFSF13 (APRIL) (Table 1B). This huge increase did not take place with the LPS treatment.

**Validation at protein level**

Several of these genes were confirmed at protein level. To have a larger view, we utilized a high-throughput immunoblotting technique (PowerBlot, BD Biosciences, CA) to identify differential protein changes during maturation. Samples

were collected after 48 hours of maturation as for RNase protection experiments. The data were organized into levels of confidence with scores of 1–10, depending on the expression level, the reproducibility, the intensity and the quality of the signal (Table 2).

As expected we could observe that CD40 expression is significantly upregulated by MCM-mimic treatment (Table 3C) but downregulated following CD40L stimulation (Table 5A). CD40 is a maturation marker; its increase in expression confirms that MCM-mimic induces the DC activation. These data confirm the microarray analysis (Table 1C). CD40 down-regulation in the presence of CD40L is the consequence of the receptor internalization after stimulation. CD40L stimulation also induces the upregulation of CD54 (ICAM-1) expression (Table 5A), which is another maturation marker.

We observed that MCM-mimic and CD40L stimuli induce CASP7 protein expression up-regulation (Table 4B and 6A), although we showed a decrease with the microarray analysis (Table 1C) and an increase with RPA analysis. The up-regulation induced by maturation was also confirmed by western blot (data not shown). The RNA data are also opposite for CASP8 variation. We observed an increase by RPA and with the microarray (Table 1C) technique (Fig. 5A). Moreover, we showed no variation of CASP8 expression by western blot (Crabe, El-Sharif et al. 2007). However, the up-regulation of Bcl-x(L,S), BCL2A1 (Bfl1), CFLAR (Casper or FLIP) is already demonstrated at least with MCM-mimic at 24 hours of maturation (Crabe, El-Sharif et al. 2007). Unfortunately, we were unable to confirm the cIAP-2 (BIRC3) expression modulation at the protein level. However, both RNA detection methods demonstrate a clear up-regulation of cIAP-2 (BIRC3) following the maturation (Fig. 5A). Moreover, Napolitani *et al.* also shows an up-regulation of cIAP-2 (BIRC3) following LPS stimulation (Napolitani, Rinaldi et al. 2005).

## DISCUSSION

The maturation process has diverse effects on DC biology. It represents the link between two DC states (iDCs and mDCs) having different functions and location (Banchereau and Steinman 1998). Upon maturation, DCs acquire new phenotype (function, localization...) based on distinct gene expression program (McIlroy, Tanguy-Royer et al. 2005).

In this study, we investigated the effect of maturation on the human DC transcriptome. For this purpose, we used microarray, RPA and powerblot analyses. Among the genes detected using the microarray, 73 expressed genes are directly related to the apoptosis pathway. As expected, results from the two methods (microarray and RPA) are not perfectly overlaid. Microarray and RPA analysis both revealed that maturation leads to the BIRC3 (cIAP-2) and BCL2A1 (Bfl-1) mRNA up-regulation, however CASP7 expression was discordant. The variations may be due to the probes, which are used for the microarray and for the RPA. Indeed, RPA is based on a single probe that must interact perfectly with the targeted mRNA meaning that variant transcripts might not be detected. Moreover microarray protocol includes an RNA amplification step, which is not present for the RPA. This step could modify the variant transcript abundance. We also observed discrepancy between CASP8 protein and mRNA expression. Indeed DC maturation may also affect RNA stability, translation efficiency and protein degradation/stability

We noticed that the NF $\kappa$ B pathway-related member expression is modified during the DC maturation. We showed an upregulation of NFKB1 and NFKB2 and a downregulation of RELA and MAP3K14 mRNA levels. The NF $\kappa$ B pathway is necessary for the pro-inflammatory cytokines production by DC and the induction of the DNA repair machinery through the expression of MAP and ATM/GADD45b pathways. (Ouaaz, Arron et al. 2002). Two NF $\kappa$ B activation pathways exist (Bonizzi and Karin 2004). The canonical pathway which requires the IKK complex, constituted by the IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  subunits and the regulatory subunit NEMO/IKK $\gamma$ . This complex is activated in response to LPS, TNF- $\alpha$  or CD40L (Delhase, Hayakawa et al. 1999; Li, Van Antwerp et al. 1999; Li, Chu et al. 1999; Senftleben, Li et al. 2001). The noncanonical pathway implicates only IKK $\alpha$  homodimers and MAP3K14

(NIK), which target NF- $\kappa$ B2/p100 for incomplete degradation into p52. The TNFR ligands namely TNFSF5 (CD40L) or TNFSF13B (B Cell activating factor or BAFF) as well as Lymphotoxin B (LTB) are positive regulators of this pathway; however LPS is not able to stimulate this noncanonical NF $\kappa$ B signalling pathway (Hayden and Ghosh 2004). It is suggested that these two pathways have distinct roles (Bonizzi and Karin 2004). The canonical pathway is responsible of the pro-inflammatory roles of DCs, whereas the noncanonical pathway plays a role in the regulation of the immune response. IKK $\alpha$  is involved in the negative regulation of inflammation (Lawrence, Bebien et al. 2005; Li, Lu et al. 2005) and MAP3K14 (NIK) has a role in the development of regulatory T cells (Lu, Gondek et al. 2005). Recently, Tas *et al.* demonstrated that the noncanonical pathway is necessary for the development of regulatory function of human DCs, including the control of IDO expression (Tas, Vervoordeldonk et al. 2007). In our culture conditions, we observe a decrease of MAP3K14 expression suggesting that the noncanonical pathway is diminished. This data was expected because we did not used activating noncanonical pathway stimuli. However, we also observed that MCM-mimic treatment induces an increase of TNFSF13B (BAFFR) expression at 24 hours followed by an upregulation of TNFSF13B (BAFF) expression at 48 hours. BAFF like CD40L, are activators of the noncanonical pathway. This data suggest that the pro-inflammatory roles of the DCs could be switched for a regulatory function by the interaction with lymphocytes via the noncanonical pathway. By this way, the DCs could terminate the immune response. Moreover, a paracrine regulation is not excluded : the activated DCs may regulate the function of neighboring DCs by secreting noncanonical pathway activators. Among NF $\kappa$ B transcriptional targets, GADD45B is inducible by TNF- $\alpha$  (De Smaele, Zazzeroni et al. 2001). Its expression is increased during DC maturation. NF- $\kappa$ B activity is required to terminate JNK signaling triggered by TNFR engagement that leads to apoptosis (Papa, Zazzeroni et al. 2004). It was already showed that GADD45B prevents the TNF- $\alpha$  induced apoptosis by abrogating caspase activation and mitochondrial depolarization through increasing DNA repair machinery (De Smaele, Zazzeroni et al. 2001). The mechanism by which NF- $\kappa$ B protects the cells from TNFR induced apoptosis is mediated by GADD45B (De

Smaele, Zazzeroni et al. 2001). GADD45B also protects cells from CD40 induced apoptosis (Zazzeroni, Papa et al. 2003). We observed an increase of MAPK8 (JNK1) and MAPK9 (JNK2) but we also detected a concomitant increase of the inhibitor GADD45B. This retrocontrol pathway could explain why in certain culture conditions TNFR stimulation was not an apoptosis inducer but a maturation stimulator. However, an expression increase did not mean an activation upregulation, because the activation is regulated by phosphorylation. It was already demonstrated that JNK/NF- $\kappa$ B activation balance modulates TNFR-initiated apoptosis of DCs (Kriehuber, Bauer et al. 2005). However the mechanism remains unclear. The presence of GADD45B is a good candidate to explain the DC resistance to TNFR induced apoptosis.

Our results are in agreement with Vizzardelli *et al.* who reported using microarray that the apoptosis-related gene expression was modulated by LPS-induced maturation in mouse DCs (Vizzardelli, Pavelka et al. 2006). These authors reported that apoptosis is the largest identified functional cluster. Some genes like Fas, GADD45B, Bcl-xL or BIRC3 (cIAP-2) were upregulated by LPS maturation. We also compared our data with the ones published by Napolitani *et al.*, who have stimulated monocyte derived DC with LPS for 2 and 8 hours (Napolitani, Rinaldi et al. 2005). For BIRC3 (cIAP-2), CFLAR (Casper or FLIP), BCL2A1 (Bfl1) and CASP8 up-regulations, our data are consistent with those obtained by Napolitani *et al.* The data of Napolitani *et al.* confirm the increase of CASP7 showed by RPA (Napolitani, Rinaldi et al. 2005). By powerblot, we have observed a decrease of Aven protein which was also confirmed at least at the mRNA level by Napolitani (Napolitani, Rinaldi et al. 2005). Aven is an apoptosis inhibitor that interacts with Bcl-xL and enhances his anti-apoptotic action (Chau et al 2000). This data comparison highlights the fact that we cannot use only one method to evaluate transcriptome variations. The BIRC3 (cIAP-2) and BCL2A1 (Bfl1) up-regulation is always observed during the maturation, independently of the method used. These two genes are under NF $\kappa$ B transcriptional control (Chu, McKinsey et al. 1997; Wang, Guttridge et al. 1999). BIRC3 (cIAP-2) expression is upregulated very early at 3 hours no matter of the stimuli used. Napolitani *et al.* also demonstrate this rapid increase in expression (at 2 hours) with

LPS (Napolitani, Rinaldi et al. 2005). Others stimuli induce the BIRC3 (cIAP-2) expression as shown by Huang *et al.* (Huang, Liu et al. 2001). BIRC3 (cIAP-2) inhibits in the terminal caspase such as CASP3, -7 and -9 (Deveraux, Takahashi et al. 1997; Srinivasula, Hegde et al. 2001). Its action takes place very late in the apoptosis pathway. Its expression increases fast and strongly, suggesting that BIRC3 (cIAP-2) function is important during the maturation. BCL2A1 (Bfl1), a Bcl-2 family member, blocks the mitochondrial related apoptosis by preventing mitochondrial depolarization (Lee, Park et al. 2002; Kim, Kim et al. 2005; Mandal, Borowski et al. 2005). Its induction upon different DC maturation stimuli was already demonstrated (Huang, Liu et al. 2001; Napolitani, Rinaldi et al. 2005). Conversely to BIRC3 (cIAP-2), BCL2A1 (Bfl1) is a late-induced gene emerging at 24 hours of stimulation with MCM-mimic. However, we and Napolitani *et al.* (Napolitani, Rinaldi et al. 2005) confirmed an early increase (2 and 3 hours respectively) using LPS. It seems like BCL2A1 (Bfl1) expression is regulated in stimulus and time dependent manner.

Of interest, although some pro-apoptotic gene expression is stimulated, the corresponding inhibitor expression is increased as the same time. So DCs seem to be in a «ready-to-die» state suggesting the potential to rapidly cleared them.

In conclusion, these data show the complexity and the possible consequences of the gene expression affected by the DC maturation. The overall transcriptome changes suggest that maturation render DC resistant to the apoptosis to complete the initiation step of the immune response.

**REFERENCES**

- Ardeshna, K. M., Pizzey, A. R., Devereux, S., and Khwaja, A. (2000). The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96, 1039-1046.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *AnnuRevImmunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Bjorck, P., Banchereau, J., and Flores-Romo, L. (1997). CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *IntImmunol* 9, 365-372.
- Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *JExpMed* 180, 1263-1272.
- Chau B.N., E.H. Cheng, D.A. Kerr and J.M. Hardwick, Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1, *Mol Cell* 6 (2000), pp. 31-40
- Chen, A., Xu, H., Choi, Y., Wang, B., and Zheng, G. (2004). TRANCE counteracts FasL-mediated apoptosis of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol* 231, 40-48.
- Chen, M., Wang, Y. H., Wang, Y., Huang, L., Sandoval, H., Liu, Y. J., and Wang, J. (2006). Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 311, 1160-1164.
- Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H., and Ballard, D. W. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *ProcNatlAcadSciUSA* 94, 10057-10062.



- Crabe, S., El-Sharif, E., Beaulieu, S., and SÇkaly, R. P. (2006). Multi-level mechanisms of regulation Fas-mediated apoptosis during dendritic cell maturation, In unpublsh.
- Crowley, M., Inaba, K., Witmer-Pack, M., and Steinman, R. M. (1989). The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol* 118, 108-125.
- De Smaele, E., Zazzeroni, F., Papa, S., Nguyen, D. U., Jin, R., Jones, J., Cong, R., and Franzoso, G. (2001). Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates proapoptotic JNK signalling. *Nature* 414, 308-313.
- De Smedt, T., Pajak, B., Klaus, G. G., Noelle, R. J., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1998). Antigen-specific T lymphocytes regulate lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo. *JImmunol* 161, 4476-4479.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 284, 309-313.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.
- Drakesmith, H., O'Neil, D., Schneider, S. C., Binks, M., Medd, P., Sercarz, E., Beverley, P., and Chain, B. (1998). In vivo priming of T cells against cryptic determinants by dendritic cells exposed to interleukin 6 and native antigen. *ProcNatlAcadSciUSA* 95, 14903-14908.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Virzi, E., Rescigno, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur J Immunol* 31, 2539-2546.
- Hashimoto, S. I., Suzuki, T., Nagai, S., Yamashita, T., Toyoda, N., and Matsushima, K. (2000). Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood* 96, 2206-2214.
- Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224.

- Hoffmann, A., and Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev* 210, 171-186.
- Hoves, S., Krause, S. W., Halbritter, D., Zhang, H. G., Mountz, J. D., Scholmerich, J., and Fleck, M. (2003). Mature but not immature Fas ligand (CD95L)-transduced human monocyte-derived dendritic cells are protected from Fas-mediated apoptosis and can be used as killer APC. *J Immunol* 170, 5406-5413.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L. C., Korn, J. M., Young, R. A., Lander, E. S., and Hacohen, N. (2001). The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294, 870-875.
- Ingulli, E., Mondino, A., Khoruts, A., and Jenkins, M. K. (1997). In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med* 185, 2133-2141.
- Jongmans, W., Tiemessen, D. M., van, V. I., Mulders, P. F., and Oosterwijk, E. (2005). Th1-polarizing capacity of clinical-grade dendritic cells is triggered by Ribomunyl but is compromised by PGE2: the importance of maturation cocktails. *J Immunother* 28, 480-487.
- Kalinski, P., Vieira, P. L., Schuitemaker, J. H., de Jong, E. C., and Kapsenberg, M. L. (2001). Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 97, 3466-3469.
- Kastenmuller, W., Drexler, I., Ludwig, H., Erfle, V., Peschel, C., Bernhard, H., and Sutter, G. (2006). Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity. *Virology* 350, 276-288.
- Kim, H., Kim, Y. N., Kim, H., and Kim, C. W. (2005). Oxidative stress attenuates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bfl-1 induction. *Oncogene* 24, 1252-1261.
- Koppi, T. A., Tough-Bement, T., Lewinsohn, D. M., Lynch, D. H., and Alderson, M. R. (1997). CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 27, 3161-3165.
- Kriehuber, E., Bauer, W., Charbonnier, A. S., Winter, D., Amatschek, S., Tamandl, D., Schweifer, N., Stingl, G., and Maurer, D. (2005). Balance between NF-kappaB and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. *Blood* 106, 175-183.

- Kronin, V., Vremec, D., and Shortman, K. (1998). Does the IL-2 receptor alpha chain induced on dendritic cells have a biological function? *Int Immunol* *10*, 237-240.
- Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G. Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005). IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* *434*, 1138-1143.
- Lee, H. W., Park, S. J., Choi, B. K., Kim, H. H., Nam, K. O., and Kwon, B. S. (2002). 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* *169*, 4882-4888.
- Li, Q., Lu, Q., Bottero, V., Estepa, G., Morrison, L., Mercurio, F., and Verma, I. M. (2005). Enhanced NF-kappaB activation and cellular function in macrophages lacking IkappaB kinase 1 (IKK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 12425-12430.
- Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K. F., and Verma, I. M. (1999a). Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* *284*, 321-325.
- Li, Z. W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999b). The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* *189*, 1839-1845.
- Lu, L. F., Gondek, D. C., Scott, Z. A., and Noelle, R. J. (2005). NF kappa B-inducing kinase deficiency results in the development of a subset of regulatory T cells, which shows a hyperproliferative activity upon glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene stimulation. *J Immunol* *175*, 1651-1657.
- Ludewig, B., Odermatt, B., Landmann, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1998). Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *JExpMed* *188*, 1493-1501.
- Mandal, M., Borowski, C., Palomero, T., Ferrando, A. A., Oberdoerffer, P., Meng, F., Ruiz-Vela, A., Ciofani, M., Zuniga-Pflucker, J. C., Screpanti, I., *et al.* (2005). The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *JExpMed* *201*, 603-614.
- McIlroy, D., Tanguy-Royer, S., Le Meur, N., Guisle, I., Royer, P. J., Leger, J., Meflah, K., and Gregoire, M. (2005). Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays. *J Leukoc Biol* *78*, 794-803.

- 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.
- Ouaaz, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y., and Beg, A. A. (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity* 16, 257-270.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., Matsuda, S., Nguyen, D. U., Pham, C. G., Nelsbach, A. H., Melis, T., *et al.* (2004). Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *NatCell Biol* 6, 146-153.
- Pollard, A. M., and Lipscomb, M. F. (1990). Characterization of murine lung dendritic cells: similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. *J Exp Med* 172, 159-167.
- Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Foti, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *ImmunolToday* 20, 200-203.
- 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.
- Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Forster, R., and Groettrup, M. (2002). Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 100, 1354-1361.
- Senftleben, U., Li, Z. W., Baud, V., and Karin, M. (2001). IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity* 14, 217-230.
- Smyth, G. K., Michaud, J., and Scott, H. S. (2005). Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21, 2067-2075.
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., and Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116.

- Staudt, L. M., and Brown, P. O. (2000). Genomic views of the immune system\*. *AnnuRevImmunol* 18, 829-859.
- Tas, S. W., Vervoordeldonk, M. J., Hajji, N., Schuitemaker, J. H., van der Sluijs, K. F., May, M. J., Ghosh, S., Kapsenberg, M. L., Tak, P. P., and de Jong, E. C. (2007). Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood*.
- Vizzardelli, C., Pavelka, N., Luchini, A., Zanoni, I., Bendickson, L., Pelizzola, M., Beretta, O., Foti, M., Granucci, F., Nilsen-Hamilton, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2006). Effects of dexamethazone on LPS-induced activation and migration of mouse dendritic cells revealed by a genome-wide transcriptional analysis. *EurJImmunol* 36, 1504-1515.
- Wang, C. Y., Guttridge, D. C., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S., Jr. (1999). NF- $\kappa$ B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *MolCell Biol* 19, 5923-5929.
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *JExpMed* 185, 317-328.
- Zazzeroni, F., Papa, S., Algeciras-Schimmich, A., Alvarez, K., Melis, T., Bubici, C., Majewski, N., Hay, N., De Smaele, E., Peter, M. E., and Franzoso, G. (2003). Gadd45 beta mediates the protective effects of CD40 costimulation against Fas-induced apoptosis. *Blood* 102, 3270-3279.

## TABLE LEGENDS

**Table 1 : Differential gene expression analyses using microarrays in DCs exposed to LPS or MCM treatments during time course.** Fold changes were obtained by calculated ratio between mDC and iDC (mDC/iDC) for each condition. DEG detected with LPS and MCM-mimic treatments are represented. A comparison between LPS and MCM-mimic was also done. For each pathway, a gene list with an absolute fold change > 1,5 for each maturation time and stimulus was assessed. Fold changes represented in green and red are downregulated and upregulated, respectively. A) MAPK signaling pathway. B) Cytokine-cytokine receptor related gene expression. C) Apoptosis related gene expression.

**Table 2: Parameters used by BD to assign confidence level to changes in protein expression.** The confidence level is calculated by comparing proteins using a 3X3 matrix composed of: Run 1 of control is compared to R1, R2 and R3 of Experimental, R2 of control is compared to R1, R2, and R3 of Experimental, and R3 of control is compared to R1, R2, and R3 of experimental. R1, R2 and R3 are technical replicates. Protein changes are listed in order of confidence, 10 being the highest confidence. \* Low vs high quality signals are determined by analysis software and are not subject to technician judgment. † Low signal data is signals with a normalized quantity <500 or low quality. Results can be inconsistent. ‡ Visual inspection is done by a technician and there are instances when the band 1 (signal) is not visible to the human eye but is still discerned by the analysis software. A greater confidence value is assigned when the visual inspection could be confirm the software based determination. So when the technician is unable to see the band a lower confidence is assigned to the signal. "+" represents an increase in protein level in the experimental sample relative to control. "-" represents a decrease in protein level in the experimental sample relative to control.

**Table 3: Protein changes in MCM-mimic treated DC relative to iDC.** See table 2

**Table 4: Protein changes in LPS treated DC relative to iDC.** See table 2

**Table 5: Protein changes in CD40L treated DC relative to iDC.** See table 2

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1 : Characterization of DC.** After 6 days of culture, maturation stimuli were added for two days. A) Culture purity was assessed by flow cytometry with anti-TCR, CD19, CD14 and HLA-DR antibodies. B) DC maturation was verified by flow cytometry with anti-CD83, CD86 and HLA-DR antibodies. Acquisition was done on FACSCalibur. Dot plot are representative of 3 independent experiments. C) DC function was verified by MLR assay using thymidine- $H^3$  incorporation. PBMC and DC were mixed at different ratio (the DC number was fixed and the PBMC number vary) and cultured for 5 days. D) Cytokine production was assessed to evaluate DC function. IL-12p70 was measured after 6, 24 or 48 h of maturation. The values were calculated in pg/mL and then converted in log. Graphs are representative of 3 independent experiments.

**Figure 2 : Venn diagram showing the overlap between the genes identified as differentially expressed either in LPS-treated, or in MCM-treated DC.** Each circles represent the set of genes identified by the microarray data analysis to be differentially expressed in a given treatment (LPS or MCM). Numbers in non-overlapping regions of the Venn diagram represent numbers of DEG uniquely in the corresponding treatments; numbers depicted in the intersections between the circles represent numbers of genes present in both sets.

**Figure 3: Venn diagram showing the overlap between the genes identified as differentially expressed during the time course of LPS- and MCM- treated DC.** Each circles represent the set of genes identified by the microarray data analysis to be differentially expressed in a given time (3, 24 and 48 hours). Numbers in non-overlapping regions of the Venn diagram represent numbers of DEG uniquely in the corresponding time; numbers depicted in the intersections between the circles represent numbers of genes present in two or all three sets.

**Figure 4. Functional classification of genes detected with the microarray using KEGG terms.** The pie chart displays the contribution of each functional group. The

functional groups contain genes detected by the microarray all stimuli and time points all together. In the table under the chart, all functional groups are listed.

**Figure 5: Apoptosis related gene expression in DC after 48h of maturation.** After extraction, RNA was hybridized with radioactive probes and digested by RNase. Radioactive gel was exposed and quantified by phospho-imager. A) IAP. B) Bcl-2. and C) caspase family-member expressions were investigated. Lane 1: iDC, lane 2: MCM-treated DC; lane 3: LPS-treated DC and lane 4: CD40L-treated DC. D) Average of two experiments values represent a ratio compared to iDC.

#### SUPPLEMENTARY DATA

**Supplementary data 1: Protein changes in MCM-mimic treated DC relative to iDC.**

**Supplementary data 2: Protein changes in LPS treated DC relative to iDC.**

**Supplementary data 3: Protein changes in CD40L treated DC relative to iDC.**



## MAPK SIGNALLING PATHWAY

LPS 3 hours			MCM-mimic 3 hours			LPS vs MCM 3hours		
Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change
IL1R1	NP_000868	-2.20	PPP3CB	NP_066955	-2.12	NFATC4	NP_004545	-2.89
PPP3CB	NP_066955	-2.00	STMN1	NP_981946	-1.93	CDC42	NP_426359	-2.21
MAP3K6	NP_004663	-1.90	SOS2	NP_008870	-1.66	IL1R1	NP_000868	-1.83
PRKCB1	NP_997700	-1.87	RASA1	NP_072179	-1.65	MAPKAPK3	NP_004626	-1.71
PPP3R1	NP_000936	-1.83	MEF2C	NP_002388	-1.62	KRAS2	NP_203524	1.51
TAOK3	NP_057365	-1.61	PRKCB1	NP_997700	-1.57	RASA1	NP_072179	1.70
STMN1	NP_981946	-1.58	DUSP1	NP_004408	1.56	DUSP14	NP_008957	1.84
PPM1A	NP_808821	-1.53	NFKB2	NP_002493	1.61	MAP3K5	NP_005914	1.96
NFATC4	NP_004545	-1.53	IL1A	NP_000566	1.62	PDGFB	NP_148937	2.24
TRAF2	NP_066961	-1.50	GADD45B	NP_056490	1.62	CASP3	NP_116786	2.49
MAPK8IP1	NP_005447	1.53	HSPA2	NP_068814	1.67			
DUSP6	NP_073143	1.54	MAPK3	NP_002737	1.68			
TP53	NP_000537	1.55	MAPKAPK3	NP_004626	1.71			
DUSP8	NP_004411	1.65	CASP3	NP_116786	1.78			
GADD45B	NP_056490	1.68	NFATC4	NP_004545	1.80			
MAP3K5	NP_005914	1.79	PDGFB	NP_148937	3.23			
MAP2K1	NP_002746	1.80	CDC42	NP_426359	3.31			
DUSP14	NP_008957	1.87	NFKB1	NP_003989	3.31			
IL1A	NP_000566	2.13						
CASP3	NP_116786	4.43						
NFKB1	NP_003989	4.71						
PDGFB	NP_148937	7.23						

LPS 24hours			MCM-mimic 24 hours			LPS vs MCM 24hours		
Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change
MAP3K14	NP_003945	-3.03	PRKCB1	NP_997700	-4.49	MAPK8	NP_620637	-1.84
PRKCB1	NP_997700	-2.59	MAP3K14	NP_003945	-3.96	DUSP1	NP_004408	-1.64
PTPN7	NP_542156	-1.96	PTPN7	NP_542156	-2.25	FLNB	NP_001448	-1.51
IL1R1	NP_000868	-1.92	IL1R1	NP_000868	-2.07	RAP1A	NP_002875	1.63
PPP3R1	NP_000936	-1.67	STMN1	NP_981946	-1.68	PRKCB1	NP_997700	1.74
SOS2	NP_008870	-1.67	TAOK3	NP_057365	-1.64	PDGFB	NP_148937	2.03
PPP3CB	NP_066955	-1.64	RELA	NP_068810	-1.61	HSPA2	NP_068814	2.08
MEF2C	NP_002388	-1.59	SOS2	NP_008870	-1.59			
RELA	NP_068810	-1.53	RAP1A	NP_002875	-1.59			
MAPK1	NP_620407	1.54	MAP2K6	NP_114365	-1.53			
DUSP8	NP_004411	1.54	FLNB	NP_001448	1.52			
MAPKAPK3	NP_004626	1.55	ATF4	NP_877962	1.57			
SRF	NP_003122	1.58	HSPA2	NP_068814	1.67			
CASP3	NP_116786	1.61	SRF	NP_003122	1.69			
MAP2K1	NP_002746	1.68	MAP2K1	NP_002746	1.71			
NFKB2	NP_002493	1.73	GADD45A	NP_001915	1.72			
GADD45B	NP_056490	2.44	MAPK8	NP_620637	1.91			
NFKB1	NP_003989	2.82	MAPKAPK3	NP_004626	2.13			
HSPA2	NP_068814	3.48	DUSP1	NP_004408	2.19			
			GADD45B	NP_056490	2.77			
			NFKB1	NP_003989	3.08			

LPS 48hours			MCM-mimic 48hours			LPS vs MCM 48hours		
Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change
MAP3K14	NP_003945	-5.36	PRKCB1	NP_997700	-4.60	NFKB1	NP_003989	-3.63
IL1R1	NP_000868	-2.39	MAP3K14	NP_003945	-3.42	GADD45B	NP_056490	-1.87
STMN1	NP_981946	-1.90	IL1R1	NP_000868	-2.55	STMN1	NP_981946	-1.75
PRKCB1	NP_997700	-1.79	PTPN7	NP_542156	-2.30	GADD45A	NP_001915	-1.65
MAP2K6	NP_114365	-1.62	TAOK3	NP_057365	-1.82	MAPKAPK3	NP_004626	-1.65
FLNB	NP_001448	1.63	PRKY	NP_002751	-1.69	MAP3K14	NP_003945	-1.63
MAP3K7IP2	NP_663317	1.71	MAPK9	NP_620709	-1.69	DUSP1	NP_004408	-1.60
DUSP1	NP_004408	1.73	MAP2K6	NP_114365	-1.63	MEF2C	NP_002388	1.52
RAP1A	NP_002875	1.84	DUSP6	NP_073143	-1.61	PDGFB	NP_148937	1.57
NFKB1	NP_003989	1.83	RELA	NP_068810	-1.59	PTPN7	NP_542156	1.67

Table 1 A: Differential gene expression analyses using microarrays in DCs exposed to LPS or MCM treatments during time course.

CYTOKINE-CYTOKINE RECEPTOR PATHWAY								
LPS 3 hours			MCM-mimic 3 hours			LPS vs MCM 3hours		
Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change
CCL26	NP_006063	-2.34	CCR1	NP_001286	-2.13	TNFSF13B	NP_006564	-1.97
IL1R1	NP_000868	-2.20	CCL26	NP_006063	-1.71	IL1R1	NP_000868	-1.85
TNFSF13B	NP_006564	-1.54	IL7	NP_000871	-1.50	TNFRSF1B	NP_001057	-1.80
IL2RA	NP_000408	1.57	TNFRSF1B	NP_001057	1.56	CCL16	NP_004581	-1.59
IFNGR2	NP_005525	1.54	IL1A	NP_000566	1.63	CXCR6	NP_006555	-1.56
IL11	NP_000632	1.61	IL2RA	NP_000408	1.65	TNFSF13	NP_742085	-1.50
CCL15	NP_116741	1.63	IL6R	NP_852004	1.67	CCL15	NP_116741	1.51
IL23A	NP_057668	1.66	TNFRSF5	NP_690593	1.72	IL7	NP_000871	1.52
TNFRSF7	NP_001233	1.70	CSF2RA	NP_758452	1.79	IL15RA	NP_751950	1.53
IL10RA	NP_001549	1.78	IFNGR2	NP_005525	1.80	KIT	NP_000213	1.56
KIT	NP_000213	1.80	TNFRSF7	NP_001233	1.87	CCL1	NP_002972	1.73
TNFRSF5	NP_690593	1.81	CXCL3	NP_002081	2.13	CCL20	NP_004582	2.19
CCL13	NP_005399	1.91	CCL3	NP_002974	2.32	PDGFB	NP_148937	2.24
IL6R	NP_852004	1.93	CSF1	NP_757351	2.80	CCL2	NP_002973	2.86
IL15RA	NP_751950	1.99	CCL20	NP_004582	2.85	CSF1	NP_757351	3.74
CCL1	NP_002972	2.00	PDGFB	NP_148937	3.23			
CCL2	NP_002973	2.10						
IL1A	NP_000566	2.13						
CCL3	NP_002974	2.22						
CXCL3	NP_002081	3.05						
CCL20	NP_004582	6.25						
PDGFB	NP_148937	7.23						
CSF1	NP_757351	10.38						

LPS 24hours			MCM-mimic 24 hours			LPS vs MCM 24hours		
Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change
CCL26	NP_006063	-3.90	CCR1	NP_001286	-3.05	IL15RA	NP_751950	-2.21
IL1R1	NP_000868	-1.92	CCL26	NP_006063	-2.74	XCL1	NP_002986	-2.00
CCR1	NP_001286	-1.84	IL1R1	NP_000868	-2.07	TNFSF4	NP_003317	-1.63
CX3CL1	NP_002987	-1.58	CCL2	NP_002973	-1.85	IL2RA	NP_000408	-1.57
IL18	NP_001553	1.50	CCL20	NP_004582	1.51	IL1RAP	NP_608273	-1.54
TNFRSF5	NP_690593	1.61	IL1RAP	NP_608273	1.58	TNFRSF1B	NP_001057	-1.54
CSF1	NP_757351	1.65	CSF2RA	NP_758452	1.59	CX3CL1	NP_002987	-1.51
CCL23	NP_665905	1.73	CXCL3	NP_002081	1.63	CCL3	NP_002974	1.50
IL6R	NP_852004	1.86	IL18	NP_001553	1.63	TNFRSF10C	NP_003832	1.52
CSF2RA	NP_758452	2.11	XCL1	NP_002986	1.73	CCL13	NP_005399	1.53
CCL1	NP_002972	2.17	IFNGR2	NP_005525	1.82	CSF1	NP_757351	1.56
IFNGR2	NP_005525	2.53	TNFSF13	NP_742085	1.88	CCR1	NP_001286	1.66
IL2RA	NP_000408	2.78	TNFRSF1B	NP_001057	2.25	CCL2	NP_002973	1.91
			IL15RA	NP_751950	3.24	PDGFB	NP_148937	2.03
			IL2RA	NP_000408	4.37	CCL23	NP_665905	2.11
						CCL1	NP_002972	2.19

LPS 48hours			MCM-mimic 48hours			LPS vs MCM 48hours		
Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change
CCR1	NP_001286	-2.39	CCR1	NP_001286	-4.01	TNFSF13B	NP_006564	-2.94
IL1R1	NP_000868	-2.39	CCL26	NP_006063	-3.21	IL15RA	NP_751950	-2.77
CCL26	NP_006063	-2.28	IL1R1	NP_000868	-2.55	IL2RA	NP_000408	-2.53
TNFRSF1B	NP_001057	1.61	CCL2	NP_002973	-1.74	TNFSF13	NP_742085	-2.37
IL1RAP	NP_608273	1.93	CCL23	NP_665905	-1.72	TNFSF4	NP_003317	-2.29
IL2RA	NP_000408	2.05	CSF2RA	NP_758452	1.56	TNFSF7	NP_001243	-1.64
			TNFRSF7	NP_001233	1.59	IL15	NP_751915	-1.62
			TNFSF7	NP_001243	1.63	IFNGR2	NP_005525	-1.57
			IL18	NP_001553	1.66	PDGFB	NP_148937	1.57
			TNFRSF1B	NP_001057	2.10	CCR1	NP_001286	1.67
			IFNGR2	NP_005525	2.14	CCL23	NP_665905	1.97
			TNFSF13B	NP_006564	2.27			
			TNFSF4	NP_003317	2.52			
			TNFSF13	NP_742085	2.80			

Table 1 B: Differential gene expression analyses using microarrays in DCs exposed to LPS or MCM treatments during time course.

## APOPTOSIS PATHWAY

LPS 3 hours			MCM-mimic 3 hours			LPS vs MCM 3hours		
Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change
IL1R1	NP_000868	-2,20	PPP3CB	NP_066955	-2,12	IL1R1	NP_000868	-1,85
PPP3CB	NP_066955	-2,00	CASP7	NP_203126	-1,75	BMP4	NP_570912	1,55
PPP3R1	NP_000936	-1,83	NFKB2	NP_002493	1,61	NFKBIA	NP_065390	1,60
BCL2L11	NP_996886	-1,63	IL1A	NP_000566	1,62	CASP8	NP_203522	1,68
CASP7	NP_203126	-1,61	CASP3	NP_116786	1,78	CASP3	NP_116786	2,49
TRAF2	NP_066961	-1,50	BIRC3	NP_892007	2,47			
PRKAR2B	NP_002727	1,50	CASP8	NP_203522	3,55			
BIRC6	NP_057336	1,53	NFKB1	NP_003989	5,11			
CASP6		1,54						
TP53	NP_000537	1,55						
BMP4	NP_570912	1,61						
CFLAR	NP_003870	1,69						
ATM	NP_612150	1,79						
BCL2A1	NP_004040	2,00						
IL1A	NP_000566	2,13						
NFKBIA	NP_065390	2,16						
BIRC3	NP_892007	2,97						
CASP3	NP_116786	4,43						
NFKB1	NP_003989	4,71						
CASP8	NP_203522	5,96						

LPS 24hours			MCM-mimic 24 hours			LPS vs MCM 24hours		
Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change
MAP3K14	NP_003945	-3,03	MAP3K14	NP_003945	-3,96	BIRC3	NP_892007	-1,60
IL1R1	NP_000868	-1,92	CASP7	NP_203126	-2,16	IL1RAP	NP_608273	-1,54
PPP3R1	NP_000936	-1,67	IL1R1	NP_000868	-2,07	TNFRSF10C	NP_003832	1,52
PPP3CB	NP_066955	-1,64	RELA	NP_068810	-1,61			
RELA	NP_068810	-1,53	IL1RAP	NP_608273	1,58			
ATM	NP_612150	1,50	ATM	NP_612150	1,59			
CASP3	NP_116786	1,61	BCL2A1	NP_004040	1,63			
NFKB2	NP_002493	1,73	CFLAR	NP_003870	1,67			
BIRC6	NP_057336	1,97	NFKB1	NP_003989	3,08			
NFKB1	NP_003989	2,82	CASP8	NP_203522	5,40			
BIRC3	NP_892007	3,82	BIRC3	NP_892007	6,11			
CASP8	NP_203522	7,14						

LPS 48hours			MCM-mimic 48hours			LPS vs MCM 48hours		
Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change	Symbol	Acc. Nb.	Fold change
MAP3K14	NP_003945	-5,56	MAP3K14	NP_003945	-3,42	NFKB1	NP_003989	-3,63
IL1R1	NP_000868	-2,39	IL1R1	NP_000868	-2,55	BIRC3	NP_892007	-2,41
BCL2L2	NP_004041	1,50	CASP7	NP_203126	-1,98	CASP8	NP_203522	-1,75
PRKAR1B	NP_002726	1,70	RELA	NP_068810	-1,59	MAP3K14	NP_003945	-1,63
NFKB1	NP_003989	1,83	NFKB2	NP_002493	1,60	BIRC6	NP_057336	-1,58
IL1RAP	NP_608273	1,93	PIK3CA	NP_006209	1,66	CASP7	NP_203126	1,97
BIRC3	NP_892007	2,82	CFLAR	NP_003870	1,69			
CASP8	NP_203522	3,24	NFKBIA	NP_065390	1,81			
			BCL2A1	NP_004040	1,82			
			BIRC6	NP_057336	1,95			
			CASP8	NP_203522	5,69			
			NFKB1	NP_003989	6,66			
			BIRC3	NP_892007	6,77			

Table 1 C: Differential gene expression analyses using microarrays in DCs exposed to LPS or MCM treatments during time course.

LEVEL	DESCRIPTION
10	Changes greater than 2 fold in all 9 comparisons that are from good quality signals and pass a visual inspection‡
9	Changes greater than 1,5-1,9 fold in all 9 comparisons that are from good quality signals and pass a visual inspection‡
8	Changes greater than 2 fold in all 9 comparisons that are from low quality signals* and pass a visual inspection‡
7	Changes greater than 1,25-1,5 fold in all 9 comparisons that are from good quality signals and pass a visual inspection‡
6	Changes greater than 2 fold in all 9 comparisons that are from good quality signals and do not pass a visual inspection‡
5	Changes greater than 1,5-1,9 fold in all 9 comparisons that are from good quality signals and do not pass a visual inspection‡
4	Changes greater than 2 fold in all 9 comparisons that are from low quality signals* and do not pass a visual inspection‡
3	Changes greater than 1,25-1,5 fold in all 9 comparisons that are from good quality signals and do not pass a visual inspection‡
2b	Changes greater than 1,5-1,9 fold in all 9 comparisons that are from low quality signal‡
2a	Changes greater than 1,25-1,5 fold in all 9 comparisons that are from low quality signal‡
1b	Changes greater than 2 fold in 8 of the 9 comparisons that are from good quality signal
1a	Changes greater than 1,5-1,9 fold in 8 of the 9 comparisons that are from good quality signal

Table 2: Parameters used by BD to assign confidence level to changes in protein expression.

<b>Changes in MCM-mimic relative to IDC</b>				
<b>Protein name</b>	<b>Level</b>	<b>Areas of Research</b>	<b>Swiss Prot ID</b>	<b>Sign of change</b>
<b>LEVEL 10</b>				
MEK5	10	MAP Kinase Pathway	Q13163	-
<b>LEVEL 7</b>				
TRADD	7	Apoptosis	Q15628	+
<b>LEVEL 4</b>				
ERK1	4	MAP Kinase Pathway	Q63538	+
MEK5	4	MAP Kinase Pathway	Q13163	-
PKBa/Akt	4	Apoptosis	P31749	-
<b>LEVEL 3</b>				
Caspase-7/MCH-3	3	Apoptosis	P55210	+
<b>LEVEL 2b</b>				
CD40	2b	Immunology	P25942	+
<b>LEVEL 1a</b>				
Fas Ligand/CD95L	1a	Apoptosis	P48023	-
<b>LEVEL 1b</b>				
ERK1	1b	MAP Kinase Pathway	Q63538	+

Table 3: Protein changes in MCM-mimic treated DC relative to iDC.

<b>Changes in LPS relative to IDC</b>				
<b>Protein name</b>	<b>Level</b>	<b>Areas of Research</b>	<b>Swiss Prot ID</b>	<b>Sign of change</b>
<b>LEVEL 8</b>				
MKK3b		8 MAP Kinase Pathway	P97293	-
<b>LEVEL 4</b>				
Aven		4 Apoptosis	Q9NQS1	-
<b>LEVEL 2a</b>				
RIP		2a Apoptosis	Q13546	-

Table 4: Protein changes in LPS treated DC relative to iDC.

<b>Changes in CD40L relative to IDC</b>				
<b>Protein name</b>	<b>Level</b>	<b>Areas of Research</b>	<b>Swiss Prot ID</b>	<b>Sign of change</b>
<b>LEVEL 8</b>				
MKK3b	8	MAP Kinase Pathway	P97293	-
<b>LEVEL 7</b>				
Caspase-7/MCH-3	7	Apoptosis	P55210	+
CD54/ICAM-1	7	Cell Adhesion	P05362	+
p38 (pT180/pY182) Phospho	7	MAP Kinase Pathway	Q16539	+
TRADD	7	Apoptosis	Q15628	+
<b>LEVEL 2a</b>				
Aven	2a	Apoptosis	Q9NQS1	-
<b>LEVEL 2b</b>				
CD40	2b	Immunology	P25942	-
ERK1	2b	MAP Kinase Pathway	Q63538	+
<b>LEVEL 1b</b>				
DFF45	1b	Apoptosis	O00273	+

Table 5: Protein changes in CD40L treated DC relative to iDC.

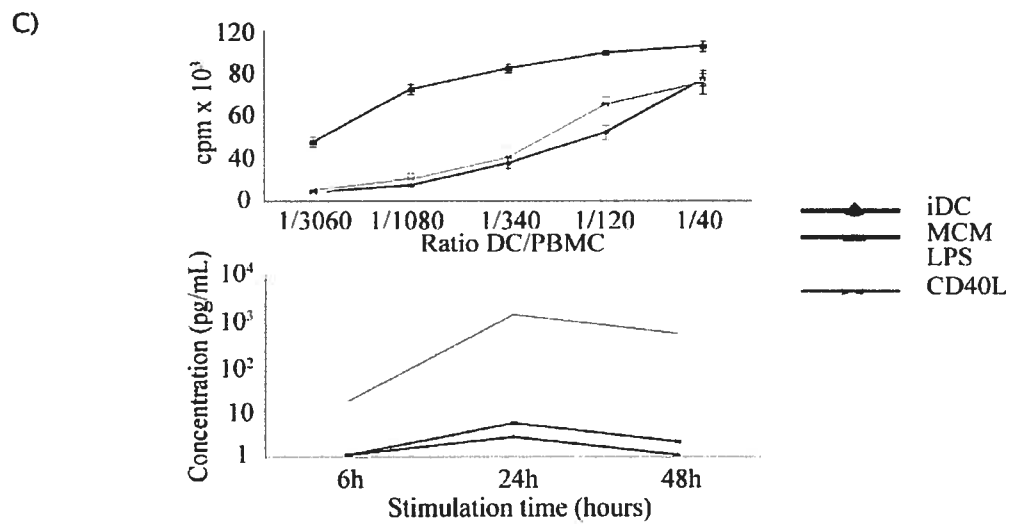
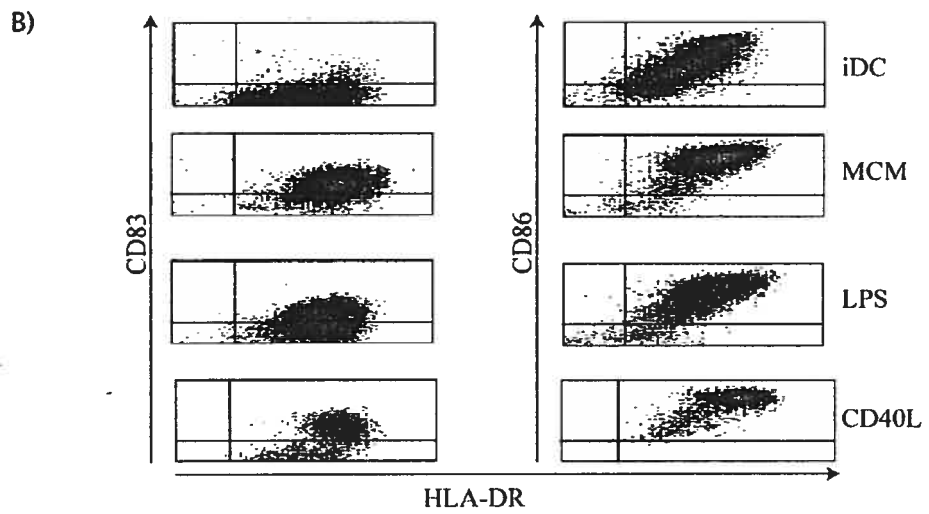
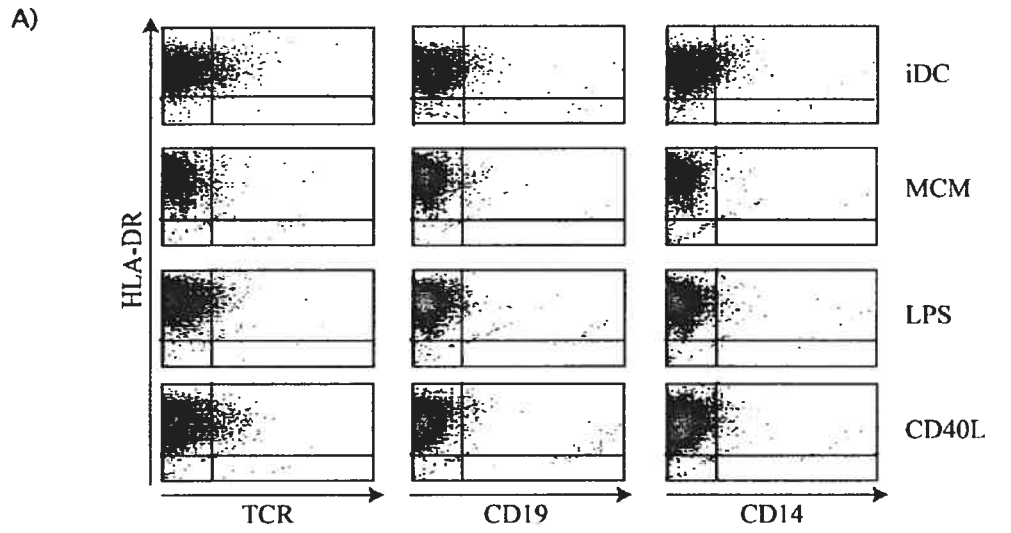


Figure 1 : Characterization of DC.



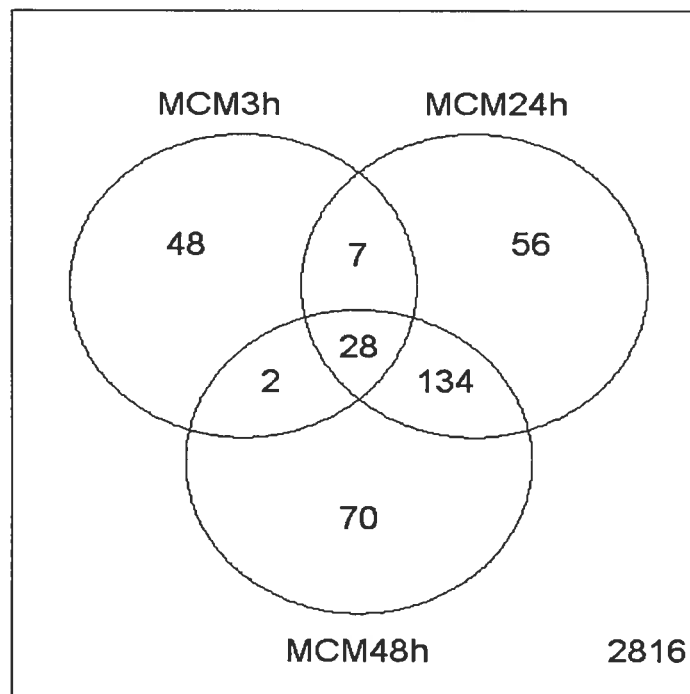
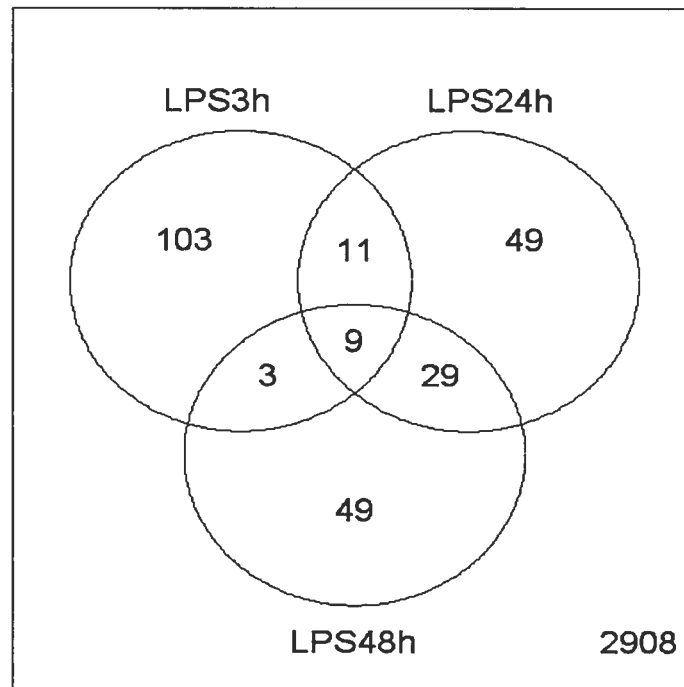


Figure 2 : Venn diagram showing the overlap between the genes identified as differentially expressed either in LPS-treated, or in MCM-treated DC.

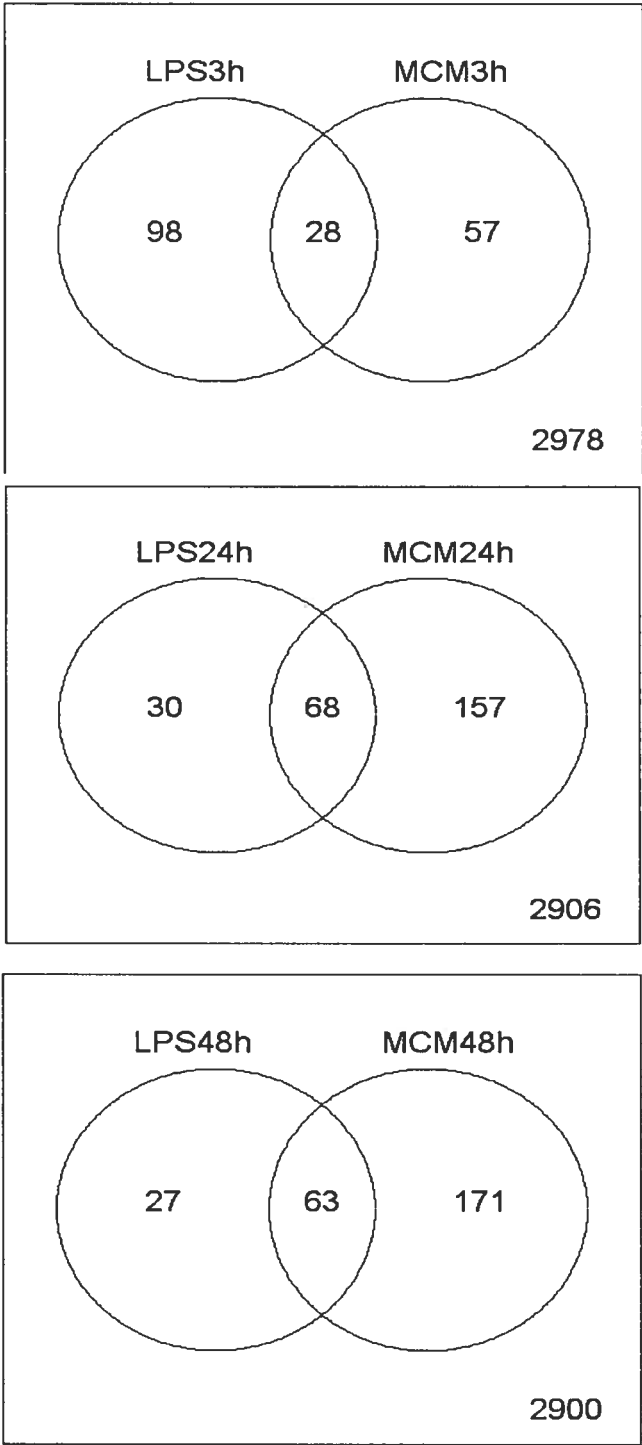


Figure 3: Venn diagram showing the overlap between the genes identified as differentially expressed during the time course of LPS- and MCM- treated DC.

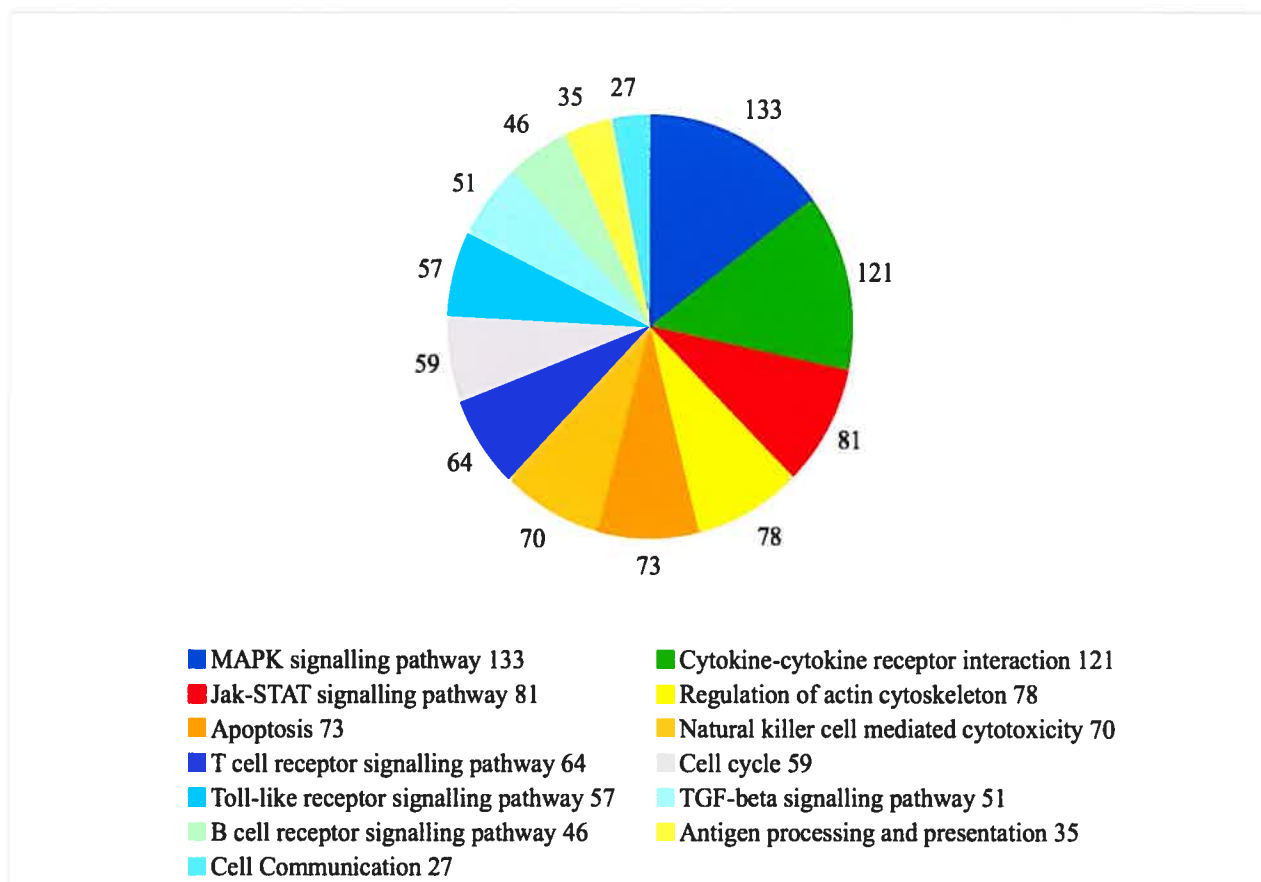


Figure 4. Functional classification of genes detected with the microarray using KEGG terms.

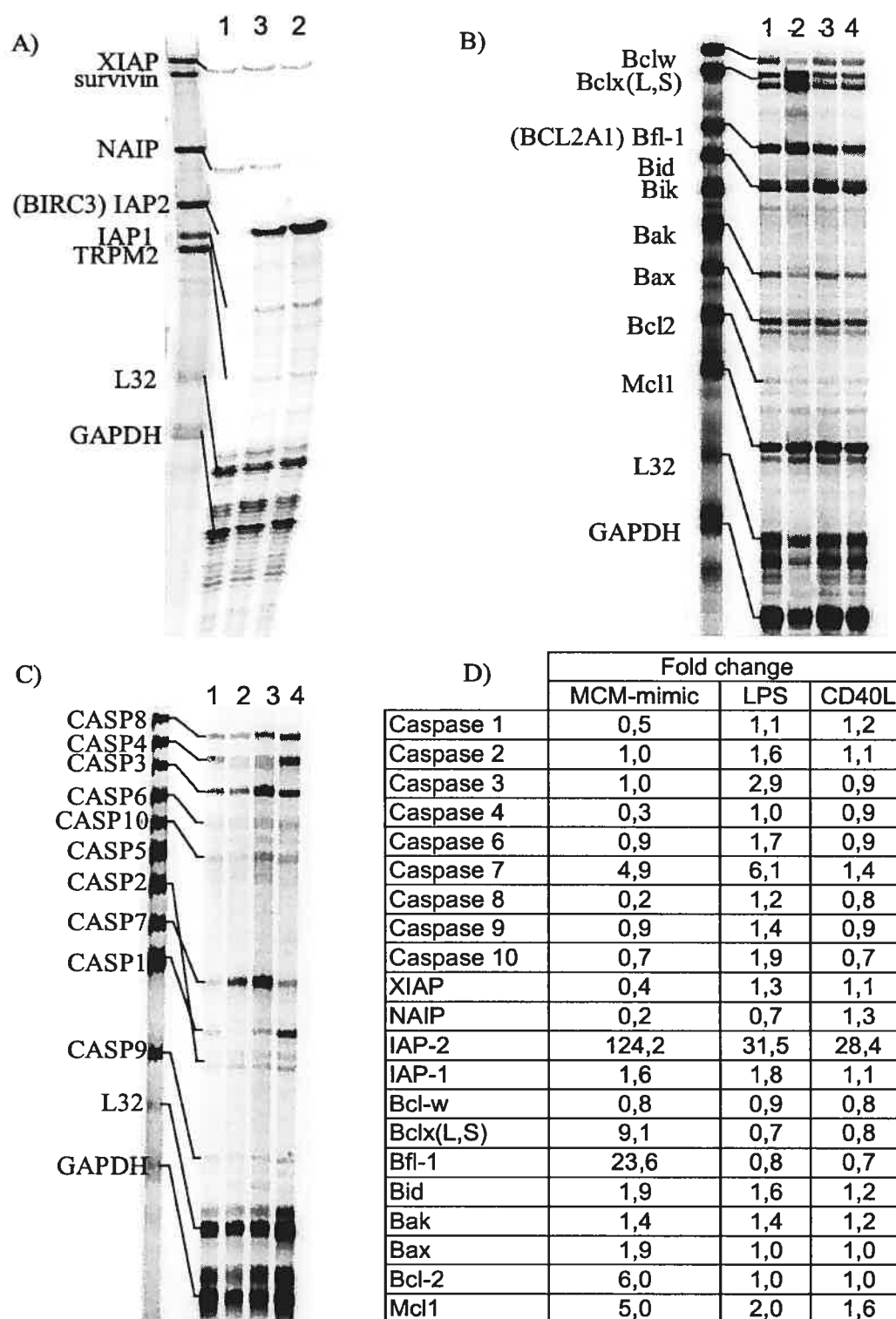


Figure 5: Apoptosis related gene expression in DC after 48h of maturation.

Changes in MCM-mimic relative to IDC				
Protein name	Level	Areas of Research	Swiss Prot ID	Sign of change
<b>LEVEL 10</b>				
ATP Synthase b	10	Mitochondria/Organelles	Q07405	-
Cathepsin D	10	Cancer Research	P07339	-
CIP4	10	Membrane Research	Q15642	+
Fascin	10	Cytoskeleton	Q16658	+
Gelsolin	10	Cytoskeleton	P06396	-
JAM-1	10	Cell Adhesion	Q9Y624	+
MEK5	10	MAP Kinase Pathway	Q13163	-
MnSOD	10	Mitochondria/Organelles	P09671	+
Neurexin I	10	Cell Adhesion	Q63372	-
PTP1B	10	Protein Phosphatases	P18031	+
Rab8	10	GTPases	P24407	+
Raf	10	Cancer Research	P04049	-
Ral A	10	GTPases	P11233	+
<b>LEVEL 9</b>				
NAT1	9	Transcription Factors	P78344	+
<b>LEVEL 8</b>				
Annexin VII	8	Calcium Signaling	P20073	-
hHR23B	8	Cancer Research	P54727	+
MKK3b	8	MAP Kinase Pathway	P97293	-
PTP1B	8	Protein Phosphatases	P18031	+
tyk2	8	Tyrosine KinasesStats	P29597	+
<b>LEVEL 7</b>				
Hsp60	7	Mitochondria/Organelles	P10809	+
Lamp-1	7	Cell Biology	P11279	-
TRADD	7	Apoptosis	Q15628	+
<b>LEVEL 6</b>				
LRP	6	Cancer Research	Q14764	+

Supplementary data 1: Protein changes in MCM-mimic treated DC relative to iDC.

Changes in MCM-mimic relative to IDC				
Protein name	Level	Areas of Research	Swiss Prot ID	Sign of change
<b>LEVEL 5</b>				
Clathrin Heavy Chain	5	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P11442	
GGA2	5	Mitochondria/Organelles	Q99523	-
GGA3	5	Mitochondria/Organelles	Q9NZ52	-
PEX19	5	Mitochondria/Organelles	P40855	-
<b>LEVEL 4</b>				
b-Dystroglycan	4	Cell Adhesion	Q14118	-
CoRest	4	Nucleus & Nuclear Transport	Q9UKL0	+
ERK1	4	MAP Kinase Pathway	Q63538	+
KAP3A	4	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P70188	+
MEK5	4	MAP Kinase Pathway	Q13163	-
NHE-1	4	Calcium Signaling	P26431	+
PITPa	4	Membrane Research	Q00169	+
PKBa/Akt	4	Apoptosis	P31749	-
RanBP1	4	GTPases & GTPase Regulators	P43487	+
RIG-G	4	Transcription Factors	O14879	+
TOK-1	4	Kinases	Q9P288	+
<b>LEVEL 3</b>				
Caspase-7/MCH-3	3	Apoptosis	P55210	+
DMPK	3	Kinases	Q09013	-
GSK-3b	3	Kinases	P18266	-
KNP-1/HES1	3	Mitochondria/Organelles	P30042	-
NSF	3	Mitochondria/Organelles	P46459	+
PKAR1a	3	Protein Kinase A	P17612	-
PTP1C/SHP1	3	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P29350	-
RCC1	3	Nucleus & Nuclear Transport	P18754	+
VASP	3	Cell Adhesion	P0552	-
<b>LEVEL 2a</b>				
Chk2	2a	Cell Cycle	Q9Z265	+
Dyrk	2a	Tyrosine Kinases	Q63470	+
hCNK1	2a	GTPases & GTPase Regulators	O95381	+
Nek3	2a	Kinases	Q9R0A5	+
Ran	2a	GTPases & GTPase Regulators	P17080	+
SHIP-1/p150Ship	2a	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	Q9ES52	+
SPA-1	2a	GTPases & GTPase Regulators	Q96FS4	+
SRPK1	2a	Kinases	Q96SB4	+
Topo IIb	2a	Nucleus & Nuclear Transport	QU2880	+

Supplementary data 1: Protein changes in MCM-mimic treated DC relative to iDC

<b>Changes in MCM-mimic relative to IDC</b>				
<b>Protein name</b>	<b>Level</b>	<b>Areas of Research</b>	<b>Swiss Prot ID</b>	<b>Sign of change</b>
<b>LEVEL 2b</b>				
CD40	2b	Immunology	P25942	+
Csk	2b	Tyrosine Kinases	P32577	-
LITAF	2b	Nucleus & Nuclear Transport	Q99732	+
PTEN	2b	Protein Phosphatases	O00633	+
XRCC4	2b	Nucleus & Nuclear Transport	Q13426	+
<b>LEVEL 1a</b>				
Fas Ligand/CD95L	1a	Apoptosis	P48023	-
LAP2	1a	Membrane Research	Q62733	-
LCB1	1a	Membrane Research	O35704	+
Rabaptin-5	1a	GTPases & GTPase Regulators	Q15276	+
Rap2	1a	Membrane Research	P10114	-
SLP-2	1a	Cytoskeleton	Q9UJZ1	-
<b>LEVEL 1b</b>				
Arp3	1b		P61158	-
Clathrin Heavy Chain	1b	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P11442	+
Dok2/p56dok2	1b	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	O70469	-
ERK1	1b	MAP Kinase Pathway	Q63538	+
ILKAP	1b			-
KIF2	1b	Mitochondria/Organelles	P28740	+
M33	1b	Transcription Factors	P30658	+
p62 Ick ligand	1b	Protein Kinase C	Q13501	+
Rab5	1b	GTPases & GTPase Regulators	P20339	-

Supplementary data 1: Protein changes in MCM-mimic treated DC relative to iDC

Changes in LPS relative to IDC				
Protein name	Level	Areas of Research	Swiss Prot ID	Sign of change
<b>LEVEL 10</b>				
Dok2/p56dok2	10	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	O70469	-
MnSOD	10	Mitochondria/Organelles	P09671	+
PKR/p68 Kinase	10	Kinases	P19525	+
<b>LEVEL 9</b>				
ATP Synthase b	9	Mitochondria/Organelles	Q07405	-
PP2A Catalytic a	9	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P05323	-
PYK2/CAK b	9	Tyrosine Kinases	P70600	+
SRPK1	9	Kinases	Q96SB4	+
<b>LEVEL 8</b>				
hHR23B	8	Cancer Research	P54727	+
MKK3b	8	MAP Kinase Pathway	P97293	-
RIG-G	8	Transcription Factors	O14879	+
<b>LEVEL 7</b>				
Cathepsin D	7	Cancer Research	P07339	-
Endoglin	7	Cancer Research	P17813	-
Neurexin I	7	Calcium Signaling	Q63372	-
Raf	7	Cancer Research	P04049	+
XRCC4	7	Nucleus & Nuclear Transport	Q13426	+
<b>LEVEL 6</b>				
ILKAP	6	Kinases	Q9HOC8	-
LRP	6	Cancer Research	Q14764	+
PKCa	6	Protein Kinase C	P17252	-

Supplementary data 2: Protein changes in LPS treated DC relative to iDC.



Changes in LPS relative to IDC				
Protein name	Level	Areas of Research	Swiss Prot ID	Sign of change
<b>LEVEL 5</b>				
DMPK	5	Kinases	Q09013	-
<b>LEVEL 4</b>				
Aven	4	Apoptosis	Q9NQS1	-
Calreticulin	4	Calcium Signaling	P27797	-
DBP2	4	Cell Cycle	O60231	-
DEK	4	Transcription Factors	P35659	+
PNUTS	4	Protein Phosphatases	O55000	-
RanBP1	4	GTPases & GTPase Regulators	P43487	+
Topo IIb	4	Nucleus & Nuclear Transport	QU2880	-
ZNF191	4	Nucleus & Nuclear Transport	P17028	-
<b>LEVEL 3</b>				
CIP4	3	Membrane Research	Q15642	+
ILK	3	Kinases	Q13418	+
KNP-1/HES1	3	Mitochondria/Organelles	P30042	+
PEX19	3	Mitochondria/Organelles	P40855	-
Ral A	3	GTPases & GTPase Regulators	P11233	+
<b>LEVEL 2a</b>				
Exportin-1/CRM1	2a	Nucleus & Nuclear Transport	O14980	+
RIP	2a	Apoptosis	Q13546	-
SPA-1	2a	GTPases & GTPase Regulators	Q96FS4	+

Supplementary data 2: Protein changes in LPS treated DC relative to iDC.

<b>Changes in LPS relative to IDC</b>				
<b>Protein name</b>	<b>Level</b>	<b>Areas of Research</b>	<b>Swiss Prot ID</b>	<b>Sign of change</b>
<b>LEVEL 2b</b>				
ERK1	2b	MAP Kinase Pathway	Q63538	-
JAK1	2b	Tyrosine Kinases	P23458	+
Jun	2b	Transcription Factors	P05627	-
KAP3A	2b	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P70188	+
PP2A Catalytic a	2b	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P05323	-
<b>LEVEL 1a</b>				
GIT2-short	1a	GTPases & GTPase Regulators		-
RanBP3	1a	Nucleus & Nuclear Transport	O75759	-
<b>LEVEL 1b</b>				
Clathrin Heavy Chain	1b	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P11442	+
Nicastrin	1b	Protein Sorting/Modification	Q92542	-
Rabaptin-5	1b	GTPases & GTPase Regulators	Q15276	+
TRAX	1b	Nuclear Transport	Q99598	+

Supplementary data 2: Protein changes in LPS treated DC relative to iDC.

Changes in CD40L relative to IDC				
Protein name	Level	Areas of Research	Swiss Prot ID	Sign of change
<b>LEVEL 10</b>				
alpha-Tubulin	10	Cytoskeleton	P68366	-
CIP4	10	Membrane Research	Q15642	+
Fascin	10	Cytoskeleton	Q16658	+
JAM-1	10	Cell Adhesion	Q9Y624	+
p62 lck ligand	10	Cell Biology	Q13501	+
Raf	10	Cancer Research	P04049	-
Tapasin	10	Protein Sorting/Modification	O15533	+
<b>LEVEL 9</b>				
ALDH	9	Cell Biology	P00352	+
ILKAP	9		Q9HOC8	-
PTP1B	9	Protein Phosphatases	P18031	+
<b>LEVEL 8</b>				
Dok2/p56dok2	8	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	O70469	-
JAK1	8	Tyrosine Kinases	P23458	+
MKK3b	8	MAP Kinase Pathway	P97293	-
PEX19	8	Mitochondria/Organelles	P40855	-
Rabaptin-5	8	GTPases & GTPase Regulators	Q15276	-
Stat3 (pS727), Phospho	8	Transcription FactorsStats	P40763	+
TAFII135	8	Transcription Factors	O00268	-
<b>LEVEL 7</b>				
Aralar	7	Membrane Research	O75746	-
Caspase-7/MCH-3	7	Apoptosis	P55210	+
CD54/ICAM-1	7	Cell Adhesion	P05362	+
LCB1	7	Membrane Research	O35704	+
p38 (pT180/pY182) Phospho	7	MAP Kinase Pathway	Q16539	+
TRADD	7	Apoptosis	Q15628	+

Supplementary data 3: Protein changes in CD40L treated DC relative to iDC.

Changes in CD40L relative to IDC				
Protein name	Level	Areas of Research	Swiss Prot ID	Sign of change
<b>LEVEL 6</b>				
PKCa	6	Protein Kinase C	P17252	-
PP2A Catalytic a	6	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P05323	-
<b>LEVEL 5</b>				
Hsp60	5	Mitochondria/Organelles	P10809	+
Stat5A	5	Transcription FactorsStats	P42229	+
<b>LEVEL 4</b>				
DBP2	4	Cell Cycle	O60231	-
DEK	4	Cancer Research	P35659	+
Dynamin II	4	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	Q9QXL9	+
hHR23B	4	Cancer Research	P54727	+
IkBα/MAD-3	4	Transcription Factors	P25963	-
NBS1	4	Nucleus & Nuclear Transport	O60934	-
Nurr	4	Transcription Factors	Q06219	-
PI3-Kinase	4	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P27986	+
TIP120	4	Transcription Factors	P97536	+
<b>LEVEL 3</b>				
LRP	3	Cancer Research	Q14764	+
MnSOD	3	Nitric Oxide	P09671	+
pan-JNK/SAPK1	3	MAP Kinase Pathway	P53779	+
PBK	3	MAP Kinase Pathway	Q9NPD9	+
PKR/p68 Kinase	3	Kinases	P19525	+
PTP1C/SHP1	3	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	P29350	-
<b>LEVEL 2a</b>				
Aven	2a	Apoptosis	Q9NQS1	-
Calreticulin	2a	Calcium signaling	P27797	-
CDC5L	2a	Nucleus & Nuclear Transport	Q99459	-
GGA2	2a	Golgi	Q99523	-
IκBε	2a	Transcription Factors	O00221	+
Ku80	2a	Nucleus & Nuclear Transport	P13010	+
Nek2	2a	Kinases	P51955	+
PTRF	2a	Transcription Factors	O54724	-
SII/TFIIS	2a	Transcription Factors	P23193	-

Supplementary data 3: Protein changes in CD40L treated DC relative to iDC.

Changes in CD40L relative to IDC				
Protein name	Level	Areas of Research	Swiss Prot ID	Sign of change
<b>LEVEL 2b</b>				
CD40	2b	Immunology	P25942	-
Dok2/p56dok2	2b	Adaptors & Tyrosine Kinase Substrates	O70469	-
ERK1	2b	MAP Kinase Pathway	Q63538	+
Ku80	2b	Transcription Factors	P13010	-
PKCi	2b	Protein Kinase C	P41743	+
<b>LEVEL 1a</b>				
b-Arrestin1	1a	Neuroscience	P29066	-
Ku70	1a	Nucleus & Nuclear Transport	P23475	-
<b>LEVEL 1b</b>				
CaM Kinase Kinase	1b	Calcium Signaling	Q64572	-
CDC42GAP	1b	GTPases & GTPase regulators	Q07960	+
DFF45	1b	Apoptosis	O00273	+
Nicastrin	1b	Neuroscience	Q92542	-
Nucleoporin p62	1b	Nucleus & Nuclear Transport	P37198	-
OPA1	1b	Mitochondria/Organelles	O60313	-
PEX19	1b	Mitochondria/Organelles	P40855	-
SLP-2	1b	Cytoskeleton	Q9UJZ1	+

Supplementary data 3: Protein changes in CD40L treated DC relative to iDC.

## **DISCUSSION**

Les DC sont des CPA très efficaces, mais leur rôle ne se limite pas à la présentation d'antigène et à la stimulation des lymphocytes. Elles sont aussi responsables du maintien de la tolérance et effectuent le lien entre le système immunitaire inné et adaptatif. De par tous ces rôles, les DC sont des cellules clé du système immunitaire (Banchereau, Briere et al. 2000).

L'apoptose dans le système immunitaire est un phénomène crucial pour l'homéostasie du système immunitaire. Il est responsable de l'élimination des cellules indésirables, du maintien de la tolérance et de la terminaison de la réponse immunitaire. De nombreuses études ont été effectuées sur l'apoptose des lymphocytes T (Krammer, Arnold et al. 2007); cependant un dérèglement de l'apoptose des lymphocytes T ne suffit pas à engendrer l'auto-immunité (Walsh, Wen et al. 1998), ce qui sous-entend l'implication d'autres cellules immunitaires.

Malgré les nombreuses études effectuées sur les DC, leur apoptose reste un sujet mal élucidé. Il a été observé que certains patients atteints du syndrome auto-immun lymphoprolifératif sévère et possédant une déficience au niveau de la voie apoptotique, démontrent une accumulation de DC dans les ganglions (Wang, Zheng et al. 1999). Ce phénomène est aussi observé chez les souris transgéniques dont le récepteur Fas est muté (souris *lpr*) (Rathmell and Thompson 2002). Il est donc possible qu'une défaillance au niveau de l'apoptose des DC conduise à une activation chronique des lymphocytes et un développement de l'auto-immunité (Chen, Wang et al. 2006).

Nous avons voulu savoir comment la maturation, phénomène clé pour la fonction des DC, intervenait sur l'apoptose des DC. Dans un premier temps, nous avons étudié le mécanisme de la voie Fas chez les DC, puis nous avons étendu notre étude aux changements de l'expression des gènes reliés à l'apoptose.

### **3. RÉSISTANCE DES DC A L'APOPTOSE**

Les DC ont une durée de vie déterminée. Mais pour effectuer leur travail, elles doivent perdurer un temps. Pour cela, elles possèdent divers moyens de se protéger face à l'apoptose qu'elle soit spontanée ou induite.

#### **3.1. Inhibition de la voie Fas**

En plus de son rôle dans l'élimination de cellules indésirables, la voie Fas est nécessaire au maintien de l'équilibre du système immunitaire. Le rôle critique de Fas dans le maintien de la tolérance au soi est clairement illustré par les maladies auto-immunes systémiques causées par la mutation du récepteur Fas ou de son ligand FasL tant chez l'homme que chez la souris (Wang, Zheng et al. 1999; Chen, Wang et al. 2006). Toutefois l'expression de molécules anti-apoptotiques par les lymphocytes T n'entraîne pas des symptômes d'auto-immunité (Walsh, Wen et al. 1998; Rathmell and Thompson 2002; Chen, Wang et al. 2006); de même la délétion spécifique de Fas chez les lymphocytes T et B n'engendre pas les mêmes manifestations d'auto-immunité que la délétion totale de Fas (Hao, Hampel et al. 2004). De telles études démontrent que d'autres cellules que les lymphocytes sont impliquées dans ces mécanismes d'auto-immunité.

Pour déterminer l'implication de la voie Fas dans l'apoptose des DC, nous avons combiné des études biochimiques qui nous ont conduit à la résolution des molécules impliquées dans cette voie avec une étude génique pour avoir une vision plus large des changements dus à la maturation des DC. Nous démontrons que les DC immatures et non les matures sont sensibles à l'apoptose via les TNFRs. La résistance des DC matures est corrélée à l'augmentation de molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1, FLIP ou cIAP-2. Comme une maturation de 24h avec des cytokines pro-inflammatoires conduit à la modulation de l'expression génique de molécules anti-apoptotiques, nous nous sommes intéressés à l'expression des autres molécules reliées à l'apoptose durant la maturation. Nous avons déterminé par des analyses de biopuce à ADN et par des analyses de protection à la RNase que la



maturation entraînait la modulation de l'expression de plusieurs molécules reliées à l'apoptose.

### 3.1.1. Inhibition proximale de la voie de signalisation : au niveau du DISC

Suite à l'engagement de Fas, le DISC est formé. Il constitue un ensemble de molécules de signalisation intracellulaire qui conditionne la cellule stimulée à entrer ou non en apoptose (Kischkel, Hellbardt et al. 1995). Il existe plusieurs moyens d'inhiber l'apoptose au niveau du DISC.

FLIP protège de l'apoptose induite via les TNFR, entre autres via Fas (Kataoka, Budd et al. 2000). Lors de l'engagement du récepteur par son ligand, le DISC se forme. Cela provoque le rapprochement des molécules de caspase-8 présentes dans le DISC et de fait leur activation par autocatalyse ainsi que leur relâchement dans le cytoplasme. FLIP est un homologue de caspase-8 localisé dans le DISC qui est aussi clivé par caspase-8 active. Toutefois il ne contient pas de deuxième site de clivage ce qui le retient attaché dans le DISC. Ainsi il bloque le recrutement de nouvelles molécules caspase-8 dans le DISC et par conséquent l'apoptose induite par FasL (Kataoka 2005).

Nous observons une augmentation de la protéine FLIP sous ces deux formes : FLIP<sub>L</sub> et FLIP<sub>S</sub> lors de la maturation. Nous démontrons également sa présence tant au niveau du DISC qu'au niveau du cytoplasme. De plus, nous avons aussi détecté la forme clivée de FLIP<sub>L</sub> non seulement dans le DISC mais aussi dans le cytoplasme.

La surexpression de FLIP lors de la maturation des DC a déjà été démontrée. Cette augmentation est corrélée avec la résistance des DC contre l'apoptose induite par Fas (Rescigno, Piguet et al. 2000; Willems, Amraoui et al. 2000). Il est possible de reconstituer l'effet apoptotique de Fas en utilisant un agent connu pour sensibiliser les cellules tumorales à l'apoptose via Fas, le bisindolylmaléimide (Willems, Amraoui et al. 2000). Il est aussi démontré que l'engagement de Fas sur les DC conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Rescigno, Piguet et al. 2000).

Ces études démontrent une résistance des DC immatures et matures à l'apoptose via Fas (Rescigno, Piguet et al. 2000; Willems, Amraoui et al. 2000). Néanmoins, cet effet stimulateur de Fas n'explique pas pourquoi l'expression de FLIP augmente lors de la maturation puisque les DC immatures seraient déjà résistantes à Fas. Cet effet stimulateur de Fas a aussi été décrit pour les monocytes (Daigle, Ruckert et al. 2000). La stimulation des monocytes via Fas conduit à la sécrétion de l'IL-10 alors qu'elle induit l'apoptose des DC (Daigle, Ruckert et al. 2000). Cependant, les auteurs n'ont pas vérifié l'expression de FLIP ni dans les monocytes ni dans les DC. La différence observée entre les études précédentes et la nôtre peut provenir du protocole. Il existe donc une controverse quant au rôle de Fas sur les DC et la maturation semble intervenir sur ce phénomène. Nous avons remarqué que la plupart des études où les DC immatures sont résistantes à Fas ont été cultivées dans des milieux contenant 10% de sérum (Ashany, Savir et al. 1999; Guo, Zhang et al. 2003; Kriehuber, Bauer et al. 2005), contrairement à celles, y compris la nôtre, où les DC immatures sont cultivées dans des milieux plus faibles en sérum et ne résistent pas à l'apoptose via Fas (Koppi, Tough-Bement et al. 1997; Leverkus, Walczak et al. 2000; Hoves, Krause et al. 2003). Il a déjà été observé que le sérum change l'expression de protéines anti-apoptotiques, entre autre FLIP et Bcl-xL (Lundqvist, Nagata et al. 2002). Une explication possible est que le sérum contient des facteurs qui provoqueraient des changements moléculaires des DC sans aboutir à un changement de phénotype de surface.

Le DISC se compose aussi des caspases initiateuses telles que caspase-8 et -10. La modulation de leur expression peut aussi modifier la décision de survie ou de mort de la cellule.

L'expression de caspase-8 semble moduler en fonction du temps. Effectivement, nous avons démontré une diminution de l'expression de l'ARN à 48h que nous avons confirmé au niveau protéique (résultats non montrés). Cependant bien que l'expression en ARN à 24h soit aussi diminuée, nous n'observons pas de diminution de l'expression protéique. De fait le ratio caspase-8/FLIP se trouve déséquilibrer en faveur de FLIP conduisant à la protection de l'apoptose. La quantité de FLIP<sub>L</sub> est

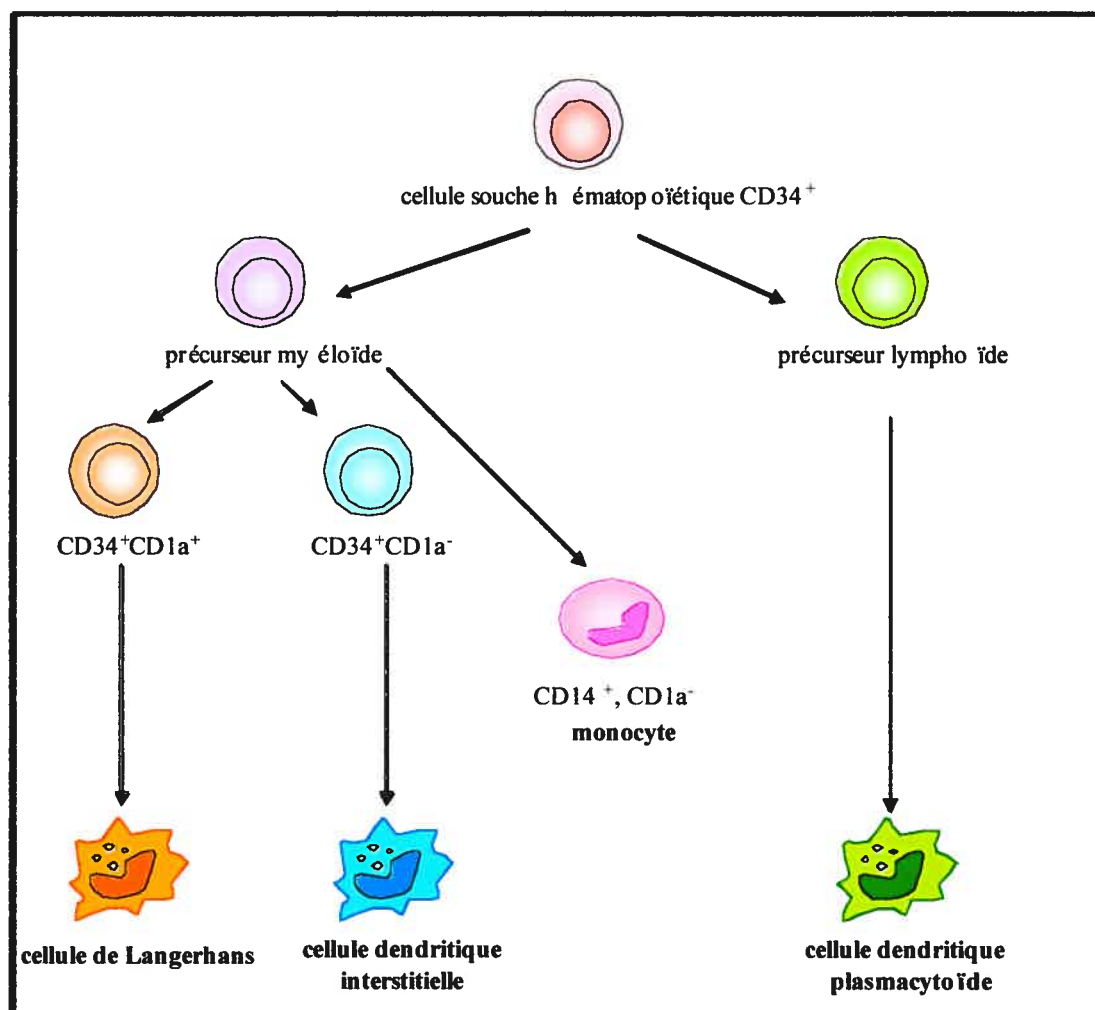


Figure 1. Origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes.

tellement élevée que celui-ci prend la place dans le DISC et inhibe l'apoptose au niveau de la première étape, celle de la formation du DISC. Il n'est pas rare que le devenir d'une cellule soit déterminé par le ratio entre une molécule pro-apoptotique et son inhibiteur. La survie des cellules a déjà été reliée au ratio Bcl-2/Bax (Oltvai, Milliman et al. 1993). Toutefois ces molécules interviennent au niveau de la mitochondrie, c'est-à-dire tardivement dans le processus d'apoptose induit par les TNFRs. De plus, la mitochondrie n'est pas toujours impliquée dans la voie d'apoptose des TNFRs. Les protéines caspase-8 et FLIP ont un rôle très précoce dans la voie de signalisation des TNFRs. Le ratio de ces protéines installe un point de contrôle précoce dans cette voie d'apoptose.

La caspase-10 est une caspase initiatrice qui s'active au niveau du DISC lors de l'engagement du TNFR par son ligand (Wang, Chun et al. 2001). Elle fonctionne de manière indépendante de caspase-8, bien qu'il soit prouvé que caspase-10 puisse quand même se substituer à caspase-8 dans le DISC. De plus les deux caspases ne clivent pas les mêmes substrats, laissant sous-entendre des fonctions physiologiques propres à chaque caspase (Wang, Chun et al. 2001). Nous avons pu constater que l'expression de caspase-10 est diminuée après 48h de maturation. Cette baisse d'expression peut expliquer la résistance des DC matures à l'apoptose via TRAIL que nous observons. De plus comme mentionné précédemment, caspase-10 peut prendre place dans le DISC formé suite à l'engagement de Fas (Wang, Chun et al. 2001). Sa diminution d'expression concorde aussi avec la résistance à l'apoptose via Fas que nous observons chez les DC matures.

Il a déjà été démontré qu'une déficience au niveau des caspases initiatrices provoquait des problèmes d'ordre immunologique (Puck and Zhu 2003). Une déficience de caspase 10 a été rapportée chez des patients atteints du syndrome lymphoprolifératif auto-immun de type IIa (Wang, Zheng et al. 1999). Ces patients possèdent des mutations dans le gène de caspase-10 qui entraînent une diminution de l'activité de caspase-10 et interfèrent avec l'apoptose induite via les TNFR, notamment Fas et TRAIL. Ces patients présentent divers désordres immunologiques dont une accumulation des DC CD83<sup>+</sup> dans la zone T des ganglions. Les auteurs

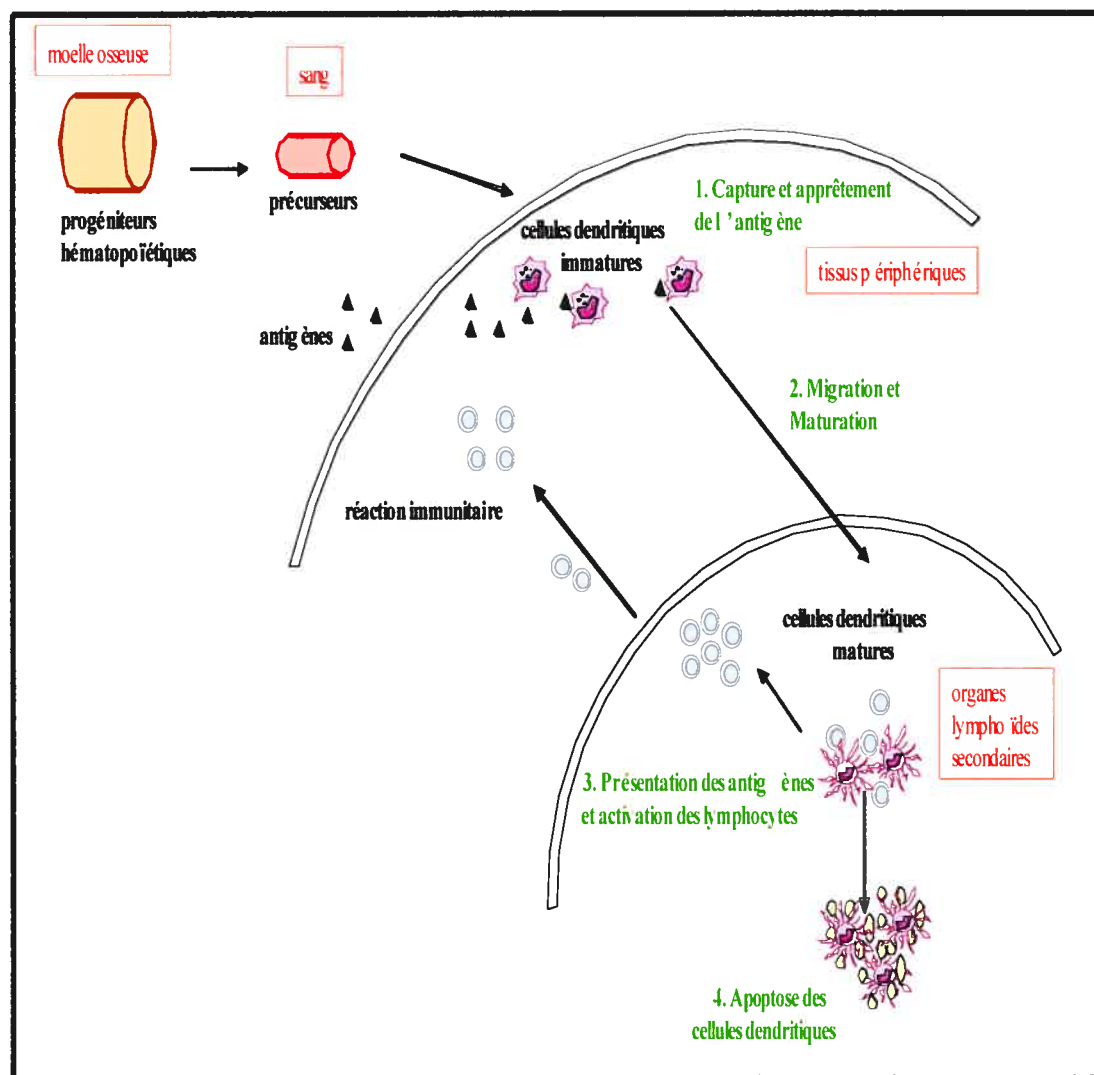


Figure 2. Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques.

démontrent que les DC extraites des patients sont moins sensibles à l'apoptose via TRAIL que les DC contrôles. De plus l'infection de DC issues de donneurs sains avec un rétrovirus contenant la protéine caspase-10 mutée protège les DC de l'apoptose via TRAIL (Wang, Zheng et al. 1999).

Nous avons donc démontré que la maturation conduit à une résistance à l'apoptose induite par les TNFRs en induisant une modification de la composition du DISC. Effectivement, le DISC des DC matures contient la molécule FLIP, qui sous-entend une résistance à l'apoptose via les TNFRs en se substituant aux caspases initiatrices. De plus, la maturation inhibe le DISC en provoquant la diminution de l'expression des caspases initiatrices, la caspase-8 et -10.

### 3.1.2. Inhibition distale de la voie de signalisation : au niveau de la mitochondrie

La mitochondrie participe à l'apoptose (Kroemer, Zamzami et al. 1997). Ce sont les protéines de la famille Bcl-2 qui régulent sa fonction apoptotique (Kuwana and Newmeyer 2003). Suite aux stimuli apoptotiques, des bris dans la membrane mitochondriale se forment. Ils sont le résultat de la formation de pores causés par la multidimérisation des protéines Bax et Bak. Ceci a pour conséquence la libération du cytochrome c dans le cytoplasme et la formation de l'apoptosome. En effet dans le cytoplasme le cytochrome c se lie à APAF-1 permettant le recrutement de la caspase-9. Cette association mène à l'activation de caspase-9 et par conséquent à l'apoptose (Li, Nijhawan et al. 1997). Les membres anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 régulent cette activité (Kuwana and Newmeyer 2003). L'apoptose induite par les TNFRs peut être amplifiée par l'intervention de la mitochondrie. Le lien entre les deux phénomènes est assuré par la molécule Bid (Scaffidi, Fulda et al. 1998).

Nous démontrons que la voie de la mitochondrie est activée lors de l'apoptose via Fas chez les DC immatures. Par conséquent, les DC immatures sont appelées des cellules de type II (Scaffidi, Fulda et al. 1998). La maturation bloque aussi cette voie

d'apoptose. Effectivement l'expression de molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est augmentée tant au niveau de l'ARN que de la protéine.

Bcl-2 et Bcl-xL sont des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ces deux protéines inhibent l'apoptose en se liant aux molécules Bax et Bak. Ces dimérisations empêchent Bak et Bax d'interagir et donc d'induire la dépoliarisation de la mitochondrie (Oltvai, Milliman et al. 1993). Bcl-2 et Bcl-xL inhibent l'apoptose induite par Fas chez les cellules de type II (Scaffidi, Fulda et al. 1998). Nous avons constaté que l'expression de la protéine Bcl-2 est augmentée avec la maturation, de même pour Bcl-xL. Il a déjà été démontré que la sur-expression de Bcl-2 prolonge la survie des DC. Les souris transgéniques qui sur-expriment Bcl-2 dans les DC démontrent que les DC matures persistent plus longtemps *in vivo* (Nopora and Brocker 2002). Cette persistance des DC a un impact positif direct sur le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ces résultats confirment ceux sur les patients atteints du syndrome lymphoprolifératif auto-immun de type II (Wang, Zheng et al. 1999). Une présence persistante de DC activées peut conduire à un état activé des lymphocytes. La nécessité de l'expression de Bcl-2 pour la survie des DC est très bien illustrée dans le cas du cancer du sein où les DC extraites du sang de patientes atteints du cancer de sein meurent plus vite par apoptose spontanée que les DC de donneurs sains. Un facteur contenu dans le lysat cellulaire tumoral est responsable de cette apoptose. Il est possible de protéger les DC par la maturation induite par CD40L et non par les cytokines pro inflammatoires ou le poly(I:C). La protection induite via CD40 est assurée par l'induction de l'expression de Bcl-2 dépendante de la sécrétion de l'IL-12 (Pinzon-Charry, Maxwell et al. 2005).

Bcl-xL inhibe l'apoptose de la même manière que Bcl-2, en empêchant la dimérisation de Bax/Bak (Kuwana and Newmeyer 2003). Il a déjà été démontré que la sur-expression de Bcl-xL protégeait les DC de l'apoptose induite via Fas. De plus, cette augmentation de l'expression est concordante avec la maturation et ne dépend pas du sérum, contrairement à celle de FLIP (Lundqvist, Nagata et al. 2002).

Bfl-1 est un autre membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Il est surexprimé dans plusieurs cancers (Choi, Park et al. 1995; Park, Lee et al. 1997). Il est démontré qu'il bloque l'apoptose induite par différents stimuli (Grumont, Rourke et al. 1999;

Lee, Park et al. 2002; Mandal, Borowski et al. 2005), notamment via Fas (Kim, Kim et al. 2005). Son mécanisme d'action n'est pas encore très bien élucidé, mais il semble qu'il séquestre tant la proforme de Bid que le tBid en interagissant via le domaine BH3 (Werner, de Vries et al. 2002). Cette association de Bfl-1 avec Bid empêche la translocation de Bid à la mitochondrie. Par là même, il inhibe l'oligomérisation de Bax et/ou de Bak empêchant la libération du cytochrome c dans le cytoplasme et par conséquent la formation de l'apoptosome (Zhang, Cowan-Jacob et al. 2000). Ainsi il inhibe l'apoptose via Fas chez les cellules de type II par un autre mécanisme que Bcl-2 et Bcl-xL. Il représente un autre moyen pour protéger les cellules de l'apoptose et bloquer ainsi toutes les voies apoptotiques possibles. De plus, Bfl-1 protège aussi de l'apoptose en dimérisant avec Bax inhibant ainsi directement l'oligomérisation de Bax (Zhang, Cowan-Jacob et al. 2000). Son expression est aussi accrue pendant la maturation. Nous avons pu observer cette augmentation par toutes les méthodes utilisées tant au niveau de l'ARN qu'au niveau de la protéine. L'augmentation de Bfl-1 durant la maturation a déjà été répertoriée. Son expression est induite par différents types de stimuli (Huang, Liu et al. 2001). Bfl-1 représente un nouveau candidat intéressant pour la résistance des DC à l'apoptose. Effectivement il est le seul gène totalement induit durant la maturation, les autres subissent une augmentation de l'expression. De plus son expression augmente de manière très précoce (dès 8 heures de maturation).

Mcl-1 appartient au sous-type anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Son mécanisme vient d'être très récemment élucidé. Mcl-1 inhibe l'apoptose par la même voie que Bfl-1 en séquestrant tBid bloquant ainsi sa translocation à la mitochondrie (Clohessy, Zhuang et al. 2005). Nous avons aussi constaté l'augmentation de l'expression de Mcl-1. Ce gène représente un autre candidat responsable de la résistance des DC matures face à l'apoptose.

La maturation bloque aussi la voie d'apoptose mitochondriale. La mitochondrie participe aussi à l'apoptose induite par les TNFR chez les cellules de type II (Scaffidi, Fulda et al. 1998). Ces cellules ont besoin de la mitochondrie pour amplifier le signal



d'apoptose ; le lien entre les deux voies de signalisation s'effectue grâce au clivage de la molécule Bid par la caspase 8 activée (Luo, Budihardjo et al. 1998). La maturation induit l'augmentation de l'expression de plusieurs molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1 et Mcl-1. Ces molécules sont reconnues pour inhiber l'apoptose des cellules de type II suite à l'engagement des TNFRs. Elles empêchent la dépolarisation de la membrane en interagissant avec les molécules Bax et Bak (Green and Reed 1998). De plus, elles sont responsables de la séquestration de Bid inhibant le lien entre les deux voies d'apoptose (Zhang, Cowan-Jacob et al. 2000; Clohessy, Zhuang et al. 2005).

### 3.2. Inhibition des caspases actives

FLIP n'est pas le seul moyen d'inhiber les caspases. Il existe une famille de molécules, les IAP qui inhibent les caspases effectrices. D'une manière générale, elles interagissent avec les caspases activées et bloquent ainsi le recrutement des substrats (Lee and Collins 2001). Nous démontrons par protection à la RNase et par biopuce que l'expression de cIAP-2 est accrue quelque soit le stimulus utilisé. Quant à XIAP, son expression augmente légèrement avec le LPS, mais chute en présence de MCM-mimic.

XIAP est le membre le mieux caractérisé de cette famille. Il a été démontré *in vitro* qu'il pouvait inhiber directement la caspase-3 et la caspase-7 (Deveraux, Takahashi et al. 1997) ainsi que le complexe caspase-9/APAF1 (Srinivasula, Hegde et al. 2001). De plus il a été démontré que son ubiquitination et sa dégradation sont des événements clé pour l'entrée en apoptose des cellules (Yang, Fang et al. 2000). Récemment il a été démontré que la délétion de XIAP dans des cellules n'interférait pas avec la prolifération mais augmentait la sensibilité à l'apoptose via TRAIL. Les cellules déficientes pour XIAP contiennent plus de caspase-3, -7 et -9 actives (Cummins, Kohli et al. 2004). L'augmentation de l'expression de XIAP lors de la maturation des DC dépend du stimulus utilisé. Effectivement, le LPS induit une sur-expression alors que le MCM-mimic entraîne une diminution de l'expression de XIAP. De manière intéressante, XIAP n'est pas le seul gène dont la modulation de

l'expression dépend du stimulus utilisé. L'expression des caspases est aussi dépendante du stimulus. Le LPS induit une augmentation d'expression de presque toutes les caspases alors que le MCM-mimic n'a pas d'effet ou diminue l'expression. Ce résultat concorde bien avec l'augmentation de l'expression de XIAP en présence du LPS. La maturation via le LPS induit l'augmentation de l'effecteur apoptotique ainsi que de son inhibiteur.

Il a aussi été démontré un rôle non apoptotique des caspases. Les caspases-3, 6 et 7 sont activées chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> stimulés. Cette activation semble nécessaire à la prolifération des lymphocytes stimulés. Pour les DC aussi, il semble que les caspases soient importantes lors de la maturation avec le LPS. Ce stimulus de maturation induit l'activation des caspases qui est nécessaire à la survie des DC. En effet le blocage de l'activation des caspases par un inhibiteur provoque une mort massive des DC. Nous avons observé que le LPS contrairement aux autres stimuli de maturation induisait une augmentation de l'expression de plusieurs caspases. Il est possible que le LPS provoque l'élévation de l'expression des caspases dans un autre but que l'apoptose.

En plus d'inhiber l'apoptose en interagissant avec les caspases, il a été démontré que cIAP-2 se lie à TRAF-2 entraînant ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B et l'induction de l'expression de gènes anti-apoptotiques (Wang, Mayo et al. 1998; Lee and Collins 2001). Cette voie d'activation est nécessaire pour les effets anti-apoptotiques du TNF $\alpha$  (Wang, Mayo et al. 1998). Le cocktail de maturation (MCM-mimic) contient du TNF $\alpha$ . Les DC ne sont pas sensibles à l'action pro-apoptotique du TNF $\alpha$ . Celui-ci induit plutôt la maturation des DC. Son effet s'explique par le fait que cIAP-2 est un gène sous la dépendance de NF- $\kappa$ B, lui-même induit par le TNF $\alpha$  (Chu, McKinsey et al. 1997).

La maturation protège les DC de l'apoptose via Fas, et ce, à tous les niveaux. Premièrement, la maturation induit l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes anti-apoptotiques. Ces gènes bloquent l'apoptose à différents niveaux. Tout d'abord FLIP bloque la fonction apoptotique du DISC. Puis les molécules de la famille Bcl-2

inhibent la voie mitochondriale. Si certaines caspases sont quand même activées, les molécules IAP sont présentes pour contrecarrer leur action. Par conséquent, suite à leur activation, les DC sont fortement protégées de l'apoptose extrinsèque mais aussi intrinsèque.

En plus d'induire l'expression de molécules anti-apoptotiques, la maturation entraîne l'inhibition de l'expression de certaines molécules pro-apoptotiques comme la caspase-8 et -10.

Sachant que les molécules anti-apoptotiques, Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1, FLIP et cIAP-2 sont augmentées lors de la maturation, il serait intéressant de dépléter les DC matures de ces protéines pour déterminer laquelle induit une résistance à l'apoptose via Fas. L'inhibition de leur expression pourrait être obtenue par l'utilisation de siRNA. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus semblent indiquer que Bcl-2 et Bfl-1 seraient les deux molécules partiellement responsables de cette résistance. Dans les conditions que nous avons utilisées, FLIP ne semble pas avoir d'effet. Toutefois, nous n'avons effectué qu'une expérience préliminaire qui demande à être amélioré. Effectivement, nous n'avons pas pu évaluer le taux de transfection obtenue. Pour cela, il faudrait co-transfecter un traceur tel que la GFP pour déterminer combien de cellules sont transfectées. De plus, il faudrait aussi tester Bcl-xL et cIAP-2. Effectivement, Bcl-xL bloque l'apoptose au même niveau que Bcl-2 et Bfl-1. La résistance observée est peut-être une synergie des trois molécules et non le résultat d'une seule. En outre, cIAP-2 est une molécule qui agit très tardivement dans la voie d'apoptose. Son augmentation d'expression est peut-être suffisante pour installer la résistance.

Nous n'avons testé que l'effet de stimuli simples. Nous pourrions étudier si la combinaison et l'ordre des stimuli de maturation ont un effet sur l'expression génique.

Cette insensibilité à l'apoptose induite via les TNFRs et via la mitochondrie peut permettre une résistance aux cellules cytotoxiques. Nous avons déjà mentionné précédemment que les DC matures sont protégées de la lyse induite par les CTL par la surexpression de la protéase PI9 (Medema, Schuurhuis et al. 2001). De plus, les

DC sont aussi protégées contre la lyse induite par des  $CD4^+$  (Ingulli, Mondino et al. 1997). Le blocage de la voie de Fas permet de compléter cette protection. Celle-ci donne le temps aux DC matures d'activer les lymphocytes. Il est décrit que les DC migrent en 24h jusqu'au ganglion, puis disparaissent après 48h. Toutefois, il est aussi décrit que la présence de l'antigène prolonge la survie des DC (Ingulli, Mondino et al. 1997). Puis, elles finissent par disparaître du ganglion après leur interaction avec les lymphocytes. Durant leur trajet et dans le ganglion, nous pouvons supposer que les DC matures sont protégées des cellules cytotoxiques. Cependant les DC immatures qui sont appelées sur le site d'inflammation où se retrouvent les cellules cytotoxiques activées, sont sensibles à la lyse. Ceci peut être un mécanisme pour terminer la réaction immunitaire. En éliminant les cellules qui vont continuer l'activation, le système élimine la source de stimulation (Ferlazzo, Tsang et al. 2002).

Toutefois, une fois le travail effectué les DC doivent disparaître. Les DC activées sont des cellules potentiellement dangereuses. Il est démontré que la persistance des DC est corrélée avec l'induction de l'auto-immunité. Chen M. *et al.* démontrent que la persistance de DC exprimant p35 (un inhibiteur des caspases) résulte en l'accumulation de ces cellules et par conséquent en l'activation chronique des lymphocytes et l'apparition de symptômes auto-immuns (Chen, Wang et al. 2006). Pour assurer un équilibre, il faut que les DC disparaissent. La maturation induit donc aussi l'expression de molécules pro-apoptotiques pour préparer la cellule à mourir si le besoin s'en ressent. Le phénomène d'élimination des DC par les cellules cytotoxiques vient d'être récemment proposé au niveau du ganglion inflammé. Effectivement, Sallusto et son équipe démontrent que les lymphocytes T  $CD8^+$  mémoires effecteurs et effecteurs sont recrutés dans le ganglion inflammé via CXCR3. Une fois dans le ganglion, ces cellules éliminent les DC activées spécifiques de l'antigène responsables de leur recrutement (Guarda, Hons et al. 2007). Ce phénomène permettrait ainsi la terminaison de la réponse immunitaire et expliquerait aussi pourquoi les patients atteints de ALPS de type II présentent des DC  $CD83^+$  en excès dans les ganglions (Wang, Zheng et al. 1999). Ainsi l'élimination des DC est un phénomène qui permet la terminaison de la réponse. Les cellules cytotoxiques participent à la terminaison de la réponse en éliminant la source de stimulation, les

DC immatures en périphérie et les DC matures dans les ganglions où a lieu la réaction immunitaire. Toutefois, avec nos résultats, nous démontrons que pendant un temps donné les DC matures sont résistantes à l'apoptose via les TNFRs.

#### **4. ÉLIMINATION DES DC**

Il a été démontré par Ingulli *et al.* que les DC disparaissent du ganglion après leur interaction avec les lymphocytes (Ingulli, Mondino *et al.* 1997). En outre De Smedt *et al.* prouvent que l'injection de LPS *in vivo* conduit à la délocalisation des DC dans la zone T de la rate. Cependant 48 heures après ce transfert les DC disparaissent de la zone T (De Smedt, Pajak *et al.* 1996). L'injection d'un antigène en même temps que le LPS retarde cette disparition. Ceci suppose que les lymphocytes T fournissent un signal conduisant à la survie des DC (De Smedt, Pajak *et al.* 1998).

Le LPS est donc un stimulus qui induit une perte des DC à moins qu'il ne soit co-administré avec un autre signal. Nous constatons l'augmentation de certains gènes pro-apoptotiques comme Bid, Bim, Bax et Bad, mais aussi de plusieurs caspases surtout après 48h de maturation avec le LPS. En outre, l'expression de certaines molécules anti-apoptotiques chute (PDCD2, PDCD6, TOSO et des serpinines).

Une augmentation de l'expression de Bax et de Bad est observée après 48h de maturation avec le LPS. La dimérisation de ces deux molécules est responsable de la formation de pores dans la membrane mitochondriale (Kuwana and Newmeyer 2003).

L'expression de Bid, un autre membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 est augmentée lors de la maturation. Cette protéine joue un rôle central dans l'activation de la voie mitochondriale lors de l'apoptose via Fas. Elle effectue le lien entre l'activation du récepteur et celle de la mitochondrie. Son activité est régulée par caspase-8 qui induit son activation par clivage. Ceci permet sa translocation à la mitochondrie et l'oligomérisation de Bak *et/ou* Bax (Wei, Zong *et al.* 2001). La légère augmentation observée au niveau de l'ARN par la biopuce à ADN est confirmée par la technique de protection à la RNase à 48h de maturation. Cela confirme que la cellule se prépare à entrer en apoptose. De plus, Bid joue aussi un rôle dans l'action de

granzyme B. Les cellules de souris déficiente pour Bid sont résistantes à l'apoptose via granzyme B (Waterhouse, Sedelies et al. 2005). L'augmentation de son expression prépare les DC à mourir par l'action des CTL, peut-être pour terminer la réponse immunitaire.

Nous observons par biopuce que l'expression de Bim augmente après 48h de stimulation avec le LPS. Cette molécule pro-apoptotique induit l'apoptose en séquestrant Bcl-2, Bcl-xL et Bclw (O'Connor, Strasser et al. 1998). Il a déjà été prouvé que le ratio Bim/Bcl-2 contrôlait la survie des DC. Lors d'une stimulation par LPS durant 4 jours, les auteurs observent une augmentation du ratio Bim/Bcl-2 corrélant avec une apoptose des DC (Hou and Van Parijs 2004). Son augmentation d'expression concorde avec celles de Bax et de Bak. Effectivement, Bim permet de séquestrer les inhibiteurs de Bax et de Bak.

Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les DC ont besoin de plusieurs signaux séquentiels pour rester en vie. D'un côté les signaux de maturation maintiennent le niveau d'expression des molécules anti-apoptotiques afin d'éviter le renversement du ratio pro-apoptotique/anti-apoptotique. Mais d'un autre côté certains stimuli et en particulier le LPS induisent une augmentation de l'expression des molécules pro-apoptotiques après un long temps d'incubation.

Nous avons démontré que la maturation protège les DC de l'apoptose, que celle-ci soit d'origine intrinsèque ou extrinsèque. Cependant il semble que cette protection ne soit que passagère comme le suggère les augmentations d'expression de certaines molécules pro-apoptotiques.

La maturation induit un vaste programme anti-apoptotique chez les DC. Cela permet aux DC de résister à l'apoptose via Fas, via les granzymes (Medema, Schuurhuis et al. 2001) et via les facteurs intrinsèques. Cette résistance a lieu au niveau des effecteurs mêmes de l'apoptose. Elle a pour effet de permettre l'initiation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les DC peuvent activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> tout en résistant aux attaques des CTL. La maturation conduit donc à la survie des DC par plusieurs mécanismes. L'activation des DC permet l'augmentation de l'expression de plusieurs molécules anti-apoptotiques et la diminution de l'expression de d'autres molécules pro-

apoptotiques. Ce changement d'expression induit un déséquilibre du ratio pro/anti-apoptotiques en faveur de la survie des DC. Plusieurs voies d'apoptose sont bloquées. La mort cellulaire induite par Fas est bloquée à deux endroits. La composition moléculaire du DISC diffère entre les DC immatures et matures. La maturation permet l'incorporation de FLIP dans le DISC et ainsi limite l'activation de caspase-8. Comme les DC immatures sont de type II, l'augmentation de l'expression de plusieurs membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 renforce la résistance des DC matures face à l'engagement de Fas. L'action de ces molécules anti-apoptotiques ne se limite pas à la voie Fas. L'apoptose induite par des facteurs intrinsèques est aussi inhibée. Effectivement, l'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ainsi que celle des membres de la famille IAP protège les DC. La plupart de ces molécules anti-apoptotiques sont sous la dépendance transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B (Wang, Mayo et al. 1998; Wang, Guttridge et al. 1999; Cheng, Lee et al. 2000). Lors de la maturation, la voie NF- $\kappa$ B est activée (Ardeshtna, Pizzey et al. 2000) et son activité est soutenue par l'augmentation de son expression et de celle de son activateur IKK (résultats non montrés). La présence de NF- $\kappa$ B permet l'expression de molécules anti-apoptotiques mais aussi de GADD45 (De Smaele, Zazzeroni et al. 2001). Celui-ci permet l'inhibition de JNK (Papa, Zazzeroni et al. 2004). La balance NF- $\kappa$ B/JNK détermine le devenir des DC (Kriehuber, Bauer et al. 2005). NF- $\kappa$ B est un inhibiteur de JNK dont l'activité induit l'apoptose (Papa, Zazzeroni et al. 2004). Tout est mis en œuvre lors de la maturation pour assurer la survie des DC. Ce sursis permet aux DC d'effectuer leur travail d'APC. Lors de l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, les DC sont en étroite communication avec ces cellules tueuses. Pour assurer une bonne activation, il faut que les DC puissent résister à la lyse induite par les CTL. Pour cela, les DC sont non seulement résistantes à la voie Fas mais aussi à l'action des granzymes par l'expression de PI9 (Medema, Schuurhuis et al. 2001).

Toutefois la persistance de cellules activées peut entraîner des problèmes d'activation chronique des lymphocytes d'où l'apparition de symptômes auto-immuns (Chen, Wang et al. 2006). Le système met en place donc des verrous pour éviter la génération de cellules dangereuses. En même temps que l'expression des molécules

anti-apoptotiques augmente, l'expression de certaines molécules pro-apoptotiques augmente aussi. Nous pouvons poser l'hypothèse que les DC survivent lorsqu'elles reçoivent les signaux adéquats comme lors de l'interaction avec les lymphocytes ou lors d'une situation de danger avec les cytokines. Comme nous l'avons cité les signaux de survie entraînent l'activation de NF- $\kappa$ B (Ardeshna, Pizzey et al. 2000) et donc l'induction de l'expression de molécules anti-apoptotiques (Wang, Mayo et al. 1998; Wang, Guttridge et al. 1999; Cheng, Lee et al. 2000). En revanche si ce signal n'est pas fourni, les DC sont prêtes à mourir. De Smedt *et al.* posent la même hypothèse (De Smedt, Pajak et al. 1998). Ils démontrent qu'*in vivo* les DC activées par du LPS meurent rapidement lorsqu'elles entrent dans la zone T. L'injection d'un antigène spécifique retarde cette mort. Ils concluent que les DC sont programmées à mourir à moins qu'elles ne reçoivent un autre signal (De Smedt, Pajak et al. 1998).

Il semble que la survie des DC soit continuellement remise en question. Il faut que la cellule reçoive un signal sous peine de mourir. L'entrée en apoptose dépend d'une balance entre les molécules anti- et pro-apoptotiques. Cependant si elle reçoit le signal adéquat, elle survit et effectue son travail. Ce moyen représente une sécurité pour éviter qu'une DC mal activée ne puisse continuer à survivre et par là même devenir dangereuse.

## **5. APPLICATIONS**

Les vaccins contre le cancer ont pour objectif l'induction de lymphocytes T effecteurs spécifiques de la tumeur capable de réduire la masse tumorale mais aussi de générer une mémoire anti-tumorale. Les DC sont connues comme étant des adjuvants naturels de la réponse immunitaire (Banchereau and Steinman 1998), d'où un intérêt croissant pour ces cellules dans l'immunothérapie anti-cancéreuse (Banchereau and Palucka 2005).

Les DC générées *ex-vivo* ont déjà prouvé leur efficacité pour leur utilisation en immunothérapie (Davis, Jefford et al. 2003). Toutefois mieux connaître les mécanismes qui régissent leur survie/apoptose permettrait sûrement d'améliorer ces



nouvelles thérapies. Effectivement il a été démontré que le prolongement de la vie des DC conduit à une réponse immunitaire plus soutenue. L'utilisation pour un vaccin à base de DC provenant de souris transgénique Bcl-2 induit une réponse CTL 2 à 3 fois plus grande que des DC non transgéniques (Nopora and Brocker 2002). En partant de la même hypothèse, Chattergoon et al. ont amélioré la présentation d'antigène en ciblant l'antigène directement dans les DC *in vivo*. Ils induisent l'apoptose via Fas de CPA présentant l'antigène *in vivo* en co-exprimant l'antigène et Fas dans la même cellule. Ils ont observé que cette apoptose résultée en la capture de l'antigène par d'autres CPA, y compris les DC. Cette stratégie *in vivo* a permis d'augmenter la réponse CTL spécifique de l'antigène mais aussi de générer une réponse de type Th1 (Chattergoon, Kim et al. 2000).

Plusieurs groupes se sont penchés sur l'utilisation de DC tueuses pour le traitement de l'auto-immunité ou du rejet de greffe (Buonocore, Paulart et al. 2003; Hoves, Krause et al. 2003). Pour cela, des DC sur-exprimant FasL ont été générées. De manière surprenante, l'utilisation de DC sur-exprimant FasL *in vivo* induit une réponse CTL et Th1 plus forte que l'utilisation des DC contrôles (Buonocore, Paulart et al. 2003). Cette étude a été conduite avec des souris déficientes pour Fas car les DC de souris normales entrent en apoptose rapidement après la sur-expression de FasL. Cet effet a aussi été constaté chez l'humain par Hoves et al (Buonocore, Paulart et al. 2003). Ce groupe démontre que l'infection de DC immature par un adénovirus exprimant FasL induit une apoptose rapide de ces cellules alors que l'utilisation de DC matures évite ce problème.

L'importance de Fas lors de la génération de la réponse immunitaire est aussi illustrée par une étude de vaccinations multiples chez la souris (Ribas, Butterfield et al. 2000). Des souris recevant de multiples vaccinations génèrent une réponse plus faible que celles ayant reçues une seule injection (Ribas, Butterfield et al. 1999). Des observations préliminaires ont permis d'établir le même phénomène chez l'humain (Ribas, Butterfield et al. 2000). Les auteurs ont démontré que la diminution de la protection était liée à une déviation de la réponse Th1 vers Th2 attribuable à l'élimination des cellules productrices d'IFN via Fas (Ribas, Butterfield et al. 2000).

Toutefois il devient important de mieux connaître les mécanismes de survie des DC, puisqu'il est connu que certains cancers induisent l'apoptose des DC permettant ainsi une éviction immunitaire de la tumeur (Pinzon-Charry, Maxwell et al. 2005). Il est connu qu'il est possible de contrecarrer cet effet en induisant la maturation des DC (Pinzon-Charry, Maxwell et al. 2005). Cependant tous les types de maturation ne sont pas équivalents. En effet, la maturation induite par les cytokines pro-inflammatoires ou le polyI :C ne protège pas les cellules malgré l'induction d'une forte maturation, alors que l'utilisation de CD40L induit cette protection (Pinzon-Charry, Maxwell et al. 2005). En fait le facteur responsable de cette résistance est IL-12 qui permet la sur-expression de Bcl-2 dans ce cas-ci (Pinzon-Charry, Maxwell et al. 2005).

## **CONTRIBUTIONS**

J'ai écrit la partie sur la biologie générale des cellules dendritiques et dessiné les illustrations. Karine Maisnier-Patin a dirigé et compilée le manuscrit ainsi qu'écrit une partie du papier. Gaëlle Breton a aussi participé à l'écriture ainsi que Bader Yassine-Diab.

## **CONCLUSION**

Les DC sont des CPA professionnelles. Deux stades de différenciation sont décrits : les iDC et les mDC. Ces deux états sont séparés temporellement et localement. Les iDC sont responsables de la surveillance périphérique. Pour cela, elles sont spécialisées dans la capture de l'antigène et se situent au niveau de la périphérie. La capture de l'antigène conduit à leur activation. La maturation débute lors de la migration des DC vers les ganglions périphériques et se termine lors de l'interaction avec les lymphocytes spécifiques de l'antigène dans le ganglion. Ce phénomène permet aux DC de se spécialiser dans la présentation de l'antigène et la stimulation des lymphocytes. D'un autre côté, les DC participent aussi au maintien de la tolérance. Elles se situent également à l'interface du système immunitaire inné et acquis en interagissant avec les cellules NK. De par toutes ces fonctions, les DC se situent au centre de la réponse immunitaire. Toutefois, leur élimination reste un sujet obscur.

Dans la première partie de cette thèse, nous nous sommes penchés sur l'effet de l'engagement de Fas sur les iDC et les mDC. Nous avons démontré que seules les iDC sont sensibles à l'apoptose induites via Fas. La résistance des mDC peut être corrélée à l'augmentation de l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1, FLIP et c-IAP-2. Par ailleurs, nous démontrons également que la maturation conduit à une constitution différente du DISC puisque celui-ci contient la molécule FLIP, connue pour inhiber la voie de Fas.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à un effet protecteur plus général de la maturation. Nous démontrons que la maturation qu'elle soit induite par des cytokines pro-inflammatoires, du LPS ou du CD40L conduisait à une résistance de l'apoptose via Fas. De plus, nous suggérons que cette résistance soit liée à l'augmentation de l'expression de Bcl-2 et de Bfl-1. FLIP ne semble pas avoir d'effet marqué seul. Par ailleurs l'étude de microarray et de RPA nous sous-entend que la maturation stimule un programme génétique anti-apoptotique. Nous pensons que celui-ci permettrait la mise en place de la réponse immunitaire. Toutefois, il est démontré que les DC peuvent être potentiellement dangereuses lorsque leur survie est trop prolongée. Nous observons aussi l'augmentation de l'expression de certaines

molécules pro-apoptotiques. Peut-être que ceci prépare les DC à mourir pour la fin de la réponse ou pour parer à une éventuelle situation dangeureuse.

## **ANNEXES**

**Les cellules dendritiques transfectées avec de l'ARN messager :  
une approche prometteuse en immunothérapie**

**Karine Maisnier-Patin<sup>1,2,3</sup>, Sandrine Crabé<sup>1,2,3</sup>, Gaëlle Breton<sup>1,2,3</sup>, Franck P. Dupuy<sup>1,2,3</sup>,  
Bader Yassine-Diab<sup>1,2</sup>, Rafick-Pierre Sékaly<sup>1, 2, 3, 4</sup>.**

<sup>1</sup> Laboratoire d'immunologie, Centre de recherche du CHUM Saint-Luc,  
264, boul. René-Lévesque Est, Pavillon Édouard Asselin, Montréal, Québec H2X  
1P1 Canada.

<sup>2</sup> Laboratoire d'Immunologie, Département de microbiologie et d'immunologie,  
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>3</sup> INSERM U743 en immunologie humaine, CR-CHUM, Université de Montréal,  
Montréal, Québec, Canada.

<sup>4</sup> Département de microbiologie et d'immunologie, McGill University, Montréal,  
Québec, Canada.

Correspondance :rafick-pierre.sekaly@umontreal.ca



Les cellules dendritiques, sentinelles du système immunitaire, sont des cellules spécialisées dans la capture, l'apprêtement et la présentation d'antigènes. Ces cellules ont un rôle central dans la réponse immunitaire car ce sont les seules capables d'activer les lymphocytes T naïfs et d'initier une réponse immune primaire. La possibilité de les différencier et de les manipuler génétiquement *ex-vivo* en fait un outil de choix pour stimuler des réponses immunitaires contre des antigènes d'intérêt. C'est pourquoi, les cellules dendritiques sont largement utilisées en immunothérapie anti-tumorale et anti-infectieuse. Récemment, plusieurs études ont montré que des cellules dendritiques transfectées avec des ARNm autologues tumoraux ou viraux sont capables d'induire une réponse immunitaire spécifique et efficace associée à une réponse clinique bénéfique. Cette stratégie de vaccination très prometteuse offre une approche thérapeutique applicable à de nombreuses pathologies et, de plus, adaptée à chaque patient. Cet article fait le point sur les progrès actuels réalisés en immunothérapie anti-tumorale et anti-VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine).

### **Les cellules dendritiques et leurs fonctions**

Il existe deux types de cellules dendritiques issues de précurseurs différents : les cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, d'origine lymphoïde, se trouvent dans les zones T des organes lymphoïdes, dans le thymus et dans le sang ; les cellules dendritiques interstitielles et les cellules de Langerhans, d'origine myéloïde, se trouvent dans des sites en contact avec l'environnement extérieur (muqueuses et peau) (*Figure 1*).

En périphérie, les cellules dendritiques, à l'état immature, sondent continuellement leur environnement à la recherche d'antigène (Ag), qu'elles capturent par phagocytose ou endocytose.

En présence de molécules issues de pathogènes comme les PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*, reconnus par les TLR, *toll-like receptors*), de molécules associées à l'inflammation, comme les cytokines pro-inflammatoires interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), les cellules dendritiques entrent alors dans un processus de maturation. Celui-ci induit une série de modifications morphologiques (apparition de dendrites), immunophénotypiques et fonctionnelles qui vont transformer ces cellules spécialisées dans la capture d'Ag (immatures) en cellules spécialisées dans la présentation d'Ag (matures). Elles vont migrer des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires afin de stimuler les lymphocytes T CD4 et/ou CD8 (naïfs ou mémoires) spécifiques de l'Ag et déclencher leur différenciation en cellules effectrices [1-3] (*Figure 2*). Les cellules dendritiques matures expriment alors le marqueur de maturation CD83 et surexpriment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les molécules d'adhésion (comme CD50, CD54 et CD58) et de co-stimulation (comme CD40, CD80 et CD86), ainsi que le récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21: CCR7 qui contrôle la migration vers les zones T ganglionnaires [4-6]. Enfin, elles produisent de nombreuses cytokines comme l'IL-6, l'IL-8, le TNF $\alpha$  et l'IL-12 qui vont stimuler la réponse immunitaire [7] (*Tableau 1*).

### **L'immunothérapie basée sur l'utilisation de cellules dendritiques transfectées avec de l'ARN messager**

Différentes stratégies sont employées pour délivrer les Ag d'intérêt aux cellules dendritiques [8, 9]. Les cellules dendritiques peuvent être chargées avec des peptides synthétiques [10]. Cette méthode requiert la détermination préalable d'épitopes immunogènes et demeure limitée aux patients exprimant un certain haplotype du CMH. De plus, la présentation antigénique reste transitoire car le peptide est rapidement dégradé ou possède une affinité vis-à-vis des molécules du CMH qui ne suffit généralement pas pour activer de façon optimale les cellules T CD4 et CD8 spécifiques. Afin d'élargir la réponse à d'autres épitopes non identifiés sans contrainte liée à la restriction au CMH, il est possible de charger les cellules dendritiques avec des protéines tumorales ou virales, des extraits de cellules tumorales ou bien encore des corps apoptotiques [11]. Cette dernière approche n'est cependant pas appropriée dans le cas de certaines pathologies qui présentent un défaut dans l'apprêtement de l'Ag. D'autres essais ont tenté de délivrer directement les Ag dans les cellules dendritiques en les transfectant avec de l'ADN ou en les infectant avec des virus recombinants de type rétroviral ou adénoviral codant pour les Ag étudiés. L'utilisation des virus recombinants pose néanmoins le problème de la réaction immunitaire dirigée en grande partie contre le vecteur viral lui-même.

Une autre approche vaccinale consiste à utiliser des cellules dendritiques transfectées avec des ARN messagers (ARNm) codant pour des Ag connus ou avec l'ensemble des ARNm isolés directement à partir de tumeur afin d'induire une réponse immunitaire spécifique. Une étude, menée par D. Boczkowski et ses collaborateurs, a

montré que des cellules dendritiques transfectées avec les ARNm issus d'une tumeur sont capables 1) de générer des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques (Cytotoxic T Lymphocyte, CTL) *in vitro* et 2) de protéger des souris contre une injection létale de cellules tumorales d'où sont issus les ARNm [12]. En outre, le développement des techniques de biologie moléculaire a permis l'amplification d'ARNm rares ou encore non identifiés à partir de faibles quantités de tissus tumoraux. Trois techniques pour transfecter l'ARNm sont utilisées : la transfection passive, l'électroporation et l'utilisation des liposomes. La transfection passive consiste à incuber l'ARNm avec les cellules dendritiques qui l'internalisent par macropinocytose. L'ARNm contenu dans les vésicules intracellulaires ainsi formées, les macropinosomes, va en partie être libéré dans le cytoplasme. Cependant, le transfert d'ARNm par cette méthode a une efficacité trop faible pour induire une réponse immune satisfaisante. En revanche, l'électroporation, qui consiste à envoyer une décharge électrique aux cellules pour forcer l'ouverture des pores membranaires, permet l'entrée de l'ARNm de façon plus efficace dans le cytoplasme. Enfin, les liposomes sont de petites sphères phospholipidiques artificielles contenant l'ARNm qui ont la capacité de fusionner avec la membrane plasmique pour introduire l'ARNm dans la cellule. Une fois dans le cytoplasme, l'ARNm transfecté est traduit en protéines qui vont être dégradées en peptides par le protéasome. Ces peptides sont transportés dans le réticulum endoplasmique, associés au CMH-I et présentés aux cellules T CD8.

***Des essais cliniques prometteurs en immunothérapie anti-tumorale***

Dans un premier essai de vaccination chez l'homme, publié par le groupe d'A. Heiser, des cellules dendritiques transfectées avec l'ARNm codant pour l'Ag PSA (*Prostate Specific Antigen*) ont été injectées à des patients atteints d'un cancer de la prostate. Les résultats montrent que la vaccination induit une augmentation des lymphocytes T CD8 activés, sécréteurs d'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), spécifiques de l'Ag PSA chez neuf des treize patients associée à une diminution du marqueur sanguin PSA chez six patients sur sept évalués [13].

Dans un autre essai de phase I mené par Z. Su, dix patients atteints d'un cancer rénal métastatique ont été vaccinés avec des cellules dendritiques transfectées avec les ARNm tumoraux totaux. Sept des dix patients ont eu une stabilisation de la maladie ou une atténuation de la croissance tumorale. Chez cinq des six patients analysés, une réponse T CD8 polyclonale spécifique de la tumeur a été observée. De plus, ces CTL spécifiques de la tumeur présentent une activité cytotoxique dans des tests *ex-vivo* [14]. Ces études montrent aussi que ce type de vaccination est bien toléré chez les patients et aucune toxicité n'a été observée.

Les cellules T CD4 ont un rôle important dans le déclenchement, la maintenance et la potentialisation d'une réponse T CD8 anti-tumorale efficace [15]. Une réponse T CD4 requiert la présentation des peptides antigéniques par les molécules de CMH-II. S.K. Nair et son groupe ont ainsi utilisé des ARNm codant pour l'Ag CEA (*CarcinoEmbryonic Antigen*) associé à la séquence LAMP-1 (*Lysosome-Associated Membrane Protein-1*) afin de cibler l'Ag vers les compartiments lysosomaux. Cette stratégie permet d'induire *in vitro* une réponse T à la fois cytotoxique et auxiliaire spécifique de CEA [16]. Suite à ces résultats, Z. Su et ses collaborateurs ont démontré

dans un essai clinique récent que des cellules dendritiques transfectées avec l'ARNm codant pour la protéine chimérique LAMP/TERT (*telomerase reverse transcriptase*) s'avère une stratégie prometteuse capable de générer des réponses T CD4 prolifératives et des CTL spécifiques de l'Ag tumoral chez des patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique [17] (*Tableau 2*). Cependant l'utilisation de ces séquences d'adressage au lysosome s'applique uniquement aux ARNm tumoraux déjà identifiés. Afin d'augmenter la présentation d'Ag issus d'ARNm tumoraux totaux dans la voie de présentation restreinte au CMH-II, Y. Zhao et ses collaborateurs ont montré—que l'inhibition de l'expression de la chaîne invariante (molécule qui s'échange contre un peptide exogène pour la liaison au CMH-II) avec des oligonucléotides antisens conduit à une meilleure présentation des peptides générés en association avec le CMH-II. Les expériences *in vivo* mettent en évidence un effet anti-tumoral corrélé à des réponses CTL et CD4 prolifératives spécifiques de l'Ag [18].

### ***Un espoir dans le contexte de l'immunothérapie anti-VIH***

Chez l'homme, diverses stratégies de vaccination thérapeutique contre le VIH ont été développées. Mais l'efficacité des vaccins s'avère limitée car le virus a une forte capacité à générer des variants qui diffèrent non seulement d'un individu à l'autre mais encore au sein d'un même patient. Une manière de contourner ce problème consiste à élaborer un vaccin individuel ciblant spécifiquement l'ensemble des variants présents chez chacun des patients. En réactivant la réponse immunitaire contre ces variants individuels, un vaccin dit « autologue », plus efficace car plus

spécifique, pourrait alors être en mesure de générer une immunité protectrice à long terme.

Notre groupe a ainsi évalué la capacité de cellules dendritiques électroporées avec des ARNm viraux issus du même patient (autologues), amplifiés à partir d'échantillons de sang, à induire une réponse immune spécifique. Sur les dix patients étudiés, neuf ont montré des réponses T CD8 prolifératives spécifiques du VIH *in vitro*. Comparativement, les cellules dendritiques électroporées avec de l'ARNm consensus n'ont induit qu'une réponse anti-virale très faible, ce qui confirme bien l'importance de travailler avec des ARNm viraux autologues. Récemment, D.G. Kavanagh et ses collaborateurs ont transfecté des cellules dendritiques avec des ARNm codant pour la protéine Nef du VIH fusionnée à des signaux permettant le transport de cette protéine vers les compartiments lysosomaux. Bien que la réponse immunitaire décrite dans cette étude ne soit pas dirigée contre tous les variants du virus présents chez le patient, cette approche présente l'avantage d'induire des réponses T à la fois CD8 et CD4 [19]. Enfin, dans une autre étude, E.R. Van Gulck et ses collaborateurs ont électroporé des cellules dendritiques avec les ARNm codant pour les protéines Gag et Env du VIH amplifiés à partir des formes provirales et plasmatiques du virus [20]. Cette approche a permis d'induire des réponses T CD4 et CD8 dirigées contre les différents variants individuels du virus qui se répliquent mais également contre les formes latentes qui constituent les réservoirs du virus. La combinaison de ces différentes stratégies (ciblage de tous les épitopes autologues, induction d'une réponse à la fois CD4 et CD8 contre les formes latentes et répliquatives du virus)

semble donc être l'approche vaccinale la plus pertinente pour générer des réponses mémoires protectrices à long terme chez les patients infectés [21].

### **Manipuler les cellules dendritiques pour améliorer la réponse immunitaire**

Les résultats obtenus en utilisant les cellules dendritiques transfectées avec de l'ARNm autologue sont très encourageants. Toutefois, de nombreuses équipes tentent actuellement d'explorer les propriétés intrinsèques de ces cellules, à l'aide d'immuno-modulateurs ou par modification génétique, afin d'augmenter leur pouvoir immunostimulateur et d'amplifier consécutivement l'efficacité et la persistance de la réponse immunitaire générée.

Pour obtenir une réponse T spécifique optimale, il semble intéressant, par exemple, d'augmenter la durée de vie des cellules dendritiques après leur injection dans l'organisme en sur-exprimant des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 [22] ou en diminuant l'expression de protéines pro-apoptotiques comme BAK et BAX [23]. L'inefficacité de certaines cellules dendritiques à stimuler des lymphocytes T spécifiques peut également être à l'origine d'une faible réponse immunitaire. Ce défaut d'activation peut être dû à l'absence de signaux de co-stimulation ou de production de cytokines immunostimulatrices comme l'IL-12. Il est notamment connu que la voie CD40/CD40L est essentielle à l'obtention d'une réponse immunitaire efficace et durable. Les cellules dendritiques qui expriment fortement la molécule CD40 sont activées par le CD40L exprimé à la surface des lymphocytes T activés. Cette interaction induit la maturation des cellules dendritiques ainsi que la production de cytokines par ces cellules (en particulier l'IL-12) leur conférant ainsi



un pouvoir immunostimulateur plus élevé [24]. Cette même interaction est cruciale aux cellules T pour permettre leur différenciation de cellules naïves ou mémoires en cellules effectrices productrices de cytokines, comme l'a récemment montré M. Macleod et ses collaborateurs [25]. La molécule CD40 apparaît donc comme une cible potentielle importante en immunothérapie. Enfin, il a été montré que seule une minorité des cellules dendritiques injectées chez les patients, moins de 1%, étaient capables de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires [26]. N. Okada et ses collaborateurs ont montré que les cellules dendritiques qui expriment fortement le CCR7 s'accumulent 5 fois plus dans les ganglions lymphatiques drainant le site d'injection [27]. Ces observations sont essentielles dans la mesure où seules les cellules dendritiques qui auront migré dans les ganglions lymphatiques, zone principale d'interaction avec les lymphocytes T, seront susceptibles de déclencher des réponses immunes efficaces.

### **Conclusion**

Différents essais cliniques ont désormais apporté la preuve de l'efficacité des cellules dendritiques transfectées avec de l'ARNm à présenter des Ag (tumoraux/viraux) et à induire des réponses cytotoxiques et auxiliaires spécifiques associées dans certains essais à un réel bénéfice clinique. De plus, cette approche vaccinale s'avère une méthode simple, facilement utilisable en clinique : elle permet de stimuler des réponses immunes contre des Ag identifiés et non identifiés, sans restriction au CMH. La possibilité d'administrer à plusieurs reprises ce vaccin chez les patients sans être

limité par l'immunité pré-existante observée avec les vecteurs viraux recombinants, représente un avantage supplémentaire de cette approche. Enfin, il est envisageable de renforcer l'efficacité de ce type de vaccin en améliorant la génération d'épitopes immunogènes par des stratégies visant à cibler les Ag vers les compartiments lysosomaux ou vers le protéasome (pour une meilleure présentation CMH-II et I respectivement), ou en utilisant des immuno-modulateurs tels que des antagonistes de PD-1 et CTLA-4 ou encore des agonistes de CD40.

**REFERENCES**

1. Banchereau J, Briere F, Caux C, *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
2. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106: 255-8.
3. Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 2004; 427: 154-9.
4. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, *et al.* B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 1994; 180: 1841-47.
5. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52
6. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, *et al.* Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2760-9
7. Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001; 106: 263-6
8. Gilboa E, Nair SK, Lyerly HK. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 46: 82-7.
9. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* 2004; 10: 1359-65.
10. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, *et al.* Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001; 61:6451-58.
11. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, *et al.* Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-32.
12. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 1996; 184: 465-72.
13. Heiser A, Coleman D, Dannull J, *et al.* Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 2002; 109: 409-17.
14. Su Z, Dannull J, Heiser A, *et al.* Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 2003; 63: 2127-33

15. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 5: 588-94
16. Nair SK, Boczkowski D, *et al*, Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes *in vitro* using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 364-9.
17. Su Z, Dannull J, Yang BK, *et al*. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol* 2005; 174: 3798-807.
18. Zhao Y, Boczkowski D, Nair SK, Gilboa E. Inhibition of invariant chain expression in dendritic cells presenting endogenous antigens stimulates CD4+ T-cell responses and tumor immunity. *Blood*. 2003; 102 : 4137-42.
19. Kavanagh DG, Kaufmann DE, Sunderji S, *et al*. Expansion of HIV-specific CD4+ and CD8+ T cells by dendritic cells transfected with mRNA encoding cytoplasm- or lysosome-targeted Nef. *Blood* 2006; 107: 1963-9.
20. Van Gulck ER, Ponsaerts P, Heyndrickx L, *et al*. Efficient stimulation of HIV-1-specific T cells using dendritic cells electroporated with mRNA encoding autologous HIV-1 Gag and Env proteins. *Blood*. 2006; 107 :1818-27.
21. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, *et al*. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 2003; 421: 852-6.
22. Nopora A, Brocker T. Bcl-2 controls dendritic cell longevity *in vivo*. *J Immunol* 2002; 169: 3006-3014.
23. Peng S, Kim TW, Lee JH, *et al*. Vaccination with dendritic cells transfected with BAK and BAX siRNA enhances antigen-specific immune responses by prolonging dendritic cell life. *Hum Gen Ther* 2005; 16:584-593.
24. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, *et al*. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-52
25. Macleod M, Kwakkenbos MJ, Crawford A, *et al*. CD4 memory T cells survive and proliferate but fail to differentiate in the absence of CD40. *J Exp Med* 2006; 203: 897-906
26. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, *et al*. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 56-8.
27. Okada N, Mori N, Koretomo R, *et al*. Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gen Ther* 2005; 12: 129-39.

28. Caruso DA, Orme LM, Neale AM, *et al.* Results of a Phase 1 study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer. *Neuro Oncol* 2004; 6: 236-46.
29. Caruso DA, Orme LM, Amor GM, *et al.* Results of a Phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children with Stage 4 neuroblastoma. *Cancer* 2005; 103: 1280-91.
30. Morse MA, Nair SK, Mosca PJ, *et al.* Immunotherapy with autologous human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest* 2003; 21: 341-9.

**SUMMARY****mRNA-transfected dendritic cells-based vaccine: a promising strategy in immunotherapy**

Dendritic cells play a central role in the initiation of immune response as they are the only antigen presenting cells able to prime naive T-cells. This makes the dendritic cells the vector of choice to use as a cell-based vaccine in immunotherapy. Although there are several strategies to deliver antigen to dendritic cells, the ones transfected with mRNA coding for tumor or viral antigens are able to induce potent antigen specific T-cell responses directed against multiple epitopes. In this review, we report several advances made in the field of anti-tumoral and anti-HIV immunotherapy using mRNA-transfected dendritic cells-based approaches.

## LEGENDES

**Figure 1. Origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes.** Les cellules dendritiques sont issues des cellules progénitrices CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse qui se différencient en cellules précurseurs lymphoïdes et myéloïdes. Les précurseurs lymphoïdes se différencient en cellules dendritiques plasmacytoïdes CD11c<sup>-</sup>. Ces dernières se trouvent dans le thymus, les zones T des organes lymphoïdes et le sang. Les précurseurs myéloïdes se différencient en cellules CD34<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> qui se retrouvent dans l'épiderme pour devenir les cellules de Langerhans et en cellules CD34<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> qui migrent ensuite dans le derme et dans d'autres tissus pour devenir les cellules dendritiques interstitielles. Ces cellules dendritiques myéloïdes expriment le marqueur CD11c<sup>+</sup>. Les précurseurs myéloïdes sont aussi à l'origine des monocytes CD14<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup>. Dans les essais cliniques, les cellules dendritiques myéloïdes obtenues à partir des monocytes (en présence d'IL-4 et de *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* ; GM-CSF) sont majoritairement utilisées.

**Figure 2. Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques.** Les cellules dendritiques dérivent de précurseurs circulants. Ces précurseurs dérivent de progéniteurs hématopoïétiques qui prolifèrent dans la moelle osseuse. Situées dans les tissus périphériques, les cellules dendritiques à l'état immature capturent les antigènes issus de différents pathogènes (1). En présence de molécules issues de pathogènes comme les PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*, reconnus par les TLR, *toll-like receptors*), de molécules associées à l'inflammation, comme les cytokines pro-inflammatoires interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), ces cellules dendritiques entrent ensuite dans un processus de maturation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (2). Dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules dendritiques matures présentent aux lymphocytes T CD4 et/ou CD8 les peptides issus des antigènes en association avec les molécules du CMH, ce qui déclenche la différenciation des lymphocytes spécifiques de l'antigène en cellules effectrices. Ces lymphocytes T activés quittent les organes lymphoïdes secondaires

pour rejoindre le site original de l'infection (présence de l'antigène) (3). Les cellules dendritiques meurent par apoptose (4).



Tableau 1. Principales molécules associées à la maturation des cellules dendritiques.  
 CR: *complement receptor*, MR: *mannose receptor*, TLR: *toll-like receptor*, SR: *scavenger receptor*, CLR : *c-type lectin receptor*, - : absence d'expression, + : faible expression, +++ : forte expression



cellule dendritique			
		immature	mature
Fonctions	Marqueurs	Expression des marqueurs	
Capture de l'antigène	CR, MR, TLR, SR, CLR	+++	+
	CD32, CD64, CD91	+++	+
Présentation de l'antigène	CMH-I, CMH-II, CD1	+	+++
Migration	CCR1, CCR5, CCR6	+++	+
	CCR7	+	+++
Maturation	CD83	-	+++
Adhésion	CD50, CD54, CD58	+	+++
Costimulation	CD80, CD86	+	+++
Activation	CD40	+	+++
Production de cytokines	IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-12	+	+++

Tableau 2. Récapitulatif des essais cliniques basés sur l'utilisation des cellules dendritiques transfectées avec de l'ARNm spécifique d'antigène ou avec l'ensemble des ARNm issus d'une tumeur.

PSA : *Prostate-Specific Antigen*, CEA : *CarcinoEmbryonic Antigen*, ND : Non

Déte  t  

Produit vaccinal	Type de tumeur	Nombre de patients	Toxicité	Réponse immunitaire	Réponse clinique	Résultat
ARNm autologue (tumoral total)	rein et métastases	15 10 évalués	aucune	CD8: 6/7 (par ELISpot)	7 stabilisations de la maladie	[1]
ARNm autologue (tumoral total)	cerveau	9 7 évalués	aucune	ND	3 stabilisations de la maladie 4 progressions de la maladie	[2]
ARNm autologue (tumoral total)	neuroblastome	11 6 évalués	aucune	ND	Pas de réponse clinique objective	[2]
ARNm de l'antigène PSA	prostate et métastases	16 13 évalués	aucune	CD4 et CD8: 9/9 (par ELISpot et test de cytotoxicité)	Pas de réponse clinique objective	[1]
ARNm de l'antigène CEA	poumon, sein, colon et métastases	42 36 évalués	aucune	CD8 : 3/3 (test de cytotoxicité)	1 réponse complète 2 réponses mineures 6 stabilisations de la maladie 27 progressions de la maladie	[3]
ARNm de la t��lom��rase reverse transcriptase	prostate et métastases	20	inflammation au site d'injection	CD4 et CD8 : 17/18 (par ELISpot)	Pas de réponse clinique objective	[1]

## RÉFÉRENCES

- Adam-Klages, S., D. Adam, et al. (2005). "Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity." *Immunol Res*(2): 66.
- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* **281**(5381): 1322-6.
- Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." *Nature* **404**(6774): 193-7.
- Alam, A., L. Y. Cohen, et al. (1999). "Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells." *J.Exp.Med.* **190**(12): 1879-1890.
- Albert, M. L., B. Sauter, et al. (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-89.
- Alderson, M. R., R. J. Armitage, et al. (1993). "Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes." *J Exp Med* **178**(6): 2231-5.
- Alderson, M. R., T. W. Tough, et al. (1995). "Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes." *J.Exp.Med.* **181**(1): 71-77.
- Amsen, D., J. M. Blander, et al. (2004). "Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells." *Cell* **117**(4): 515-26.
- Anderson, D. M., E. Maraskovsky, et al. (1997). "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function." *Nature* **390**(6656): 175-179.
- Anderson G, P. K., Jenkinson EJ. (1998). "Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus." *The Journal of Immunology* **161**: 6599-6603.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, et al. (2005). "The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance." *Immunity* **23**(2): 227-39.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, et al. (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." *Science* **298**(5597): 1395-401.
- Antonsson, B., F. Conti, et al. (1997). "Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2." *Science* **277**(5324): 370-2.
- Ardavin, C., L. Wu, et al. (1993). "Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population." *Nature* **362**(6422): 761-763.
- Ardehna, K. M., A. R. Pizzey, et al. (2000). "The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells." *Blood* **96**(3): 1039-1046.
- Arnold-Schild, D., D. Hanau, et al. (1999). "Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells." *J.Immunol.* **162**(7): 3757-3760.
- Ashany, D., A. Savir, et al. (1999). "Dendritic cells are resistant to apoptosis through the Fas (CD95/APO-1) pathway." *J.Immunol.* **163**(10): 5303-5311.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-1308.

- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1999). "Apoptosis control by death and decoy receptors." Curr.Opin.Cell Biol. **11**(2): 255-260.
- Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature **392**(6676): 565-568.
- Balazs, M., F. Martin, et al. (2002). "Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses." Immunity **17**(3): 341-52.
- Baliga, B. and S. Kumar (2003). "Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow?" Cell Death Differ(1): 8.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu.Rev.Immunol. **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.
- Baratelli, F., K. Krysan, et al. (2005). "PGE2 confers survivin-dependent apoptosis resistance in human monocyte-derived dendritic cells." J.Leukoc.Biol. **78**(2): 555-564.
- Basu, S., R. J. Binder, et al. (2001). "CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin." Immunity. **14**(3): 303-313.
- Battaglia, M., S. Gregori, et al. (2006). "Tr1 cells: from discovery to their clinical application." Semin Immunol **18**(2): 120-7.
- Bendelac, A. (1995). "Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes." J Exp Med **182**(6): 2091-6.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, et al. (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature **393**(6684): 478-480.
- Berard, F., P. Blanco, et al. (2000). "Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells." J.Exp.Med. **192**(11): 1535-1544.
- 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**(5): 1283-1288.
- Binder, R. J., D. K. Han, et al. (2000). "CD91: a receptor for heat shock protein gp96." Nat.Immunol. **1**(2): 151-155.
- Bjorck, P., J. Banchereau, et al. (1997). "CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells." Int.Immunol. **9**(3): 365-372.
- Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." Cell **74**(4): 597-608.
- Bonizzi, G. and M. Karin (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." Trends Immunol **25**(6): 280-8.
- Borg, C., A. Jalil, et al. (2004). "NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs." Blood **104**(10): 3267-75.
- Briken, V., R. M. Jackman, et al. (2000). "Human CD1b and CD1c isoforms survey different intracellular compartments for the presentation of microbial lipid antigens." J Exp Med **192**(2): 281-8.

- Brinster, C. and E. M. Shevach (2005). "Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of CD4+CD25+ T cells without reversing their suppressive function." J Immunol **175**(11): 7332-40.
- Buelens, C., V. Verhasselt, et al. (1997). "Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor." Eur J Immunol **27**(3): 756-62.
- Burgdorf, S., A. Kautz, et al. (2007). "Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation." Science **316**(5824): 612-6.
- Carbone, E., G. Terrazzano, et al. (1999). "Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells." Eur J Immunol **29**(12): 4022-9.
- Castellino, F., P. E. Boucher, et al. (2000). "Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways." J.Exp.Med. **191**(11): 1957-1964.
- Castellino, F., A. Y. Huang, et al. (2006). "Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction." Nature **440**(7086): 890-5.
- Caux, C., C. Massacrier, et al. (1994). "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking." J.Exp.Med. **180**(4): 1263-1272.
- Cella, M., C. Dohring, et al. (1997). "A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing." J.Exp.Med. **185**(10): 1743-1751.
- Cella, M., F. Facchetti, et al. (2000). "Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization." Nat.Immunol. **1**(4): 305-310.
- Cella, M., D. Scheidegger, et al. (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." J Exp Med **184**(2): 747-52.
- Chan, C. W., E. Crafton, et al. (2006). "Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity." Nat Med **12**(2): 207-13.
- Chang, W. L., N. Baumgarth, et al. (2007). "Exposure of myeloid dendritic cells to exogenous or endogenous IL-10 during maturation determines their longevity." J Immunol **178**(12): 7794-804.
- Chattergoon, M. A., J. J. Kim, et al. (2000). "Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis." Nat.Biotechnol. **18**(9): 974-979.
- Chen, A., H. Xu, et al. (2004). "TRANCE counteracts FasL-mediated apoptosis of murine bone marrow-derived dendritic cells." Cell Immunol. **231**(1-2): 40-48.
- Chen, M., L. Huang, et al. (2007). "Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity." Blood **109**(10): 4360-7.
- Chen, M. and J. Wang (2002). "Initiator caspases in apoptosis signaling pathways." Apoptosis(4): 9.

- Chen, M., Y. H. Wang, et al. (2006). "Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance." Science **311**(5764): 1160-1164.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell **81**(4): 505-512.
- Chu, Z. L., T. A. McKinsey, et al. (1997). "Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **94**(19): 10057-10062.
- Chun, H. J., L. Zheng, et al. (2002). "Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency." Nature **419**(6905): 395-399.
- Colonna, M., G. Trinchieri, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat.Immunol. **5**(12): 1219-1226.
- Cosulich, S. C., P. J. Savory, et al. (1999). "Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c." Curr Biol **9**(3): 147-50.
- Crabe, S., E. El-Sharif, et al. (2007). Multi-level mechanisms of regulation Fas-mediated apoptosis during dendritic cell maturation. unpublish.
- Cresswell, P., N. Bangia, et al. (1999). "The nature of the MHC class I peptide loading complex." Immunol.Rev. **172**: 21-28.
- Creusot, R. J. and N. A. Mitchison (2004). "How DCs control cross-regulation between lymphocytes." Trends Immunol. **25**(3): 126-131.
- Crowley, M., K. Inaba, et al. (1989). "The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus." Cell Immunol **118**(1): 108-25.
- D'Amico, A. and L. Wu (2003). "The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3." J Exp Med **198**(2): 293-303.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." Cell **116**(2): 205-219.
- de Goer de Herve, M. G., D. Durali, et al. (2005). "Differential effect of agonistic anti-CD40 on human mature and immature dendritic cells: the Janus face of anti-CD40." Blood **106**(8): 2806-2814.
- de Jong, E. C., H. H. Smits, et al. (2005). "Dendritic cell-mediated T cell polarization." Springer Semin.Immunopathol. **26**(3): 289-307.
- de Lalla, C., G. Galli, et al. (2004). "Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis." J Immunol **173**(2): 1417-25.
- De Smaele, E., F. Zazzeroni, et al. (2001). "Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling." Nature **414**(6861): 308-313.
- De Smedt, T., B. Pajak, et al. (1998). "Antigen-specific T lymphocytes regulate lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo." J.Immunol. **161**(9): 4476-4479.
- De Trez, C., B. Pajak, et al. (2005). "TLR4 and Toll-IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter-Inducing IFN- $\beta$ , but Not MyD88, Regulate Escherichia coli-Induced Dendritic Cell Maturation and Apoptosis In Vivo." J.Immunol. **175**(2): 839-846.

- Degli-Esposti, M. A. and M. J. Smyth (2005). "Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage." Nat.Rev.Immunol. **5**(2): 112-124.
- Delhase, M., M. Hayakawa, et al. (1999). "Positive and negative regulation of I $\kappa$ B kinase activity through IKK $\beta$  subunit phosphorylation." Science **284**(5412): 309-13.
- Deveraux, Q. L., R. Takahashi, et al. (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases." Nature **388**(6639): 300-304.
- Deveraux, Q. L., R. Takahashi, et al. (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases." Nature **388**(6639): 300-4.
- Do, R. K., E. Hatada, et al. (2000). "Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response." J Exp Med **192**(7): 953-64.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- Duan, H. and V. M. Dixit (1997). "RAIDD is a new 'death' adaptor molecule." Nature **385**(6611): 86-89.
- Dubois, B., J. M. Bridon, et al. (1999). "Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation." J.Leukoc.Biol. **66**(2): 224-230.
- Duriez, P. J., F. Wong, et al. (2000). "A1 functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor." J.Biol.Chem. **275**(24): 18099-18107.
- Dzionek, A., Y. Inagaki, et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions." Hum.Immunol. **63**(12): 1133-1148.
- Dzionek, A., Y. Sohma, et al. (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." J.Exp.Med. **194**(12): 1823-1834.
- Esche, C., A. Gambotto, et al. (1999). "CD154 inhibits tumor-induced apoptosis in dendritic cells and tumor growth." Eur.J.Immunol. **29**(7): 2148-2155.
- Facchetti, F., W. Vermi, et al. (2003). "The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells." Virchows Arch. **443**(6): 703-717.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes." Cell Death.Differ. **5**(7): 551-562.
- Fayette, J., B. Dubois, et al. (1997). "Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2." J.Exp.Med. **185**(11): 1909-1918.
- Ferlazzo, G., M. L. Tsang, et al. (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells." J Exp Med **195**(3): 343-51.
- Fernandez, N. C., A. Lozier, et al. (1999). "Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo." Nat.Med. **5**(4): 405-411.



- Fiebiger, E., P. Meraner, et al. (2001). "Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells." J.Exp.Med. **193**(8): 881-892.
- Franchi, L., I. Condo, et al. (2003). "A caspaselike activity is triggered by LPS and is required for survival of human dendritic cells." Blood **102**(8): 2910-2915.
- Frasca, L., C. Scotta, et al. (2002). "Human anergic CD4+ T cells can act as suppressor cells by affecting autologous dendritic cell conditioning and survival." J.Immunol. **168**(3): 1060-1068.
- Gallegos, A. M. and M. J. Bevan (2004). "Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation." J Exp Med **200**(8): 1039-49.
- Gallucci, S. and P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." Curr.Opin.Immunol. **13**(1): 114-119.
- Garg, S., A. Oran, et al. (2003). "Genetic tagging shows increased frequency and longevity of antigen-presenting, skin-derived dendritic cells in vivo." Nat.Immunol. **4**(9): 907-912.
- Gately, M. K., L. M. Renzetti, et al. (1998). "The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 495-521.
- Geissmann, F., T. O. Cameron, et al. (2005). "Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids." PLoS Biol **3**(4): e113.
- Geissmann, F., P. Launay, et al. (2001). "A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes." J.Immunol. **166**(1): 346-352.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, et al. (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." J Exp Med **195**(3): 327-33.
- Glynne, R., S. Akkaraju, et al. (2000). "How self-tolerance and the immunosuppressive drug FK506 prevent B-cell mitogenesis." Nature **403**(6770): 672-676.
- Goldschneider, I. and R. E. Cone (2003). "A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance." Trends Immunol **24**(2): 77-81.
- Gonzalez-Garcia, M., R. Perez-Ballester, et al. (1994). "bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria." Development **120**(10): 3033-42.
- Grabbe, S., E. Kampgen, et al. (2000). "Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional." Immunol.Today **21**(9): 431-433.
- Granucci, F., C. Vizzardelli, et al. (2001). "Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli." Eur J Immunol **31**(9): 2539-46.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-1312.
- Gross, A., J. Jockel, et al. (1998). "Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis." Embo J **17**(14): 3878-85.
- Gross, A., J. M. McDonnell, et al. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes Dev **13**(15): 1899-911.

- Guarda, G., M. Hons, et al. (2007). "L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells." Nat Immunol **8**(7): 743-52.
- Guermonprez, P., L. Saveanu, et al. (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." Nature **425**(6956): 397-402.
- Guermonprez, P., J. Valladeau, et al. (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu.Rev.Immunol. **20**: 621-667.
- Guo, Z., M. Zhang, et al. (2003). "Fas ligation induces IL-1beta-dependent maturation and IL-1beta-independent survival of dendritic cells: different roles of ERK and NF-kappaB signaling pathways." Blood **102**(13): 4441-4447.
- Guo, Z., M. Zhang, et al. (2005). "Fas signal links innate and adaptive immunity by promoting dendritic-cell secretion of CC and CXC chemokines." Blood **106**(6): 2033-2041.
- Hackett, R. J., L. S. Davis, et al. (1988). "Comparative effects of tumor necrosis factor-alpha and IL-1 beta on mitogen-induced T cell activation." J.Immunol. **140**(8): 2639-2644.
- Hammer, G. E., F. Gonzalez, et al. (2006). "The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules." Nat Immunol **7**(1): 103-12.
- Hammer, G. E., F. Gonzalez, et al. (2007). "In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides." Nat Immunol **8**(1): 101-8.
- Hao, Z., B. Hampel, et al. (2004). "T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis." J.Exp.Med. **199**(10): 1355-1365.
- Harris, S. G., J. Padilla, et al. (2002). "Prostaglandins as modulators of immunity." Trends Immunol. **23**(3): 144-150.
- Hashimoto, S. I., T. Suzuki, et al. (2000). "Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression." Blood **96**(6): 2206-2214.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-224.
- Hirano, N., M. O. Butler, et al. (2005). "Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+ T cells and preferential enrichment for antigen specificity." Blood.
- Hoffmann, A. and D. Baltimore (2006). "Circuitry of nuclear factor kappaB signaling." Immunol Rev **210**: 171-86.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, et al. (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." J.Immunol. **168**(9): 4531-4537.
- Houde, M., S. Bertholet, et al. (2003). "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation." Nature **425**(6956): 402-406.

- Hoves, S., S. W. Krause, et al. (2003). "Mature but not immature Fas ligand (CD95L)-transduced human monocyte-derived dendritic cells are protected from Fas-mediated apoptosis and can be used as killer APC." J.Immunol. **170**(11): 5406-5413.
- Hsu, H., J. Huang, et al. (1996). "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex." Immunity. **4**(4): 387-396.
- Hsu, H., H. B. Shu, et al. (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.
- Hu, Y., M. A. Benedict, et al. (1998). "Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4386-91.
- Huang, Q., D. Liu, et al. (2001). "The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components." Science **294**(5543): 870-875.
- Huttinger, R., G. Staffler, et al. (1999). "Analysis of the early biogenesis of CD1b: involvement of the chaperones calnexin and calreticulin, the proteasome and beta(2)-microglobulin." Int Immunol **11**(10): 1615-23.
- Inaba, K., S. Turley, et al. (2000). "The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli." J.Exp.Med. **191**(6): 927-936.
- Ingulli, E., A. Mondino, et al. (1997). "In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells." J.Exp.Med. **185**(12): 2133-2141.
- Ishizaki, Y., M. D. Jacobson, et al. (1998). "A role for caspases in lens fiber differentiation." J.Cell Biol. **140**(1): 153-158.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat.Immunol. **5**(10): 987-995.
- Izawa, T., N. Ishimaru, et al. (2007). "Crosstalk between RANKL and Fas signaling in dendritic cells controls immune tolerance." Blood **110**(1): 242-50.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu.Rev.Immunol. **20**: 197-216.
- Janssen, E. M., E. E. Lemmens, et al. (2003). "CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes." Nature **421**(6925): 852-856.
- Jarrossay, D., G. Napolitani, et al. (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Eur.J.Immunol. **31**(11): 3388-3393.
- Jelinek, D. F. and P. E. Lipsky (1987). "Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1." J.Immunol. **139**(9): 2970-2976.
- Jongmans, W., D. M. Tiemessen, et al. (2005). "Th1-polarizing capacity of clinical-grade dendritic cells is triggered by Ribomunyl but is compromised by PGE2: the importance of maturation cocktails." J.Immunother. **28**(5): 480-487.
- Josien, R., H. L. Li, et al. (2000). "TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo." J Exp Med **191**(3): 495-502.

- Joza, N., S. A. Susin, et al. (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." *Nature* **410**(6828): 549-554.
- Kabra, N. H., C. Kang, et al. (2001). "T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**(11): 6307-6312.
- Kadowaki, N., S. Ho, et al. (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." *J.Exp.Med.* **194**(6): 863-869.
- Kaisho, T. and S. Akira (2003). "Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors." *Curr.Mol.Med.* **3**(4): 373-385.
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, et al. (1999). "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal." *Immunol.Today* **20**(12): 561-567.
- Kalinski, P., P. L. Vieira, et al. (2001). "Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer." *Blood* **97**(11): 3466-3469.
- Kalled, S. L., A. H. Cutler, et al. (2001). "Apoptosis and altered dendritic cell homeostasis in lupus nephritis are limited by anti-CD154 treatment." *J.Immunol.* **167**(3): 1740-1747.
- Kamath, A. T., S. Henri, et al. (2002). "Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs." *Blood* **100**(5): 1734-1741.
- Kang, S. J. and P. Cresswell (2002). "Calnexin, calreticulin, and ERp57 cooperate in disulfide bond formation in human CD1d heavy chain." *J Biol Chem* **277**(47): 44838-44.
- Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." *Nat.Rev.Immunol.* **3**(12): 984-993.
- Karsan, A., E. Yee, et al. (1996). "Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member, A1." *J.Biol.Chem.* **271**(44): 27201-27204.
- Karsan, A., E. Yee, et al. (1996). "Cloning of human Bcl-2 homologue: inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells." *Blood* **87**(8): 3089-3096.
- Kaser, A., S. Kaser, et al. (2004). "Interleukin-18 attracts plasmacytoid dendritic cells (DC2s) and promotes Th1 induction by DC2s through IL-18 receptor expression." *Blood* **103**(2): 648-55.
- Kastenmuller, W., I. Drexler, et al. (2006). "Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity." *Virology* **350**(2): 276-288.
- Kataoka, T. (2005). "The caspase-8 modulator c-FLIP." *Crit Rev.Immunol.* **25**(1): 31-58.
- Kataoka, T., R. C. Budd, et al. (2000). "The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways." *Curr Biol* **10**(11): 640-648.

- Kawamura, T., M. Azuma, et al. (1999). "Fas/Fas ligand-mediated elimination of antigen-bearing Langerhans cells in draining lymph nodes." Br.J.Dermatol. **141**(2): 201-205.
- Kawamura, T., M. Azuma, et al. (2000). "Fas/Fas ligand-mediated apoptosis of murine Langerhans cells." J.Dermatol.Sci. **22**(2): 96-101.
- Kiertscher, S. M., J. Luo, et al. (2000). "Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells." J.Immunol. **164**(3): 1269-1276.
- Kim, H., Y. N. Kim, et al. (2005). "Oxidative stress attenuates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bfl-1 induction." Oncogene **24**(7): 1252-1261.
- Kim, K. D., Y. K. Choe, et al. (2001). "Inhibition of glucocorticoid-mediated, caspase-independent dendritic cell death by CD40 activation." J.Leukoc.Biol. **69**(3): 426-434.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." EMBO J. **14**(22): 5579-5588.
- Koch, F., U. Stanzl, et al. (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10." J Exp Med **184**(2): 741-6.
- Kogawa, K., S. Nagafuchi, et al. (2002). "Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage." Immunol Lett **80**(3): 195-8.
- Koka, R., P. Burkett, et al. (2004). "Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R alpha to prime NK cells." J Immunol **173**(6): 3594-8.
- Kol, A., A. H. Lichtman, et al. (2000). "Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells." J.Immunol. **164**(1): 13-17.
- Kopp, E. and R. Medzhitov (2003). "Recognition of microbial infection by Toll-like receptors." Curr.Opin.Immunol. **15**(4): 396-401.
- Koppi, T. A., T. Tough-Bement, et al. (1997). "CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood-derived dendritic cells." Eur.J.Immunol. **27**(12): 3161-3165.
- Krajewski, S., M. Krajewska, et al. (1994). "Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2." Am J Pathol **145**(6): 1323-36.
- Krammer, P. H., R. Arnold, et al. (2007). "Life and death in peripheral T cells." Nat Rev Immunol **7**(7): 532-42.
- Kriehuber, E., W. Bauer, et al. (2005). "Balance between NF-kappaB and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death." Blood **106**(1): 175-183.
- Kroemer, G. and S. J. Martin (2005). "Caspase-independent cell death." Nat.Med. **11**(7): 725-730.
- Kroemer, G., N. Zamzami, et al. (1997). "Mitochondrial control of apoptosis." Immunol.Today **18**(1): 44-51.
- Kronin, V., D. Vremec, et al. (1998). "Does the IL-2 receptor alpha chain induced on dendritic cells have a biological function?" Int Immunol **10**(2): 237-40.

- Kuss, A. W., M. Knodel, et al. (1999). "A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death." Eur.J.Immunol. **29**(10): 3077-3088.
- Langenkamp, A., M. Messi, et al. (2000). "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." Nat.Immunol. **1**(4): 311-316.
- Lanzavecchia, A. (1998). "Immunology. Licence to kill." Nature **393**(6684): 413-414.
- Lawrence, T., M. Bebien, et al. (2005). "IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation." Nature **434**(7037): 1138-43.
- Le Roy, C. and J. L. Wrana (2005). "Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling." Nat.Rev.Mol.Cell Biol. **6**(2): 112-126.
- Lechmann, M., D. J. Krooshoop, et al. (2001). "The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells." J.Exp.Med. **194**(12): 1813-1821.
- Lee, H. W., S. J. Park, et al. (2002). "4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1." J.Immunol. **169**(9): 4882-4888.
- Lennert, K. and W. Remmele (1958). "[Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]" Acta Haematol. **19**(2): 99-113.
- Leverkus, M., H. Walczak, et al. (2000). "Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis." Blood **96**(7): 2628-2631.
- Lewkowich, I. P., N. S. Herman, et al. (2005). "CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function." J Exp Med **202**(11): 1549-61.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-489.
- Li, Q., Q. Lu, et al. (2005). "Enhanced NF-kappaB activation and cellular function in macrophages lacking IkappaB kinase 1 (IKK1)." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12425-30.
- Li, Q., D. Van Antwerp, et al. (1999). "Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene." Science **284**(5412): 321-5.
- Li, Z. W., W. Chu, et al. (1999). "The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis." J Exp Med **189**(11): 1839-45.
- Liston, A., S. Lesage, et al. (2003). "Aire regulates negative selection of organ-specific T cells." Nat.Immunol. **4**(4): 350-354.
- Litinskiy, M. B., B. Nardelli, et al. (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL." Nat Immunol **3**(9): 822-9.
- Liu, K., C. Waskow, et al. (2007). "Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice." Nat Immunol **8**(6): 578-83.

- Liu, Y. J., H. Kanzler, et al. (2001). "Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation." Nat.Immunol. **2**(7): 585-589.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.
- Lu, L. F., D. C. Gondek, et al. (2005). "NF kappa B-inducing kinase deficiency results in the development of a subset of regulatory T cells, which shows a hyperproliferative activity upon glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene stimulation." J Immunol **175**(3): 1651-7.
- Lucas, M., W. Schachterle, et al. (2007). "Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15." Immunity **26**(4): 503-17.
- Ludewig, B., D. Graf, et al. (1995). "Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10." Eur.J.Immunol. **25**(7): 1943-1950.
- Ludewig, B., B. Odermatt, et al. (1998). "Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue." J.Exp.Med. **188**(8): 1493-1501.
- Lundqvist, A., A. Choudhury, et al. (2002). "Recombinant adenovirus vector activates and protects human monocyte-derived dendritic cells from apoptosis." Hum.Gene Ther. **13**(13): 1541-1549.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell **94**(4): 481-490.
- Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol. **23**(9): 445-449.
- Mahnke, K., J. Knop, et al. (2003). "Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat'." Trends Immunol **24**(12): 646-51.
- Mailliard, R. B., Y. I. Son, et al. (2003). "Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function." J Immunol **171**(5): 2366-73.
- Mandal, M., C. Borowski, et al. (2005). "The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival." J.Exp.Med. **201**(4): 603-614.
- Manz, M. G., D. Traver, et al. (2001). "Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors." Blood **97**(11): 3333-41.
- Matsue, H., D. Edelbaum, et al. (1999). "Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4+ T cells." J.Immunol. **162**(9): 5287-5298.
- McIlroy, D., S. Tanguy-Royer, et al. (2005). "Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays." J Leukoc Biol **78**(3): 794-803.
- McLellan, A., M. Heldmann, et al. (2000). "MHC class II and CD40 play opposing roles in dendritic cell survival." Eur.J.Immunol. **30**(9): 2612-2619.
- McLellan, A. D., G. Terbeck, et al. (2000). "Differential susceptibility to CD95 (Apo-1/Fas) and MHC class II-induced apoptosis during murine dendritic cell development." Cell Death.Differ. **7**(10): 933-938.
- Medema, J. P., D. H. Schuurhuis, et al. (2001). "Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-

- induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells." J.Exp.Med. **194**(5): 657-667.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." N.Engl.J.Med. **343**(5): 338-344.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr.Opin.Immunol. **9**(1): 4-9.
- Miga, A. J., S. R. Masters, et al. (2001). "Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions." Eur.J.Immunol. **31**(3): 959-965.
- Minn, A. J., P. Velez, et al. (1997). "Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes." Nature **385**(6614): 353-7.
- Mocikat, R., H. Braumuller, et al. (2003). "Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses." Immunity **19**(4): 561-9.
- Morel, A. S., S. Quaratino, et al. (1997). "Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step." Eur J Immunol **27**(1): 26-34.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, et al. (2002). "Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." Science **297**(5588): 1867-70.
- Nagai, T., O. Devergne, et al. (2003). "Timing of IFN-beta exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN-beta-mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation." J Immunol **171**(10): 5233-43.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, et al. (2005). "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells." Nat Immunol **6**(8): 769-76.
- Naranjo-Gomez, M., H. Oliva, et al. (2007). "Expression and function of the IL-2 receptor in activated human plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **37**(7): 1764-72.
- Nat, R., E. Radu, et al. (2002). "Apoptosis in the immune system: 1. Fas-induced apoptosis in monocytes-derived human dendritic cells." J.Cell Mol.Med. **6**(2): 223-234.
- Newmeyer, D. D., D. M. Farschon, et al. (1994). "Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria." Cell **79**(2): 353-364.
- Newton, K. and A. Strasser (2000). "Cell death control in lymphocytes." Adv.Immunol **76**: 179-226.
- Nijman, H. W., M. J. Kleijmeer, et al. (1995). "Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells." J.Exp.Med. **182**(1): 163-174.
- O'Neill, D. W., S. Adams, et al. (2004). "Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer." Blood **104**(8): 2235-2246.
- Okada, H., W. K. Suh, et al. (2002). "Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice." Mol.Cell Biol **22**(10): 3509-3517.



- Ottillie, S., J. L. Diaz, et al. (1997). "Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins." *J Biol Chem* **272**(49): 30866-72.
- Ouaaz, F., J. Arron, et al. (2002). "Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits." *Immunity* **16**(2): 257-270.
- Pan, G., K. O'Rourke, et al. (1998). "Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex." *J Biol Chem* **273**(10): 5841-5.
- Papa, S., F. Zazzeroni, et al. (2004). "Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2." *Nat.Cell Biol* **6**(2): 146-153.
- Park, Y., S. W. Lee, et al. (2002). "Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway." *J.Immunol.* **168**(1): 5-8.
- Patterson, S. (2000). "Flexibility and cooperation among dendritic cells." *Nat.Immunol.* **1**(4): 273-274.
- Piccioli, D., S. Sbrana, et al. (2002). "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells." *J Exp Med* **195**(3): 335-41.
- Pierre, P. and I. Mellman (1998). "Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells." *Cell* **93**(7): 1135-1145.
- Pierre, P., S. J. Turley, et al. (1997). "Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells." *Nature* **388**(6644): 787-792.
- Pollard, A. M. and M. F. Lipscomb (1990). "Characterization of murine lung dendritic cells: similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells." *J Exp Med* **172**(1): 159-67.
- Prigozy, T. I., O. Naidenko, et al. (2001). "Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules." *Science* **291**(5504): 664-7.
- Probst, H. C., K. McCoy, et al. (2005). "Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4." *Nat Immunol* **6**(3): 280-6.
- Qi, H., J. G. Egen, et al. (2006). "Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells." *Science* **312**(5780): 1672-6.
- Randolph, G. J., S. Beaulieu, et al. (1998). "Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking." *Science* **282**(5388): 480-483.
- Randolph, G. J., K. Inaba, et al. (1999). "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo." *Immunity* **11**(6): 753-761.
- Reis e, S., P. D. Stahl, et al. (1993). "Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro." *J.Exp.Med.* **178**(2): 509-519.
- Res, P. C., F. Couwenberg, et al. (1999). "Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus." *Blood* **94**(8): 2647-2657.
- Rescigno, M., S. Citterio, et al. (1998). "Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5229-34.
- Rescigno, M., F. Granucci, et al. (1999). "Coordinated events during bacteria-induced DC maturation." *Immunol.Today* **20**(5): 200-203.

- Rescigno, M., M. Martino, et al. (1998). "Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways." *J.Exp.Med.* **188**(11): 2175-2180.
- Rescigno, M., V. Piguet, et al. (2000). "Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses." *J.Exp.Med.* **192**(11): 1661-1668.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, et al. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature* **393**(6684): 474-478.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol*(11): 907.
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, et al. (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." *Science* **283**(5405): 1183-1186.
- Roark, J. H., S. H. Park, et al. (1998). "CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells." *J Immunol* **160**(7): 3121-7.
- Rogge, L., E. Bianchi, et al. (2000). "Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays." *Nat.Genet.* **25**(1): 96-101.
- Saint-Vis, B., I. Fugier-Vivier, et al. (1998). "The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation." *J.Immunol.* **160**(4): 1666-1676.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (2000). "Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression." *Immunol.Rev.* **177**: 134-140.
- Sallusto, F., B. Palermo, et al. (1999). "Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function." *Eur.J.Immunol.* **29**(5): 1617-1625.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, et al. (2004). "Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells." *Blood* **104**(3): 619-625.
- Santambrogio, L., I. Potolicchio, et al. (2005). "Involvement of caspase-cleaved and intact adaptor protein 1 complex in endosomal remodeling in maturing dendritic cells." *Nat.Immunol.* **6**(10): 1020-1028.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *EMBO J.* **17**(6): 1675-1687.
- Scandella, E., Y. Men, et al. (2002). "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells." *Blood* **100**(4): 1354-1361.
- Schendel, S. L., Z. Xie, et al. (1997). "Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5113-8.
- Schlesinger, P. H., A. Gross, et al. (1997). "Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11357-62.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, et al. (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." *Nature* **393**(6684): 480-483.

- Senftleben, U., Z. W. Li, et al. (2001). "IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis." *Immunity* **14**(3): 217-30.
- Servet-Delprat, C., P. O. Vidalain, et al. (2000). "Consequences of Fas-mediated human dendritic cell apoptosis induced by measles virus." *J.Virol.* **74**(9): 4387-4393.
- Serwold, T., F. Gonzalez, et al. (2002). "ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum." *Nature* **419**(6906): 480-3.
- Shedlock, D. J. and H. Shen (2003). "Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory." *Science* **300**(5617): 337-339.
- Shigematsu, H., B. Reizis, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin." *Immunity*. **21**(1): 43-53.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science* **284**(5421): 1835-1837.
- Siegel, R. M., J. K. Frederiksen, et al. (2000). "Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations." *Science* **288**(5475): 2354-2357.
- Slepnev, V. I. and P. De Camilli (2000). "Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis." *Nat.Rev.Neurosci.* **1**(3): 161-172.
- Smits, H. H., E. C. de Jong, et al. (2005). "Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity." *Trends Immunol* **26**(3): 123-9.
- Smits, H. H., A. J. van Beelen, et al. (2004). "Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development." *Eur J Immunol* **34**(5): 1371-80.
- Smyth, G. K., J. Michaud, et al. (2005). "Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments." *Bioinformatics*. **21**(9): 2067-2075.
- Spaggiari, G. M., R. Carosio, et al. (2001). "NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46." *Eur J Immunol* **31**(6): 1656-65.
- Spits, H., F. Couwenberg, et al. (2000). "Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2." *J.Exp.Med.* **192**(12): 1775-1784.
- Spits, H. and L. L. Lanier (2007). "Natural killer or dendritic: what's in a name?" *Immunity* **26**(1): 11-6.
- Srinivasula, S. M., R. Hegde, et al. (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." *Nature* **410**(6824): 112-116.
- Staudt, L. M. and P. O. Brown (2000). "Genomic views of the immune system\*." *Annu.Rev.Immunol.* **18**: 829-859.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." *Annu.Rev.Immunol.* **21**: 685-711.
- Steinman, R. M., S. Turley, et al. (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." *J Exp Med* **191**(3): 411-6.

- Strobl, H., C. Bello-Fernandez, et al. (1997). "flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions." Blood **90**(4): 1425-1434.
- Sugita, M., E. P. Grant, et al. (1999). "Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules." Immunity **11**(6): 743-52.
- Sugita, M., S. A. Porcelli, et al. (1997). "Assembly and retention of CD1b heavy chains in the endoplasmic reticulum." J Immunol **159**(5): 2358-65.
- Sugita, M., N. van Der Wel, et al. (2000). "CD1c molecules broadly survey the endocytic system." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8445-50.
- Sun, J., M. Walsh, et al. (2005). "TLR ligands can activate dendritic cells to provide a MyD88-dependent negative signal for Th2 cell development." J Immunol **174**(2): 742-51.
- Sun, J. C. and M. J. Bevan (2003). "Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help." Science **300**(5617): 339-342.
- Sun, J. C., M. A. Williams, et al. (2004). "CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection." Nat Immunol **5**(9): 927-933.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-446.
- Taieb, J., N. Chaput, et al. (2006). "A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance." Nat Med **12**(2): 214-9.
- Tarbell, K. V., S. Yamazaki, et al. (2004). "CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes." J Exp Med **199**(11): 1467-77.
- Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, et al. (1993). "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death." Cell **74**(5): 845-853.
- Tas, S. W., M. J. Vervoordeldonk, et al. (2007). "Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation." Blood.
- Terme, M., E. Tomasello, et al. (2004). "IL-4 confers NK stimulatory capacity to murine dendritic cells: a signaling pathway involving KARAP/DAP12-triggering receptor expressed on myeloid cell 2 molecules." J Immunol **172**(10): 5957-66.
- Testa, U. (2004). "Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis." Leukemia **18**(7): 1176-1199.
- Thome, M., P. Schneider, et al. (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." Nature **386**(6624): 517-21.
- Traver, D., K. Akashi, et al. (2000). "Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor." Science **290**(5499): 2152-4.
- Trinchieri, G., D. Santoli, et al. (1978). "Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation." J Exp Med **147**(5): 1299-1313.
- Turley, S. J., K. Inaba, et al. (2000). "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." Science **288**(5465): 522-527.

- Vassiliou, E., V. Sharma, et al. (2004). "Prostaglandin E2 promotes the survival of bone marrow-derived dendritic cells." J.Immunol. **173**(11): 6955-6964.
- Vigouroux, S., E. Yvon, et al. (2004). "Antigen-induced regulatory T cells." Blood **104**(1): 26-33.
- Villadangos, J. A., R. A. Bryant, et al. (1999). "Proteases involved in MHC class II antigen presentation." Immunol.Rev. **172**: 109-120.
- Vitale, M., M. Della Chiesa, et al. (2005). "NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor." Blood **106**(2): 566-71.
- Vizzardelli, C., N. Pavelka, et al. (2006). "Effects of dexamethazone on LPS-induced activation and migration of mouse dendritic cells revealed by a genome-wide transcriptional analysis." Eur.J.Immunol. **36**(6): 1504-1515.
- Volkman, A., T. Zal, et al. (1997). "Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen." J.Immunol. **158**(2): 693-706.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death.Differ. **10**(1): 45-65.
- Walker, N. P., R. V. Talanian, et al. (1994). "Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer." Cell **78**(2): 343-52.
- Wang, C. Y., D. C. Guttridge, et al. (1999). "NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis." Mol.Cell Biol. **19**(9): 5923-5929.
- Wang, J., L. Zheng, et al. (1999). "Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II." Cell **98**(1): 47-58.
- Welner, R. S., R. Pelayo, et al. (2007). "Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit<sup>hi</sup>CD62L<sup>+</sup> lymphoid progenitors." Blood **109**(11): 4825-931.
- Werner, A. B., E. de Vries, et al. (2002). "Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax." J.Biol.Chem. **277**(25): 22781-22788.
- West, M. A., R. P. Wallin, et al. (2004). "Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling." Science **305**(5687): 1153-7.
- Willems, F., Z. Amraoui, et al. (2000). "Expression of c-FLIP(L) and resistance to CD95-mediated apoptosis of monocyte-derived dendritic cells: inhibition by bisindolylmaleimide." Blood **95**(11): 3478-3482.
- Williams, M. A., A. J. Tyznik, et al. (2006). "Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8<sup>+</sup> memory T cells." Nature **441**(7095): 890-3.
- Wilson, J. L., L. C. Heffler, et al. (1999). "Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells." J Immunol **163**(12): 6365-70.
- Wilson, K. P., J. A. Black, et al. (1994). "Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme." Nature **370**(6487): 270-5.
- Winzler, C., P. Rovere, et al. (1997). "Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures." J.Exp.Med. **185**(2): 317-328.

- Wong, B. R., R. Josien, et al. (1997). "TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor." J.Exp.Med. **186**(12): 2075-2080.
- Wong, S. H., L. Santambrogio, et al. (2004). "Caspases and nitric oxide broadly regulate dendritic cell maturation and surface expression of class II MHC proteins." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **101**(51): 17783-17788.
- Wu, L., A. D'Amico, et al. (2001). "Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors." Blood **98**(12): 3376-82.
- Wykes, M., A. Pombo, et al. (1998). "Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response." J Immunol **161**(3): 1313-9.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int.Rev.Cytol. **68**: 251-306.
- Xie, J., J. Qian, et al. (2003). "Novel and detrimental effects of lipopolysaccharide on in vitro generation of immature dendritic cells: involvement of mitogen-activated protein kinase p38." J.Immunol. **171**(9): 4792-4800.
- Yang, J., X. Liu, et al. (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." Science **275**(5303): 1129-32.
- Yang, X., R. Khosravi-Far, et al. (1997). "Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis." Cell **89**(7): 1067-1076.
- Yeh, W. C., A. Itie, et al. (2000). "Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development." Immunity **12**(6): 633-42.
- Yewdell, J. W., C. C. Norbury, et al. (1999). "Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines." Adv.Immunol. **73**: 1-77.
- Yokota, A., A. Oikawa, et al. (2003). "Cell-mediated fas-based lysis of dendritic cells which are apparently resistant to anti-Fas antibody." Microbiol.Immunol. **47**(4): 285-293.
- Yu, Y., M. Hagihara, et al. (2001). "Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells." J Immunol **166**(3): 1590-600.
- Zazzeroni, F., S. Papa, et al. (2003). "Gadd45 beta mediates the protective effects of CD40 costimulation against Fas-induced apoptosis." Blood **102**(9): 3270-3279.
- Zhang, B., T. Yamamura, et al. (1997). "Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells." J Exp Med **186**(10): 1677-87.
- Zhang, H., S. W. Cowan-Jacob, et al. (2000). "Structural basis of BFL-1 for its interaction with BAX and its anti-apoptotic action in mammalian and yeast cells." J.Biol.Chem. **275**(15): 11092-11099.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity. **12**(2): 121-127.
- Zong, W. X., L. C. Edelstein, et al. (1999). "The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis." Genes Dev. **13**(4): 382-387.

Zou, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." Cell **90**(3): 405-13.