

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le cancer à travers le rôle de TRAIL

Ariane Blum

▶ **To cite this version:**

Ariane Blum. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le cancer à travers le rôle de TRAIL. Immunologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00154726

HAL Id: tel-00154726

https://theses.hal.science/tel-00154726

Submitted on 14 Jun 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier Grenoble 1 U.F.R. de Biologie

Année 2006-2007

Thèse

Présentée par Ariane BLUM

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Joseph Fourier

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le cancer à travers le rôle de TRAIL

Présentée et soutenue publiquement le 14 mai 2007 devant le jury composé de :

Président :	Pr. Jean-Claude Bensa
Rapporteurs :	Dr. Fabienne Willems
	Pr. Philippe Saas
Examinateurs :	Pr. Frédéric Bérard
	Dr. Fabrice Gouilleux

Directeur de thèse : Dr. Joël Plumas

Thèse préparée à l'Etablissement Français du Sang
Laboratoire Recherche et Développement
UJF / INSERM U823
29 avenue Maquis du Grésivaudan
38701 La Tronche cedex

Université Joseph Fourier Grenoble 1 U.F.R. de Biologie

Année 2006-2007

Thèse

Présentée par Ariane BLUM

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Joseph Fourier

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le cancer à travers le rôle de TRAIL

Présentée et soutenue publiquement le 14 mai 2007 devant le jury composé de :

Président :	Pr. Jean-Claude Bensa
Rapporteurs :	Dr. Fabienne Willems
	Pr. Philippe Saas
Examinateurs :	Pr. Frédéric Bérard
	Dr. Fabrice Gouilleux

Directeur de thèse : Dr. Joël Plumas

Thèse préparée à l'Etablissement Français du Sang
Laboratoire Recherche et Développement
UJF / INSERM U823
29 avenue Maquis du Grésivaudan
38701 La Tronche cedex

Remerciements

Ce travail n'aurait pas pu être accompli sans l'aide consciente ou inconsciente d'un certain nombre de personnes. Je tiens ici à les remercier, en m'excusant par avance pour toutes celles que j'aurais pu oublier sans le vouloir.

Merci à tous ceux qui m'ont "supportée" dans les deux sens (anglais et français) pendant ces 3 ans et demi. Cette période représente environ 4% de la vie, en étant optimiste ; c'est déjà 8 fois plus que le pourcentage de PDC dans le sang! Et quand on voit tout ce qu'elles sont capables de faire…

Je suis ravie que le Docteur Fabienne Willems et le Professeur Philippe Saas aient consenti à être rapporteurs de ma thèse et à juger mon travail. Je vous en remercie grandement. Merci également au Professeur Frédéric Bérard et au Docteur Fabrice Gouilleux qui ont bien voulu participer à ce jury en tant qu'examinateurs. Merci en outre au Docteur Gouilleux pour les conseils et les analyses de phosphorylation des STAT.

Vous avez su vous montrer compréhensifs lorsque je vous ai demandé un report de date de soutenance et je vous en suis très reconnaissante.

Je voudrais aussi adresser un grand merci au Professeur Jean-Claude Bensa, qui m'a accueillie à l'Etablissement Français du Sang. Merci également pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Vous avez une culture scientifique quasiment infinie et les discussions avec vous sont toujours très intéressantes.

Merci à Joël Plumas pour m'avoir accueillie dans son laboratoire dès mon stage de maîtrise, et pour m'avoir confié une thématique qui lui tenait à cœur. On peut considérer que la thèse est toujours une période de formation, et dans ce sens j'ai été très bien encadrée, certainement mieux que dans la majorité des laboratoires. Sous ton impulsion, l'équipe est très dynamique et participe à de nombreux projets. Bravo pour votre reconnaissance INSERM.

Merci à Laurence Chaperot, qui a été très présente durant mon DEA et au début de ma thèse. Merci pour tes explications toujours très claires et ta patience.

Vous êtes tous les deux d'excellents scientifiques, mais également des êtres humains qui gagnent à être connus. Je vous souhaite bonne chance pour la suite du travail et pour votre vie.

Merci au Professeur Jean-Yves Cesbron, pour avoir accepté de co-encadrer mes deux premières années de thèse, à l'époque où nous n'étions pas encore équipe d'accueil de l'Université Joseph Fourier. Et merci pour m'avoir invitée à présenter mes résultats lors de vos séminaires. Ces expériences ont toujours été enrichissantes.

Merci beaucoup au Conseil Scientifique de l'Etablissement Français du Sang national pour m'avoir soutenue financièrement pendant mes deux premières années de thèse, ainsi qu'à l'Association pour la Recherche sur le Cancer pour m'avoir accordée une aide pour les 10 mois suivants.

Merci à Béatrice Plumas pour son aide bienveillante lors de ma préparation de l’"après-thèse".

Merci au Professeur Dominique Plantaz et au Docteur Vincent Foissaud pour nous avoir permis de mener une étude sur des LPDC, merci au Docteur Marie-Christine Jacob pour ses conseils avisés et son aide précieuse au FACS.

Merci aux Lyonnais du Cancéropôle, et en particulier Thomas Duhen pour sa collaboration sur les PDC cytotoxiques.

Merci à tous les membres de l'EFS, les laboratoires d’IC (Patricia, Ghislaine, Christine, Léa qui y a fait un petit tour, Richard et Michel), des cultures (Agnès, Sylvie et Martine, Tania et Xavier qui y sont passés), d’histocompatibilité (Agnès, Dominique, Cécile, Sylvette, Jackie, Martine, Claude, Laure, Carole, Feghoul, Cosima, Marie-France, Mercedes), le secrétariat don de moëlle osseuse (Danielle, Laurence, Magali), Léon, Frank, Elizabeth, Michelle, Nicole, Joëlle, Sidhalia, Marie-Pierre, Bernadette, Sylvie et Michelle… Merci aux infirmières et aux médecins des prélèvements pour m’avoir permis de récupérer des tubes de sang ou des poches inutilisées pour le don, merci à Alain et Luc du service technique, merci à tous les techniciens du "sous-sol", à Céline, Caroline… Merci aux gens de passage, Olivier, Virginie… Merci à tous ceux que j’ai oublié de citer. Vous avez contribué à donner à l’EFS une ambiance familiale et sympathique que j’ai beaucoup appréciée pendant toutes ces années.

Merci à mes collègues, devenus des amis : Aurélie, qui a passé son année de DEA à l’EFS avec moi et dont la gentillesse, la bonne humeur et la serviabilité m’ont toujours

touchée ; Mariam, qui était présente pendant mon DEA et le début de ma thèse ; je me souviendrai toujours de ton interprétation du "lundi au soleil" ; Olivier (Tonton Gnignier pour les intimes) avec ses blagues Toto et sa culture bibliographique incroyable ; Gaby le chat, qui miaulait et chantait du Carmen devant le FACS ; Jean-Paul le thermostat, qui adore jouer avec la clim' et les radiateurs pour nous faire souffler un vent de pôle nord été comme hiver, merci pour votre chaleureuse présence avec Florence. J'ai passé un de mes meilleurs anniversaires chez vous. Ramzan, de passage au labo, j'espère que tu vas réussir à tirer les résultats que tu espères de tes prélèvements de foie ; Juliette et son deuxième-bébé-dont-je-ne-connais-pas-encore-le prénom ; Julie et ses petites jumelles ; Françoise, toujours rieuse et toujours prête à raconter des histoires intéressantes ; David, digne successeur d'Olivier avec ses blagues (mais oui tu vas me manquer!!) ; Caroline de Dallas (non pas la série TV), ses petites souris, sa bonne humeur et sa gentillesse, Dalil et Jérémy, la nouvelle génération du labo version pipelettes "Star Ac'". Merci à vous pour votre aide et pour les fous rires qu'on a pu partager, pour les déjeuners sur l'herbe au soleil ou les traditionnels gâteaux.

Merci à tous mes amis, Audrey et Amandine, mes deux A préférées, Yann le grimpeur breton maintenant "pauvre" exilé sur la côte californienne, Gaëlle et Estelle les deux nouvelles petites Suisses, Dunkan et Stéphanie fidèlement grenoblois (bien que pas de souche), Tounette, David, Philoo, Olivier, Manue et Pascal, Ben, Greg, Flore… Tous ceux que je n'ai pas cités mais à qui je pense toujours. Les randonnées en montagne, l'escalade, les cookies, les parties de foot ou de frisbee au parc de l'île d'amour, les week-ends retrouvailles dans un gîte, les tartiflettes en refuge ou autour d'une table, les parties de loup-garou, autant de moments que je n'oublierai jamais.

Enfin, merci à ma famille. Mes parents, mes deux sœurs Corine et Carole, mes grands-parents. Merci d'avoir cru en moi sans retenue et de m'avoir donné les conditions matérielles et psychologiques qui m'ont permis d'en arriver là. Merci tout simplement d'être comme vous êtes.

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon grand-père Jean.

RÉSUMÉ

Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans la régulation des réponses immunes innée et adaptative. Parmi elles, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC) représentent une nouvelle entité distincte. Les PDC sont plus particulièrement capables de sécréter de grandes quantités d'interféron (IFN) de type I après exposition à un virus ou une stimulation par des produits bactériens tels que les CpG ODN non-méthylés grâce à leur expression sélective des Toll-*like* récepteurs (TLR)7 et 9.

Notre laboratoire a caractérisé récemment les leucémies à PDC (LPDC). Ces LPDC connaissent un développement clinique agressif et résistent aux thérapies conventionnelles. Nous avons développé une lignée de PDC (appelée GEN2.2) à partir de PDC leucémiques, qui partagent la plupart des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des PDC normales. Dans un premier temps, nous avons utilisé cette lignée comme modèle de LPDC et nous montrons qu'elles sont sensibles à l'apoptose induite par TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) grâce à l'expression du récepteur DR5, comme la plupart des LPDC. De façon intéressante, nous trouvons que les PDC normales ne sont pas sensibles à l'apoptose induite par TRAIL, ce qui ouvre la porte à la mise en place d'approches thérapeutiques des leucémies à PDC utilisant des agonistes de TRAIL.

Les PDC normales représentent seulement 0,5% des cellules circulantes du sang et sont difficiles à isoler ou générer. Nous avons donc dans un deuxième temps utilisé la lignée GEN2.2 comme modèle de PDC normales. Nous avons ainsi découvert que ces cellules, une fois activées par des ligands des TLR7 et 9, acquièrent une fonction cytotoxique *via* l'expression de TRAIL et sont capables de tuer des lignées de cellules tumorales. Ceci suggère que les PDC peuvent jouer un rôle crucial dans l'éradication des cancers après activation.

Enfin, nous avons cherché à préciser les mécanismes moléculaires d'induction de TRAIL dans les PDC après activation des TLR7 et 9.

L'ensemble des travaux suggère que les PDC pourraient représenter une cible de choix dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques anti-tumorales.

" Le travail de la pensée ressemble au forage d'un puits ;

l'eau est trouble d'abord, puis elle se clarifie. "

(Proverbe Chinois)

Table des matières générale

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 14

1ERE PARTIE : LA PLACE DES PDC AU SEIN DU SYSTEME IMMUNITAIRE 15

1. ROLE GENERAL DES CELLULES DENDRITIQUES MYELOÏDES ET LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES DENDRITIQUES 15

2. DECOUVERTE DES PDC 17

2.1. HISTORIQUE 17

2.2. ORIGINE ET PHENOTYPE DES PDC HUMAINES 19

2.3. PHENOTYPE DES PDC MURINES 22

2.4. MORPHOLOGIE DES PDC HUMAINES 22

2.5. DIFFERENCIATION ET SURVIE DES DC 23

2.6. METHODES D'ISOLEMENT 24

3. REPARTITION DES PDC *IN VIVO* ET MIGRATION 24

4. RECONNAISSANCE DES PATHOGENES ET CAPTURE D'ANTIGENES PAR LES PDC 27

5. ACTIVATION DES PDC 29

6. ACTIVATION D'UNE REPONSE IMMUNE INNEE PAR LES PDC 30

6.1. SECRETION D'IFN DE TYPE I PAR LES PDC 31

6.2. ROLE DE L'IFN DE TYPE I EN IMMUNITE INNEE 33

7. PRESENTATION DES ANTIGENES PAR LES PDC 34

8. ACTIVATION D'UNE REPONSE IMMUNE ADAPTATIVE PAR LES PDC 35

9. PDC ET TOLERANCE 38

10. PRESENCE ET ROLE DES PDC DANS LES MALADIES HUMAINES 39

10.1. ROLE DES PDC DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA PATHOLOGIE 40

10.1.1. PDC et IFN-α dans les pathologies auto-immunes : 40

10.1.2. PDC tolérogènes dans les tumeurs solides : 41

10.2. PDC INACTIVEES PAR L'ENVIRONNEMENT PATHOLOGIQUE 41

10.2.1. Absence d'activation ou de maturation efficaces dans les tumeurs : 41

10.2.2. Absence d'activation efficace lors d'une infection HIV : 41

10.3. ROLE DES PDC DANS LA LUTTE IMMUNITAIRE CONTRE LA PATHOLOGIE 42

10.3.1. Spécialistes de la lutte anti-virale : 42

10.3.2. Aide à l'activation des PDC dans les tumeurs : 42

10.3.3. Rôle de l'imiquimod : 43

11. LES LEUCEMIES A PDC (LPDC) 44

12. CONCLUSION DE LA 1ERE PARTIE 45

2EME PARTIE : RECONNAISSANCE DES PATHOGENES, ET ENSUITE. 47

13. LES TLR 47
13.1. DIFFERENTS TLR IDENTIFIES ET LEURS LIGANDS 47
13.1.1. Structure : 48
13.1.2. Expression cellulaire et tissulaire : 48
13.1.3. Reconnaissance de PAMP : 49
13.1.4. Les TLR membranaires et leurs ligands : 50
13.1.4.1. Le TLR1 50
13.1.4.2. Le TLR2 50
13.1.4.3. Le TLR4 51
13.1.4.4. Le TLR5 51
13.1.4.5. Le TLR6 51
13.1.4.6. Le TLR10 51
13.1.5. Les TLR endosomaux et leurs ligands : 52
13.1.5.1. Le TLR3 52
13.1.5.2. Les TLR7 et 8 53
13.1.5.2.1. Expression 53
13.1.5.2.2. Ligands imidazoquinolines 53
13.1.5.2.3. Ligands naturels 54
13.4.5.2.4. Ligands synthétiques ARN simple-brin et siRNA 54
13.1.5.3. Le TLR9 55
13.1.5.3.1. Expression et ligands 55
13.1.5.3.2. Trois classes d'ODN CpG 55
13.1.5.3.3. Un même TLR pour des effets différents 56
13.1.5.3.4. TLR9 humain versus murin 58
13.2. VOIES DE SIGNALISATION INTRACYTOPLASMIQUES DEPENDANTES DES TLR 58
13.2.1. Voie dépendante de MyD88 menant à l'activation du NF-κB : 59
13.2.2. Voie indépendante de MyD88 : 60
13.2.3. Voie dépendante de MyD88 menant à l'activation des IRF : 61
13.2.4. Les IRF (Interferon-Regulatory Factors), facteurs de transcription impliqués dans l'activation des gènes de l'IFN de type I : 63
13.2.4.1. L'IRF1 64
13.2.4.2. L'IRF3 et l'IRF7 64
13.2.4.3. L'IRF5 66
13.2.4.4. L'IRF4 67
13.2.4.5. L'IRF8 67
13.3. UTILISATION DES LIGANDS DES TLR EN THERAPEUTIQUE 68
13.3.1. L'imiquimod (agoniste du TLR7) : 68
13.3.2. Les ODN CpG (ligands du TLR9) : 69
13.3.2.1. Utilisation des ODN CpG seuls 69
13.3.2.2. ODN CpG en association avec des antigènes, des anticorps ou des DC 70

14. VOIES INDEPENDANTES DES TLR : 71
14.1. RECEPTEURS 71
14.2. VOIES DE SIGNALISATION 73
14.2.1. Reconnaissance de l'ARN double-brin par RIG-I et Mda5 : 74
14.2.2. Reconnaissance de l'ADN double-brin : 75
14.2.3. Reconnaissance des peptidoglycanes bactériens par les NOD : 76
15. CONCLUSION DE LA 2EME PARTIE 77

3EME PARTIE : TRAIL, INDUCTEUR D'APOPTOSE. 79

16. L'APOPTOSE 79
17. LES CASPASES, ACTRICES PRINCIPALES DE L'APOPTOSE 81
17.1. STRUCTURE 82
17.2. ACTIVATION 83
18. INDUCTION DE L'APOPTOSE ET VOIES DE SIGNALISATION 83
18.1. INDUCTION 83
18.1.2. Les évènements agissant sur l'ADN et la mitochondrie: 83
18.1.3. Les facteurs de mort et leurs récepteurs: 84
18.2. VOIES DE SIGNALISATION 85
18.2.1. Complexes de signalisation: 86
18.2.3. Voie de signalisation des caspases (ou voie "extrinsèque"): 87
18.2.3.1. FLIP 88
18.2.3.2. Les IAP 88
18.2.4. Voie de signalisation mitochondriale (ou voie "intrinsèque"): 89
18.2.4.1. Les membres de la famille Bcl-2 90
19. LE LIGAND INDUCTEUR DE MORT TRAIL 90
20. LES RECEPTEURS DE TRAIL 92
21. CELLULES EXPRIMANT TRAIL ET MODES D'INDUCTION 94
21.1. EXPRESSION CONSTITUTIVE DE TRAIL 94
21.2. INDUCTION D'EXPRESSION DE TRAIL 95
21.2.1. Induction de TRAIL par les IFN de type I et II: 96
21.2.2. Induction de TRAIL par les TLR: 97
21.2.3. Induction de TRAIL par les interleukines: 98
21.2.4. Induction de TRAIL par activation des récepteurs T et B: 98
21.2.5. Autres inducteurs de TRAIL: 100
22. ROLES PHYSIOLOGIQUES DE TRAIL 102
22.1. IMMUNITE ANTI-TUMORALE 102
22.2. IMMUNITE ANTI-VIRALE 102
22.3. HOMEOSTASIE DU SYSTEME IMMUNITAIRE 103
23. THERAPEUTIQUE 103

23.1. POURQUOI TRAIL EST UN BON CANDIDAT ? 103
23.2. LES ESSAIS CLINIQUES EN COURS 105

OBJECTIFS DU TRAVAIL 107

RESULTATS 109

PRESENTATION DE LA LIGNEE GEN2.2 : 110

ARTICLE 1 : LES LPDC EXPRIMENT DR5 ET SONT SENSIBLES A LA LYSE PAR TRAIL. 111

RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET DISCUSSION 112
1. LES PDC NORMALES N'EXPRIMENT PAS DR5 A LEUR SURFACE MALGRE LEUR STIMULATION PAR PLUSIEURS CONDITIONS D'ACTIVATIONS PHYSIOLOGIQUES 112
2. L'EXPRESSION DE DR5 SUR LES CELLULES GEN2.2 POURRAIT REPRESENTER UNE CARACTERISTIQUE DE CELLULE EFFECTRICE PLUTOT QUE TUMORALE 112
3. MALGRE LEUR EXPRESSION DE DR5, LES MODC AU REPOS SONT RESISTANTES A L'APOPTOSE INDUITE PAR TRAIL 113
4. L'IFN-α, TOUT COMME LE VIRUS DE L'*INFLUENZA*, INDUIT UNE DIMINUTION D'EXPRESSION DE DR5 A LA SURFACE DES GEN2.2 ET MODC NORMALES 114
5. DES LIGANDS DES TLR7 ET 9 INDUISENT AUSSI LA DIMINUTION D'EXPRESSION DE DR5 ET LA RESISTANCE DES GEN2.2 A L'APOPTOSE INDUITE PAR TRAIL 114
CONCLUSION 115

ARTICLE 2 : LES PDC ACTIVEES EXPRIMENT TRAIL ET DEVIENNENT TUEUSES. 116

3EME PARTIE : VOIES DE SIGNALISATION UTILISEES PAR LES DIFFERENTS LIGANDS DE TLR DANS LES PDC GEN2.2 POUR INDUIRE L'EXPRESSION DE TRAIL 117

INTRODUCTION ET OBJECTIFS 117
METHODES 117
RT-PCR QUANTITATIVE 117
KITS FACE ET TRANSAM (ACTIVE MOTIF) 118
RESULTATS 119
1. DES LIGANDS DES TLR7 ET 9 INDUISENT UNE EXPRESSION DE TRAIL PAR LES CELLULES GEN2.2, AVEC UNE CINETIQUE DIFFERENTE SELON LE LIGAND 119
2. CES LIGANDS DE TLR7 ET 9 N'INDUISENT PAS TOUS UNE SECRETION D'IFN DE TYPE I PAR LES CELLULES GEN2.2 120
3. DES ANTICORPS ANTI-IFNαβ N'INHIBENT PAS L'EXPRESSION DE TRAIL INDUITE SUR LES CELLULES GEN2.2 PAR LE R848 120

4. LE R848 N'INDUIT PAS LA TRANSCRIPTION DES GENES DE L'IFN DE TYPE I, NI CEUX DE L'IFN-λ ET DE L'IP-10 PAR LES GEN2.2 121
5. LA TRANSCRIPTION DES GENES MXA, G1P3 ET IRF9 EST INDUITE DE LA MEME MANIERE QUE CELLE DE TRAIL DANS LES CELLULES GEN2.2 122
6. LE R848, TOUT COMME LE VIRUS, INDUIT UNE PHOSPHORYLATION DE STAT1 ET STAT2 DANS LES CELLULES GEN2.2 123
7. LE VIRUS DE L'*INFLUENZA* ET R848 SONT TOUS DEUX INTERNALISES DANS DES ENDOSOMES 124
8. PLUSIEURS VOIES DE SIGNALISATION DIFFERENTES PEUVENT ETRE EMPRUNTEES APRES LA LIAISON AUX TLR125
8.1. La voie des IRF 126
8.2. La voie de la p38 MAPK 127
8.3. La voie du NF-κB 128

DISCUSSION 129

THERAPIE DES LEUCEMIES A PDC 130

VOIES DE SIGNALISATION UTILISEES PAR LES DIFFERENTS LIGANDS DE TLR DANS LES PDC GEN2.2 POUR INDUIRE L'EXPRESSION DE TRAIL 133

ROLE DES PDC DANS L'IMMUNITE ANTI-TUMORALE 139

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 142

Table des encadrés

Encadré 1. Les IKDC……..……...…22bis

Encadré 2. Les différents types d'interférons (IFN)……...……...…28bis

Encadré 3. Les voies de signalisation des IFN de type I et II.……...……...…29bis

Encadré 4. Effets pléiotropiques de l'IFN de type I (1ère partie)……...…30bis

Encadré 5. Effets pléiotropiques de l'IFN de type I (2ème partie)…..…….……...31bis

Encadré 6. Le virus *Influenza*: structure……51bis

Encadré 7. Le virus *Influenza*: cycle de réplication...……...…52bis

Encadré 8. Reconnaissance des virus par les PRR.……...53bis

Encadré 9. Le NF-κB…….……...…59bis

Encadré 10. Promoteur du gène de l'IFN-β (1ère partie)…….……...…64bis

Encadré 11. Promoteur du gène de l'IFN-β (2ème partie)……...……65bis

Encadré 12. Les différentes formes de mort cellulaire..……78bis

Encadré 13. Nécrose *vs* apoptose……...……...…79bis

Encadré 14. Nomenclature des récepteurs et ligands de la famille du TNF..……...……83bis

Encadré 15. Quelques méthodes de mesure de l'apoptose.……...…88bis

Table des figures et tableaux

Figure 01. Schéma classique de l'ontogénie des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes à partir des cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$……..……16

Figure 02. Morphologie des PDC en microscopie électronique à balayage……...……22

Figure 03. Expression différentielle des TLR et activation consécutive pour les MDC et PDC……...27

Figure 04. Boucle d'amplification de l'IFN de type I……31

Figure 05. Plasticité de la réponse immune adaptative induite par les PDC humaines……..37

Figure 06. Les PDC au cœur des réponses immunes innée et adaptative……..45

Figure 07. Structure des TLR……48

Figure 08. Exemple de structures reconnues par le TLR7……53

Figure 09. Activation de réponses différentes dans la PDC par l'ajout de différents types de CpG……57

Figure 10. Voies de signalisation induites par les TLR…….…58

Figure 11. Voies de signalisation induites par le TLR9……61

Figure 12. Les deux stades (précoce et tardif) de la boucle de rétrocontrôle positive induisant la production d'IFN de type I après stimulation par un virus……..…..64

Figure 13. Voies de signalisation induites par le TLR9…….……66

Figure 14. Voies de signalisation induites par le TLR9…….……67

Figure 15. Voies de reconnaissance de l'ARN et de l'ADN double-brin indépendantes des TLR……...73

Figure 16. Voies de signalisation en aval des NOD……...……77

Figure 17. Activation séquentielle des caspases……82

Figure 18. Quelques couples ligand/récepteur de la famille du TNF……84

Figure 19. Les deux voies de signalisation de l'apoptose……...85

Figure 20. Les deux types de complexes de signalisation et les voies de signalisation intracytoplasmiques menant à l'apoptose ou à la survie……...86

Figure 21. Vue de côté du complexe TRAIL-DR5……91

Figure 22. Diagramme en rubans du trimère TRAIL……91

Figure 23. Modèle de liaison de TRAIL au DR5 grâce au PLAD……92

Figure 24. Les quatre récepteurs membranaires à TRAIL identifiés……93

Figure 25. Différentes voies pouvant mener à la transcription du gène *TRAIL*……...101

Figure R1. Expression de DR5 sur les cellules de la lignée GEN2.2, les moDC et les cellules de la lignée A549 après 24h d'incubation avec ou sans virus de l'*influenza*……..113

Figure R2. Expression de DR5 et apoptose spécifique des GEN2.2 au repos ou exposées pendant 24h à divers agents…….115

Figure R3. Cinétiques d'expression de TRAIL à la surface des GEN2.2 après incubation avec le virus de l'*influenza*, R848, CpG A ou CpG B…….119

Figure R4. Cinétique de sécrétion d'IFN-α par les GEN2.2 induite par le virus de l'*influenza*, R848, le CpG de type A ou le CpG de type B……..120

Figure R5. Inhibition de TRAIL par les anticorps anti-IFN-α et anti-IFN-β……..121

Figure R6. Expression de l'ARNm de l'IFN-α1, -α2, -β1, -ω1 et de l'IP10 par les GEN2.2 activées……122

Figure R7. Expression des ARNm de MXA, G1P3, IRF9 et TRAIL par les GEN2.2 activées……..123

Figure R8. Mise en évidence par Western-Blot de la cinétique de phosphorylation de STAT1 (pY701) et STAT2 (pY690) dans les GEN2.2 activées……124

Figure R9. Rôle de l'acidification endosomale sur l'activation des GEN2.2 par les ligands des TLR……124

Figure R10. Expression des ARNm d'IRF3, 5 et 7 dans la lignée GEN2.2, des moDC et des PBL..…….126

Figure R11. Visualisation de l'IRF7 dans les GEN2.2 en microscopie confocale……..126

Figure R12. Dosage de la p38 MAPK phosphorylée et totale dans les cellules GEN2.2 activées……..…127

Figure R13. Détection de différentes molécules impliquées dans l'activation du NF-κB par Western-Blot dans les cellules GEN2.2, des PBL et la lignée de cellules Jurkat……128

Figure D1. Schéma récapitulif des molécules potentiellement impliquées dans la phosphorylation de STAT1 après activation des récepteurs de l'IFN de type I et de l'IFN de type II……...…136

Tableau 01. Schéma représentatif du développement des PDC immatures à partir du progéniteur précoce $CD34^+$……..……17

Tableau 02. Phénotypage des DC humaines du sang périphérique……20

Tableau 03. Répartition de l'expression des TLR humains, et leurs ligands…….……49

Tableau 04. Produits à base d'agonistes de TLR développés par différentes compagnies et leurs phases cliniques de développement pour diverses thérapies anti-tumorales……..68

Tableau 05. Sélection de compagnies ciblant les récepteurs de TRAIL dans le cancer…….…106

Tableau R1. Sensibilité des moDC et des cellules de la lignée GEN2.2 au repos à l'apoptose induite par TRAIL……...113

Tableau R2. Expression de DR5 sur des moDC et les cellules GEN2.2 activées ou non……...114

Abréviations

A

AAF : *α-IFN activated factor*
Ac : acétylé
ADAR1 : désaminase à adenosine spécifique de l'ARN 1
AICD : *activation-induced cell death*
AIF : *apoptosis-inducing factor*
α-GalCer : α-galactosylcéramide
ALPS : *autoimmune lymphoproliferative syndrome*
AP-1 : *activator protein-1*
Apaf-1 : *Apoptotic protease activating factor-1*
APC : *antigen presenting cells* = cellules présentatrices d'antigènes
ATF2 : *activating transcription factor 2*

B

BAF : *BRM-associated factor*
BIR : *baculoviral IAP repeat*
BRM : *Brahma-related gene*

C

CAD : *caspase activated deoxyribonuclease*
CARD : *caspase recruitment domain*
Cardif : *CARD adaptor inducing IFN-β*
CBP : *CREB-binding protein*
CBV : virus Coxsackie B
CLIC4 : *chloride intracellular channel 4*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : cytomégalovirus
CpG : cytosine liée à une guanine par un pont phosphate
CpG ODN : oligodéoxynucléotide synthétique avec des motifs CpG non méthylés
CREB : *cyclic-AMP-responsive-element-binding protein*
CTL : lymphocytes T cytotoxiques
CXCL10 : *CXC-chemokine ligand 10*
CYPB : cyclophiline B

D

DC : *dendritic cells* = cellules dendritiques
DcR : *decoy receptor* = récepteur leurre
DD : *death domain*
DED : *death effector domain*
$\Delta\psi_m$: potentiel transmembranaire mitochondrial
DIABLO : *direct IAP-binding protein with low pI*
DioC6(3) : *3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide*
DISC : *death-inducing signaling complex*
DR : *death receptor*

E

eIF : *eukaryotic initiation factor*
EMCV : *encephalomyocarditis virus*
EndoG : endonucléase G

F

FADD : *Fas-associated protein with the death domain*
FKHR : *forkhead*
FLICE : *FADD-like interleukin-1 β-converting enzyme-like protease*
FLIP : *FLICE inhibitory protein*
Flt3L : *fms-like tyrosine kinase 3 ligand*

G

GAS : *γ-interferon activated site*
GBP-1 : protéine de liaison à la guanylate 1
GCN5 : *general-control-of-amino-acid synthesis 5*
GM-CSF : *granulocyte macrophage-colony-stimulating factor*
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GR : *ligand-bound glucocorticoid receptor*
GTPase : guanosine triphosphatase

H

HA : hémagglutinine

HAT : histone acetyl transférase
HCMV : *human cytomegalovirus*
HDAC : histones déacétylases
HEV : *high endothelial venules*
HIV : *human immunodeficiency virus*
HMGB1 : *high mobility group box 1*
HPV : *human papillomavirus*
HSC : *hematopoietic stem cells* = cellules souches hématopoïétiques
HSV: *herpes simplex virus*
hTLR7/8 : TLR7/8 humain
HTLV: *human T-cell leukemia virus*
HTRA2 : *high-temperature-requirement protein A2*

I

IAP : *inhibitor of apoptosis protein*
ICAM 1 : *intercellular adhesion molecule 1*
ICE : enzyme de conversion de l'IL-1β
Id : *inhibitor of DNA-binding*
IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase
iE-DAP : acide γ-D-glutamyl-*meso*-diaminopimelique
IFIT1 : *IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 1*
IκB : *inhibitor of NF-κB*
IKDC : *interferon-producing Killer Dendritic Cells*
IKK : *IκB kinase*
IKK*i* : *inducible IKK*
IL : interleukine
ILP2 : *IAP-like protein-2*
ILT : *immunoglobulin like transcripts*
IPC : *interferon-producing cells* = cellules productrices d'interféron
IPS-1 : *IFN-β stimulator 1*
IRAK : *IL-1 receptor-associated kinase*
IRF : *interferon-regulatory factors*
ISG : *IFN-stimulated genes*
ISGF3 : *IFN-stimulated gene factor 3*
ISRE : *IFN-stimulated response element*
ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activatory motif*
ITIM : *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*

J

JNK : *JUN N-terminal kinase*

K

kDa : kilo Dalton
KLH : *keyhole limpet hemocyanin*

L

LAMP-1 : *lysosome-associated membrane protein 1*
LBP : *LPS binding protein*
LIN^{neg} : *lineage*- négatif
LP : lipoprotéine
LPDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes leucémiques
LPS : lipopolysaccharide
LRR : *leucine-rich repeat*
LTA : acide lipotéichoïque

M

M1 : protéines matricielles
M2 : canal membranaire
MAL : *MyD88 adaptor-like*
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
MAVS : *mitochondrial antiviral signaling protein*
MCMV : *murine cytomegalovirus*
MCP : *monocyte chemoattractant protein*
M-CSF : *macrophage-colony-stimulating factor*
Mda5 : *melanoma-differentiation-associated gene 5*
MDC : *myeloid dendritic cells* = cellules dendritiques myéloïdes
MDP : muramyl dipeptide
MEF : *mouse embryonic fibroblasts*
MEKK : *MAP-kinase kinase*

MGG : May Grünwald Giemsa

ML-IAP : *melanoma IAP*

MMTV : *mouse mammary tumor virus*

MoDC : cellules dendritiques myéloïdes dérivées de monocytes

mTLR7/8 : TLR7/8 murin

MV : *measle virus*

Mx : myxovirus

MyD88 : *myeloid differentiation primary response gene 88*

N

N : neuraminidase

NAIP : *neuronal apoptosis-inhibitory protein*

NAK : *NF-κB-activating kinase*

NALP : *NACHT-, LRR- and pyrin-domain-containing proteins*

NAP1 : *NAK-associated protein 1*

NDV: *Newcastle disease virus*

NEP : protéines d'export nucléaire

NF-κB : facteur nucléaire κB

NGFR : *nerve growth factor receptor*

NIK : *NF-κB-inducing kinase*

NLR : *NOD-like receptor*

NLS : signal de localisation nucléaire

NOD : *nucleotide-binding oligomerization domain*

NP : nucléoprotéine

NS1 : protéine non-structurale 1

O

OAS : oligoadénylate synthétase

OPG : *osteoprotegerine*

Opn-i : ostéopontine intracellulaire

P

PA : polymerase acide

PAMP : *pathogen-associated molecular patterns*

PARP-1 : *poly ADP ribose polymerase-1*

PB : polymérase basique

PBMC: *peripheral blood mononuclear cells* = cellules mononucléées du sang périphérique

PCD : *programed cell death*

PDC : *plasmacytoid dendritic cells* = cellules dendritiques plasmacytoïdes

pDC : précurseur de DC

PHA : *phytohemagglutinin*

PI3K : *phosphatidylinositol 3-kinase*

PIN1 : *cis-trans-peptidylpropyl isomerase, NIMA-interacting 1*

PIP2 : *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*

PKC : protéine kinase C

PKR : *double stranded RNA-dependent proteine kinase*

PLAD : *pre-ligand assembly domain*

PMA : *phorbol 12-myristate 13-acetate*

PML : protéine de leucémie promyélocytique

Poly(I :C) : polyinosine – acide polycytidylique

PRD : *positive regulatory domains*

PRR : *pattern recognition receptors*

PS : phosphatidylsérines

PT : pores de transition de perméabilité

PTK : protéine tyrosine kinase

PTPC : *permeability transition pore complex*

R

RAGE : *receptor for advanced glycation end products*

RANKL : *receptor activator of NF-κB ligand*

RANTES : *regulated-upon-activation normal T cell*

RAR : récepteur à l'acide rétinoïque

RHD : *REL-homology domain*

RHIM : motif d'interaction homotypique RIP

RIG-I : *retinoic acid-inducible gene I*

RIP1 : *receptor-interacting protein-1*

RLR : *RIG-like receptors*

RNase L : ribonucléase L

RNP : ribonucléoprotéine

RSV : *respiratory syncitial virus*

rTRAIL : TRAIL recombinant

RXR : récepteur de la Rétinoïde-X

S

SARM : *sterile alpha and HEAT/Armadillo motif*

SDF-1 : *stromal cell-derived factor 1*

SeV : *Sendai virus*

SIKE : *suppressor of IκB-kinase ε*

siRNA : *short interfering RNA*

SLE : lupus érythémateux systémique

SMAC : *second mitochondria-derived activator of caspases*

SnRNP : *small nuclear ribonucleoprotein particles*

SPI : inhibiteur de serine protéase

STAT : *signal transducer and activator of transcription 1*

T

T2K : *TRAF-2-associated kinase*

TAK1 : *TGF-β-activated kinase 1*

TANK : *TRAF family member-associated NF-κB activator*

tBid : Bid tronqué

TBK1 : *TANK-binding kinase 1*

TcR : récepteur des cellules T

TdT : *terminal deoxynucleotidyl transferase*

TfR : *transferring receptor*

T_H : T *helper*

TIR : *Toll-IL-1 receptor*

TIRAP : *TIR-domain-containing adaptor protein*

TLR : *toll-like receptors*

TNF : *tumor necrosis factor*

TPA : *12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate*

TRAF : *TNF receptor-associated factor*

TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

TRAM : *Trif-related adaptor molecule*

T_{reg} : cellules T régulatrices

TRIF : *TIR domain containing adaptor-inducing IFN*

TUNEL : *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling method*

U

USP : *ultraspiracle*

V

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VISA : *virus-induced signaling adaptor*

VRE : *virus-responsive elements*

VSV : *vesicular stomatitis virus*

X

XIAP : *X-linked IAP*

Introduction bibliographique

1ère partie : La place des PDC au sein du système immunitaire.

1. Rôle général des cellules dendritiques myéloïdes et les différents types de cellules dendritiques

Les fonctions des cellules dendritiques myéloïdes (*myeloid dendritic cells* = MDC) ont été abondamment décrites, alors que des incertitudes demeurent en ce qui concerne les fonctions des cellules dendritiques plasmacytoïdes (*plasmacytoid dendritic cells* = PDC), plus récemment identifiées (Grouard et al. 1997).

Les MDC ont initialement été découvertes en 1868 dans l'épiderme (Langerhans 1868), puis furent identifiées en 1973 dans les organes lymphoïdes secondaires (Steinman and Cohn 1973). Les MDC sont des cellules présentatrices d'antigènes (*antigen presenting cells* = APC) professionnelles retrouvées dans presque tous les tissus périphériques, tout comme dans les organes lymphoïdes primaires (thymus et moelle osseuse) et secondaires (ganglions lymphatiques, plaques de Peyer et rate).

Leur développement passe par trois étapes. Les **progéniteurs de MDC** dans la moelle osseuse vont ensuite migrer vers les tissus où ils résident à l'état de **MDC immatures** possédant de grandes capacités phagocytaires et endocytaires, permettant la capture de l'antigène. En absence d'inflammation, les MDC prélèvent continuellement des antigènes du Soi mais restent phénotypiquement dans un état immature non-activé. Dans ce contexte, un engagement du récepteur des cellules T pourrait aboutir à l'avortement de la prolifération, à l'anergie des cellules T réactives ou à l'induction d'un phénotype de cellules T régulatrices (T_{reg}). Ce mécanisme est, au moins en partie, responsable de l'établissement de la tolérance périphérique (Steinman et al. 2003). Elles peuvent également reconnaître des antigènes étrangers. En effet, les MDC sont équipées de nombreux récepteurs qui détectent les signaux de "danger" dans l'environnement alentour (Matzinger 2002). Les signaux associés à une infection en cours, tels les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), qui se lient sur des *pattern recognition receptors* (PRR) comme les *toll-like receptors* (TLR), les cytokines pro-inflammatoires ou les dérivés de dommages tissulaires les induisent à devenir des MDC immunogènes matures (changements phénotypiques). Les **MDC matures**, présentes dans les organes lymphoïdes secondaires, expriment de hauts niveaux de molécules de costimulation permettant la présentation de l'antigène et le déclenchement de la prolifération des lymphocytes T naïfs et mémoires (Granucci et al. 2005).

Une des fonctions les mieux décrites des MDC est la capture de l'antigène à la périphérie pour l'apprêter et le transporter vers les organes lymphoïdes secondaires. Elles présentent alors l'antigène aux lymphocytes T naïfs, qui recirculent continuellement à travers ces organes, sous forme de peptide associé aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I ou II, afin de développer des réponses immunes adéquates (Banchereau et al. 2000; Guermonprez et al. 2002). Selon le contexte de "danger" représenté par l'environnement cytokinique et les récepteurs engagés, la réponse immunitaire est supprimée ou activée (Banchereau and Steinman 1998; Steinman et al. 2003). Les cellules dendritiques (*dendritic cells* = DC) sont des APC remarquables car ce sont les seules capables d'induire des réponses immunes primaires, permettant ainsi l'établissement de la mémoire immunologique (Hart 1997; Banchereau and Steinman 1998).

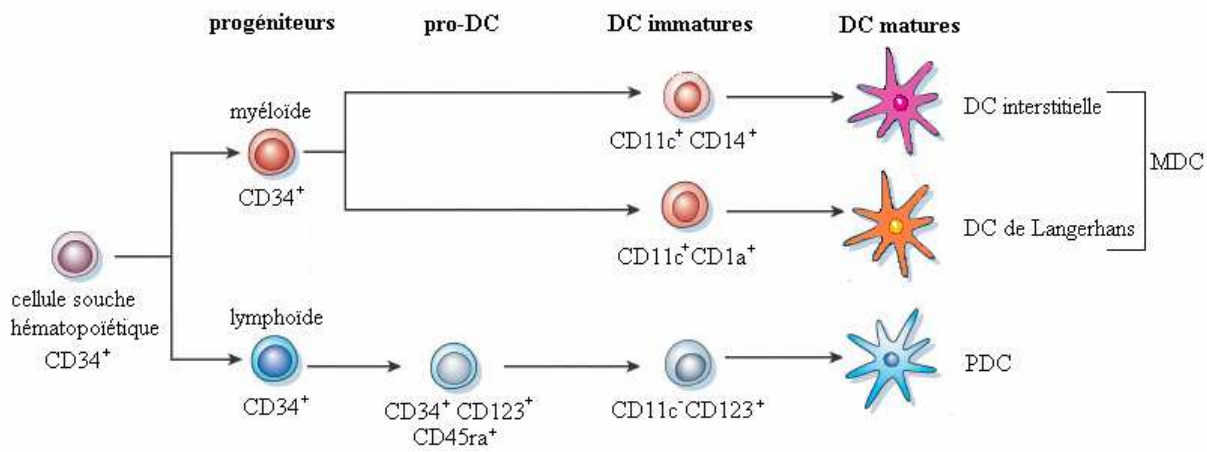


Figure 01. Schéma classique de l'ontogénie des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes à partir des cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$**.**

Il existe différentes sous-populations de DC qui diffèrent dans leur ontogénie, leur expression de molécules de surface et leur fonction biologique. Chez l'homme, essentiellement trois types de DC immatures peuvent être distingués, tous trois issus des cellules souches hématopoïétiques (*hematopoietic stem cells* = HSC) $CD34^+$ (voir figure 01). Le progéniteur myéloïde est à l'origine des cellules de Langerhans, présentes dans la peau et l'épithélium des muqueuses, et des DC interstitielles, présentes dans les tissus, dont le derme de la peau. Ces cellules sont également appelées MDC immatures et sont de phénotype *lineage*-négatives (LIN^{neg} = $CD3^-$, $CD16^-$, $CD19^-$, $CD14^-$, $CD56^-$), $CD4^+$, $HLA\text{-}DR^+$, $CD11c^+$, $CD116^+$, $CD13^+$. Quant au progéniteur lymphoïde, il est à l'origine des cellules dendritiques lymphoïdes ou plasmacytoïdes (PDC), de phénotype LIN^{neg}, $CD4^+$, $HLA\text{-}DR^+$, $BDCA\text{-}2^+$, $BDCA\text{-}4^+$, $CD123^{+fort}$ (Briere et al. 2002). A partir du progéniteur pluripotent médullaire

lymphoïde commun, toutes les cellules de la lignée lymphoïde pourraient se différencier : lymphocytes B, T, et NK, et les PDC, mais pas les autres cellules hématopoïétiques (érythroïdes, mégacaryocytaires et myéloïdes). En ce qui concerne la différenciation des PDC, ce **progéniteur** passerait par un stade **précoce**, puis **tardif**, avant de passer par un stade **pro-PDC**, correspondant au précurseur immédiat des **PDC immatures**. Au stade pro-DC, les cellules possèdent déjà une morphologie plasmacytoïde et sont identifiées dans le sang placentaire, le foie et la moelle osseuse fœtale et en très faible quantité dans le sang (Blom et al. 2000). Chaque stade de différenciation exprime des marqueurs spécifiques et présente des capacités proliférative et de production d'interféron (IFN)-α différentes (voir tableau 01).

	progéniteur précoce	progéniteur tardif	pro-PDC	PDC immature
CD34	++	++	+	+/-
CD45RA	-	+	++	++
CD4	+	+	++	++
CD123	+	+	++	++
Capacité de production d'IFN-α	-	-/+	+++	+++
Capacité proliférative	+++	++	+	--

Tableau 01. Schéma représentatif du développement des PDC immatures à partir du progéniteur précoce $CD34^+$. D'après (Blom et al. 2000).

2. Découverte des PDC

2.1. Historique

Les leucocytes du sang périphérique humain sont connus pour être des producteurs efficaces d'IFN de type I après exposition aux virus. En 1978, Trinchieri et ses collègues (Trinchieri et al. 1978) montrèrent que l'IFN de type I est un agent puissant pour augmenter la cytotoxicité induite par les NK et que pendant l'exposition des leucocytes du sang périphérique aux virus ou aux cellules infectées par le virus, seule une petite partie des cellules est responsable de la production de la plupart de l'IFN de type I inducteur d'activité antivirale. Ces cellules productrices d'IFN de type I furent identifiées en tant que cellules non-T, non-B, non-NK, non-monocytaires, exprimant des récepteurs Fcγ de faible affinité et des antigènes du CMH de classe II (Trinchieri et al. 1978). Bien que les cellules productrices d'IFN (*Interferon-producting cells* = IPC) soient des cellules mononucléées positives pour le CMH de classe II, négatives pour les marqueurs de *lineage*, non-adhérentes et rares (Perussia

et al. 1985) elles ont également été clairement distinguées des DC classiques du sang périphérique (Chehimi et al. 1989; Feldman and Fitzgerald-Bocarsly 1990).

En 1958, les pathologistes K. Lennert et W. Remmele (Lennert and Remmele 1958) rapportèrent pour la première fois une observation histologique de cellules avec une morphologie de plasmocytes mais sans marqueurs de cellules B et de plasmocytes, abondantes dans les zones de cellules T des tissus lymphoïdes humains. Ces plasmocytes ont été nommés "plasmocytes associés aux T". En 1983, A.C. Feller et al. (Feller et al. 1983) trouvèrent que les plasmocytes associés aux T exprimaient le CD4 (OKT4), un marqueur des cellules T *helper*, mais qu'elles n'exprimaient pas d'antigène ou d'immunoglobuline de cellule B. Les plasmocytes associés aux T furent renommés "cellules T plasmacytoïdes".

Le nom de "cellules T plasmacytoïdes" fut ensuite remis en question par le Dr. F. Facchetti (Facchetti et al. 1988), qui trouva que ces cellules n'exprimaient pas le composant CD3 du récepteur des cellules T (TcR), mais qu'elles exprimaient des molécules du CMH de classe II et des antigènes myéloïdes. Il suggéra donc que les cellules T plasmacytoïdes soient renommées "monocytes plasmacytoïdes" (Facchetti et al. 1988).

En 1993, deux sous-populations de cellules $CD4^+CD3^-$ furent identifiées par l'équipe de Yong-Jun Liu dans les amygdales humaines (mais les résultats furent publiés ultérieurement) : (a) des cellules dendritiques $CD4^+CD3^-CD11c^+$ dans les centres germinatifs, qui pouvaient activer/co-activer les cellules T naïves et les cellules B des centres germinatifs (Dubois et al. 1999) et (b) des cellules $CD4^+CD3^-CD11c^-$, localisées dans les zones riches en cellules T autour des *high endothelial venules* (HEV), qui présentaient une morphologie lymphoïde-plasmacytoïde (Grouard et al. 1997).

En 1994, O'Doherty et al. (O'Doherty et al. 1994) identifièrent dans le sang périphérique humain une sous-population de DC immatures $CD11c^-$ avec une expression faible de CMH de classe II et une capacité moindre de stimulation des cellules T. Après culture dans un milieu conditionné par des monocytes, ces cellules augmentaient leur expression de CMH de classe II et acquéraient une morphologie plus irrégulière semblable aux cellules dendritiques.

Des photographies en microscopie électronique réalisées en 1996 par Liu et al. révélèrent une morphologie de plasmocytes pour les cellules $CD4^+CD3^-CD11c^-$ qu'ils avaient précédemment identifiées. Ces pré-DC pourraient donc être identiques aux monocytes plasmacytoïdes décrits par le Dr. Facchetti et aux DC du sang DR^+CD11c^- décrites par O'Doherty et al. (O'Doherty et al. 1994).

Grouard et al. (Grouard et al. 1997) isolèrent par la suite des cellules $CD11c^-$ $CD4^+CD45RA^+$ des amygdales et montrèrent qu'elles avaient des caractéristiques presque identiques à celles de la sous-population de DC $CD11c^-$ immatures du sang périphérique et correspondaient aux "cellules T plasmacytoïdes" ou aux "monocytes" décrits dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules mouraient rapidement en culture, mais en présence d'interleukine (IL)-3 et de CD40L, elles se différenciaient en cellules avec une morphologie de DC interdigitantes matures (Grouard et al. 1997). L'effet de survie de l'IL-3 sur ces précurseurs de DC "plasmacytoïdes" dépend de leur haute expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-3 (IL-3Rα ou CD123). Sur la base de la capacité des cellules plasmacytoïdes à induire une différenciation des cellules T *helper* de type 2 (T_H2) en réponse à certains stimuli, le nom de précurseur de DC de type 2 (pDC2) a été proposé. Les précurseurs des DC myéloïdes, qui favorisent une réponse T_H1, furent nommées pDC1 (Rissoan et al. 1999). Cependant, à cause de la flexibilité des DC conventionnelles et plasmacytoïdes pour donner naissance à des réponses T_H1 ou T_H2, le terme descriptif "DC plasmacytoïdes" (*plasmacytoid dendritic cells* = PDC) est maintenant préféré.

En 1999, Siegal et al. (Siegal et al. 1999) et Cella et al. (Cella et al. 1999) identifièrent définitivement les PDC du sang périphérique et des organes lymphoïdes secondaires comme étant identiques aux cellules productrices d'IFN responsables de la production d'IFN de type I dans le sang périphérique en réponse à la plupart des virus.

2.2. Origine et phénotype des PDC humaines

Chez l'homme, les MDC et PDC semblent issues de lignées distinctes (myéloïde et lymphoïde, respectivement). De nombreuses évidences suggèrent que les PDC sont d'origine lymphoïde.

Comme les MDC, les PDC humaines sont LIN^{neg} et positives pour CD4 et HLA-DR, mais bien qu'elles aient été nommées "monocytes plasmacytoïdes" à cause de leur expression de CMH de classe II et d'antigènes myéloïdes comme le CD68, elles n'expriment pas la plupart des antigènes exprimés sur les cellules myéloïdes, comme le CD11b, CD11c, le CD13 ou le CD14 (voir tableau 02), ni les récepteurs du mannose (Ito et al. 1999; Robinson et al. 1999). Au contraire, elles expriment les marqueurs lymphoïdes CD2, CD5 et CD7 tout comme les transcrits codant pour la chaîne pré-T α (Spits et al. 2000), λ-like, V pré-B (Rissoan et al. 2002), caractéristiques des lymphocytes B et T. Les réarrangements du gène IgH D-J peuvent également être trouvés dans les PDC, mais pas dans les MDC (Rissoan et al.

Phénotype	MDC immatures	PDC immatures
Marqueurs myéloïdes		
CD11b	+	-
CD11c	+	-
CD13	+	-
CD14	-	-
CD33	+	+/-
Marqueurs lymphoïdes		
Pré-Tα	-	+
Ig1-like 14.1	-	+
Spi-B	-	+
Pattern Recognition Receptors		
TLR1	+	+
TLR2	+	-
TLR3	++	-
TLR4	+	-
TLR5	+	-
TLR6	+	+
TLR7	-	++
TLR8	++	-
TLR9	-	++
TLR10	+	+
Mannose R	+/-	-
BDCA2	-	+
CD1a, b, c, d	+/-	-
Autres antigènes exprimés différentiellement		
CD4	+	++
CD45RA	-	+
CD45RO	+	-
IL-3R	+	+++
GM-CSFR	++	+
BDCA3	+	-
BDCA4	-	+
ILT1	+	-
ILT3	-	+
Fonction		
Production d'IFN-α/β	+	++++
Production d'IL-12	++	-
Phagocytose	++	-

Tableau 02. Phénotypage des DC humaines du sang périphérique. D'après (Liu 2005). Le CD33 a été décrit sur les PDC par (Garnache-Ottou et al. 2005).

2002; Corcoran et al. 2003). De plus, les PDC présentent une faible activité phagocytaire et ne se différencient pas en macrophages après culture avec le GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony-stimulating factor*) et le M-CSF (*macrophage-colony-stimulating factor*) (Grouard et al. 1997). Elles expriment aussi le facteur de transcription Spi-B (retrouvé dans les cellules T et B en développement, mais ni dans les monocytes, ni dans les cellules T matures), qui serait impliqué dans le contrôle de leur différenciation (Schotte et al. 2003). Finalement, le développement à partir de la cellule souche $CD34^+$ des PDC, des cellules T et B mais pas celui des MDC, est bloqué par l'expression ectopique de Id2 ou Id3 (*inhibitor of DNA-binding*) (Spits et al. 2000), des inhibiteurs de facteurs de transcription contrôlant le

développement de la lignée lymphoïde, suggérant également une appartenance des PDC à la lignée lymphoïde.

Les PDC immatures sont retrouvées au niveau sanguin, avec un phénotype lin^-, $CD4^+$, $HLA\text{-}DR^+$, $CD123^{+fort}$ (IL-3Rα), $CD11c^-$, $CD1a^-$, $CD45RA^+$, $ILT1^-$, $ILT3^+$, $BDCA\text{-}2^+$, $BDCA\text{-}4^+$ (Dzionek et al. 2000). Contrairement aux PDC, les MDC sont $ILT1^+ILT3^-$ (Banchereau et al. 2000). ILT1 et ILT3 appartiennent à la famille de récepteurs inhibiteurs ou activateurs ILT (*immunoglobulin like transcripts* / LIR = *leucocyte immunoglobulin-like receptors*), de la superfamille des immunoglobulines, impliqués dans les mécanismes de surveillance immune. ILT3 appartient au groupe de récepteurs inhibiteurs possédant des motifs ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) intracytoplasmiques, alors que ILT1 appartient au groupe de récepteurs activateurs possédant des motifs ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif*) intracytoplasmiques. BDCA-2 est une lectine C de type II exprimée par les PDC et qui jouerait un rôle dans l'internalisation des antigènes. Ce marqueur spécifique est rapidement perdu sur les PDC matures en culture (Dzionek et al. 2001). BDCA-4 (ou Neuropilin-1) est un récepteur multifonctionnel initialement décrit dans le système nerveux qui appartient à la classe des sémaphorines 3. Il est exprimé sur les cellules endothéliales et tumorales comme récepteur pour différents membres de facteurs de croissance de la famille VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) et joue un rôle dans l'angiogénèse. De plus, il a été montré récemment qu'il était impliqué dans la synapse DC / lymphocytes T durant la réponse primaire par interaction homophilique (Tordjman et al. 2002). BDCA-4 est spécifiquement exprimé sur les PDC dans la moelle osseuse et le sang. Dans les ganglions, il peut être exprimé sur des fractions lymphocytaires T $CD4^+$ (Dzionek et al. 2002). En culture, BDCA-4 peut être induit sur les monocytes, les MDC générées à partir de monocytes (MoDC) et une fraction de MDC générées à partir de $CD34^+$ (Dzionek et al. 2000), perdant ainsi sa spécificité vis-à-vis des PDC. En revanche, l'expression de BDCA-4 sur les PDC n'est pas perdue en culture comme c'est le cas pour BDCA-2.

Deux autres marqueurs identifiés par Dzionek permettent de différencier les PDC circulantes : contrairement aux MDC, les PDC n'expriment pas BDCA-1 (CD1c) ni BDCA-3 (Dzionek et al. 2000). Les PDC expriment aussi des molécules d'adhérence comme CD11a, CD18, CD44, CD49e, CD31 (PECAM-1) et CD54 (Grouard et al. 1997). Elles n'expriment pas à l'état basal la molécule de costimulation CD80, mais expriment faiblement CD86 (Grouard et al. 1997). Par ailleurs, le transcrit de granzyme B est fortement exprimé dans les PDC et faiblement dans les monocytes et MoDC et a été détecté par cytométrie de flux au

niveau intracytoplasmique dans les PDC, en particulier après activation (Rissoan et al. 2002). En revanche, il n'a pas été observé de transcrits de la perforine.

2.3. Phénotype des PDC murines

Tout comme les PDC humaines, les PDC murines isolées du sang ou développées en culture n'expriment pas les antigènes de surface liés aux cellules T (CD3, CD8β ou le TcR), ni les antigènes liés aux cellules B (CD19, CD20 ou les anticorps de surface), ni les antigènes liés au phénotype myéloïde (CD14 et CD11b) (Hochrein et al. 2002). Il existe peu de différences entre les PDC des deux espèces, mais elles sont de taille. En effet, les PDC humaines expriment CD123, à la différence de leurs homologues murines. D'autre part, les PDC murines expriment CD45R/B220, Gr-1, CD11c et CD8α, alors que les PDC humaines n'expriment pas ces marqueurs. L'antigène CD45R/B220 est largement exprimé par les cellules B murines et peut aussi être retrouvé sur une petite fraction de cellules NK et de DC dérivées du foie. L'antigène Ly-6G (Gr-1) est traditionnellement un marqueur de granulocytes et de monocytes. Sur les PDC murines, son expression est dépendante de la souche. L'expression de CD8 ne peut pas vraiment être considérée comme un marqueur de "DC dérivée du lignage lymphoïde" car l'expression de CD8α semble être un marqueur de maturation ou d'activation pour les PDC murines, mais il se pourrait que les précurseurs myéloïdes soient également capables de donner naissance à des DC $CD8^+$.

2.4. Morphologie des PDC humaines



Figure 02. Morphologie des PDC en microscopie électronique à balayage grossissement x 7000 (à gauche) et à transmission grossissement x 3000 au repos (au centre) et après 6 jours de culture en IL-3 et CD40L (à droite). D'après (Grouard et al. 1997; Colonna et al. 2004).

En microscopie optique, sur lames en coloration MGG (*May-Grünwald Giemsa*), les PDC humaines immatures ressemblent à des plasmocytes. Elles sont légèrement plus petites

Encadré 1: Les IKDC

Les IKDC (*Interferon-producing Killer Dendritic Cells*) ont été décrites très récemment chez la souris dans deux articles (Chan et al. 2006; Taieb et al. 2006) comme étant un nouveau type de cellules du système immunitaire, partageant plusieurs caractéristiques des DC et des cellules NK. Elles possèdent des activités cytotoxique et anti-tumorale, produisent des interférons et développent une capacité de présentation de l'antigène.

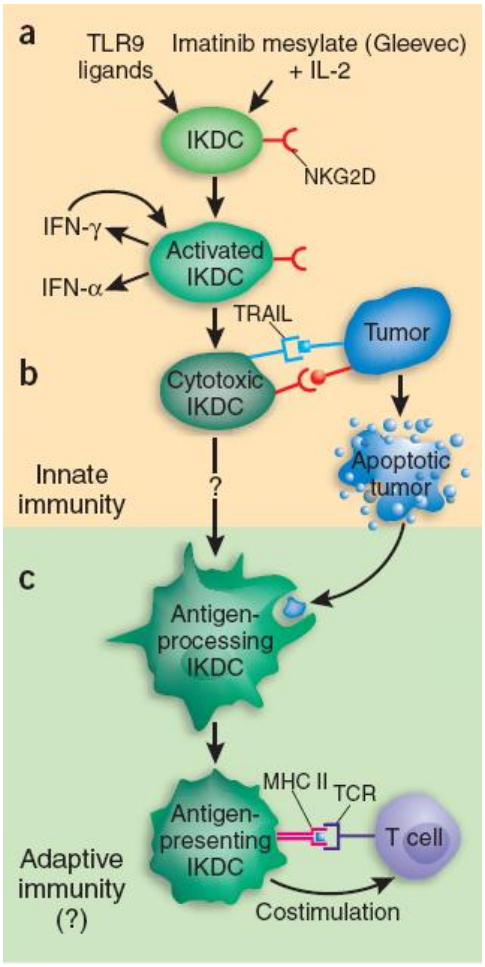


Figure 1. Les multiples fonctions des IKDC. D'après (Shortman and Villadangos 2006).

Caractéristiques communes avec les NK :
- expression de CD49b, NK1.1 et NKG2D.
- production de la cytokine inflammatoire IFN-γ en réponse aux cytokines inductrices IL-12 et IL-18.
- après activation, cytotoxicité envers des cellules cibles, dépourvues de molécules du CMH, particulières, avec reconnaissance par l'intermédiaire de récepteurs de type NK comme NKG2D.

Caractéristiques communes avec les PDC :
- expression modérée de CD11c (marqueur de PDC et MDC).
- expression de B220 (marqueur des PDC et des cellules B).
- production d'IFN-α après activation par les ligands du TLR9 (CpG), mais plus faible et variable que pour les PDC.

Caractéristiques communes avec les MDC :
- après activation, acquisition d'une grande quantité de molécules du CMH de classe II et présentation de l'antigène aux cellules T.

Initiation de l'immunité à cellules T ? (Chan et al. 2006) **:**
Les IKDC activées peuvent présenter efficacement un peptide ovalbumine à des cellules T transgéniques reconnaissant spécifiquement l'ovalbumine, mais ce peptide pourrait se lier directement aux molécules du CMH de classe II de surface et n'aurait donc pas besoin de l'apprêtement intracellulaire. Au contraire, les IKDC sont beaucoup moins efficaces pour la présentation d'ovalbumine intacte, qui nécessiterait d'être capturée et dégradée en un peptide antigénique. Les IKDC ressemblent donc pour cet aspect aux PDC, qui ont des capacités d'apprêtement et de présentation de l'antigène limitées.

Implication en immuno-surveillance ? (Taieb et al. 2006) **:**
Dans un modèle de mélanome, une thérapie combinée d'IL-2 et d'imatinib mésylate (Gleevec) induit l'infiltration des IKDC murines activées dans la masse tumorale.
Ces IKDC activées produisent de l'IFN-γ qui induit à son tour l'expression de TRAIL à la surface des IKDC activées. Les IKDC murines reconnaissent ensuite et tuent les cellules tumorales de façon dépendante de TRAIL.
Cet exemple d'implication des IKDC en immunosurveillance ne permet cependant pas de conclure à une fonction courante de ce nouveau type cellulaire, le phénomène n'ayant pour l'instant été observé que dans le cas de ce traitement des souris.

que les monocytes $CD14^+$, mais plus grosses que les lymphocytes au repos. Elles présentent un noyau excentré réniforme et ont un cytoplasme basophile qui contient une zone Golgi pâle.

En microscopie électronique à balayage (voir fig.02), les PDC présentent une morphologie lymphoïde lisse et ronde et mesurent 8 à 10 µm de diamètre.

En microscopie électronique à transmission (voir fig.02), les PDC présentent des noyaux avec de l'hétérochromatine marginale et un cytoplasme contenant un réticulum endoplasmique rugueux bien développé.

2.5. Différenciation et survie des DC

Les MDC peuvent être générées *in vitro* à partir des progéniteurs CD34, en présence de GM-CSF et de *tumor necrosis factor-alpha* (TNF-α) (Caux et al. 1996). Elles peuvent également être obtenues à partir de monocytes, en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Romani et al. 1996).

A la différence des MDC, les PDC ne semblent pas nécessiter de GM-CSF pour leur développement. Les étapes et le contrôle du développement des PDC ne sont pas totalement compris. Jusqu'à aujourd'hui, le Flt3L (*fms-like tyrosine kinase 3 ligand*) semble être la seule cytokine critique pour le développement des PDC à partir des cellules souches hématopoïétiques chez l'homme et la souris (Blom et al. 2000; Chen et al. 2004). La capacité du Flt3L à induire le développement des PDC *in vivo* a été confirmée par des expériences montrant que l'administration de Flt3L à des volontaires humains conduisait à une augmentation du nombre des PDC du sang périphérique (Pulendran et al. 2000). Les PDC peuvent également être générées *in vitro* à partir de progéniteurs CD34 isolés du foie fœtal, de la moelle osseuse ou du sang de cordon en présence de Flt3L pendant 2 à 3 semaines (Blom et al. 2000), ou sous l'action de la thrombopoïétine et du Flt3L (Chen et al. 2004), ou à partir de progéniteurs $CD34^+CD38^-$ du foie fœtal co-cultivés pendant 1 semaine avec une lignée cellulaire stromale murine (Spits et al. 2000). Cependant, ces méthodes de génération sont plus longues et compliquées pour obtenir des PDC que pour l'obtention des MDC.

L'IL-3 est la cytokine indispensable à la survie et à la maturation des PDC en culture (Grouard et al. 1997). La présence de virus permet aussi leur maintien en culture. Sans ces facteurs, elles meurent rapidement par apoptose.

2.6. Méthodes d'isolement

Les méthodes de génération des PDC étant difficiles à mettre en œuvre, une autre manière d'obtenir ces cellules pourrait passer par leur isolement à partir du sang ou d'organes lymphoïdes. Au moins trois méthodes différentes ont été développées pour isoler les PDC du sang et des amygdales humains. Leurs caractéristiques et l'écart entre les efficacités de purification qu'elles génèrent pourraient expliquer les divergences de résultats obtenus avec des PDC isolées.

(1) isolement des cellules $CD4^{+}CD11c^{-}LIN^{neg}$ (CD3, CD14, CD16, CD19, CD56) par tri des cellules immunofluorescentes en trois couleurs (Grouard et al. 1997) ;

(2) isolement des cellules $CD123^{+fort}HLA\text{-}DR^{+}LIN^{neg}$ par tri des cellules immunofluorescentes en trois couleurs (Olweus et al. 1997) ;

(3) isolement des cellules BDCA-2^{+} ou BDCA-4^{+} par tri de cellules immunofluorescentes ou tri des cellules par billes magnétiques (Dzionek et al. 2000; Dzionek et al. 2001).

Dans tous les cas, ces méthodes prennent du temps et ont un coût assez conséquent.

3. Répartition des PDC *in vivo* et migration

L'identification de PDC humaines dans le foie, le thymus et la moelle osseuse fœtaux suggère qu'elles se développent à partir de cellules souches hématopoïétiques dans ces tissus lymphoïdes primaires (Spits et al. 2000). Au cours de la vie adulte, les PDC semblent être produites constamment à partir de la moelle osseuse. A l'état physiologique, les PDC retrouvées sous forme immature dans le sang sont les cellules naturellement productrices d'IFN (IPC). Elles représentent environ 0,5% des PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*). Elles sont également localisées dans les zones T extrafolliculaires paracorticales (mais pas au niveau des centres germinatifs) des ganglions lymphatiques, dans les amygdales, dans le thymus, et dans le tissu pulmonaire (Demedts et al. 2005). A l'inverse, elles n'ont jamais été observées au niveau des sites effecteurs directement exposés aux antigènes tels que les muqueuses ou la peau en situation physiologique normale. Dans les ganglions lymphatiques, les PDC sont observées dans les zones proches des veinules post capillaires (HEV), suggérant leur extravasation à partir du sang dans les ganglions, sans passage par le circuit lymphatique.

Peu d'informations sont disponibles concernant le trafic des PDC en condition d'homéostasie. La littérature est légèrement plus abondante sur leur migration en condition d'inflammation ou d'infection virale.

A la différence des MDC, en conditions d'homéostasie, les PDC n'ont pas été retrouvées dans les tissus périphériques, suggérant une capacité migratoire différente entre les deux types de DC, malgré une expression et une modulation similaires de leurs récepteurs aux chimiokines, dont CCR2, CXCR4 et la L-sélectine (CD62L). Seuls CCR5, CCR7 et CXCR3 sont clairement très exprimés par les PDC alors qu'ils le sont faiblement par les MDC (Penna et al. 2001). Les PDC du sang, contrairement à celles de l'amygdale, expriment la L-sélectine qui permet l'adhérence et le "roulement" des cellules sur l'endothélium des HEV (Cella et al. 1999). La L-sélectine subirait un clivage protéolytique lors de l'entrée dans les organes lymphoïdes secondaires. Son expression sur les PDC circulantes leur permettrait de migrer constitutivement dans les ganglions par la voie sanguine.

Alors que les MDC peuvent répondre à plusieurs chimiokines homéostatiques et pro-inflammatoires telles que RANTES (*regulated-upon-activation normal T cell*) / CCL5 et MCP (*monocyte chemoattractant protein*) -1 / CCL2, *in vitro*, les PDC fraîchement isolées sont plutôt attirées par la chimiokine d'adressage vers les ganglions SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*) / CXCL12 , ce qui suggère leur propension naturelle à migrer non pas au site de l'inflammation comme les MDC, mais plutôt vers les organes lymphoïdes secondaires. En conditions d'homéostasie, les PDC sanguines immatures répondent à SDF-1 (produite de façon constitutive par les cellules endothéliales dans les organes lymphoïdes secondaires), ligand du CXCR4 présent à la surface des PDC, en migrant depuis le sang vers les ganglions lymphatiques *via* les HEV (Penna et al. 2002). Plus récemment, un autre récepteur chimiotactique, ChemR23, a été identifié comme étant exprimé et fonctionnel à la surface des PDC, tandis que son ligand, la chémerine, est retrouvé sur la surface luminale des HEV et de l'endothélium inflammé, suggérant un rôle de ce couple dans le trafic des PDC (Vermi et al. 2005).

La migration des PDC vers les ganglions lymphatiques au repos pourrait donc être favorisée par la L-sélectine qui permettrait l'adhérence de la cellule sur l'endothélium et son ralentissement, facilitant ainsi sa réponse à SDF-1. En revanche, après interaction avec des stimuli de type "pathogène" (virus, oligodéoxynucléotides CpG, ou cellules exprimant CD40L), l'expression des récepteurs aux chimiokines inflammatoires diminue à la surface des PDC et leur migration pourrait être dirigée par CCR7, qui interagit avec les chimiokines CCL19/MIP3β et CCL21 exprimées par les HEV et les cellules stromales dans les zones

riches en cellules T (Cella et al. 1999). Les PDC pourraient donc migrer préférentiellement vers les organes lymphoïdes secondaires plutôt que vers les sites de l'inflammation (Penna et al. 2001). Dans le même temps, les PDC sécrètent de hauts niveaux de chimiokines inflammatoires qui pourraient attirer d'autres PDC dans les ganglions lymphatiques, induisant la formation d'amas (Krug et al. 2002).

En effet, dans plusieurs situations inflammatoires, les PDC ont été décrites dans des organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques réactifs, amygdales) et non-lymphoïdes (peau, muqueuses). Dans les organes lymphoïdes secondaires réactifs, les PDC ont été trouvées principalement inactivées et localisées dans la zone T proches des HEV postcapillaires, suggérant leur entrée à partir du flux sanguin. De plus, les PDC expriment le récepteur CXCR3 pour les chimiokines inductibles par IFN-γ (Mig/CXCL9, IP-10/CXCL10 et ITAC/CXCL11) libérées par les HEV pendant l'inflammation ou après exposition au virus. Récemment, il a été montré que les ligands de CXCR3 augmentaient la réactivité à la chimiokine constitutive SDF-1, suggérant un rôle pour ces ligands dans l'entrée des PDC dans les ganglions lymphatiques réactifs (Vanbervliet et al. 2003). Une fois dans le ganglion lymphatique inflammé, les PDC pourraient produire de grandes quantités d'IFN de type I afin de protéger les cellules des infections virales, et permettre la survie des cellules T activées par l'antigène (Cella et al. 1999).

Quant aux PDC leucémiques (LPDC, dont nous reparlerons plus tard) présentes dans les lésions cutanées et les ganglions lymphatiques envahis, elles expriment CXCR3, CXCR4 et CCR7, et leurs ligands respectifs Mig, SDF-1 et MIP3β sont exprimés par les cellules du microenvironnement de façon concomitante. Les LPDC expriment également CCR6. Elles sont capables de migrer en réponse aux ligands de CXCR4, CCR2, CCR5, CCR6 et CCR7, et les ligands de CXCR3 sont capables d'augmenter la réponse au SDF-1. L'activation des LPDC induite par IL-3 ou le virus conduit à la diminution d'expression de CXCR3 et CXCR4, et à l'augmentation d'expression de CCR7, associée à la perte de réponse envers SDF-1, et à l'acquisition de sensibilité envers CCL19. L'accumulation préférentielle de LPDC dans la peau ou les ganglions lymphatiques pourrait donc être orchestrée par les ligands de CXCR3, CXCR4, CCR6 et CCR7, trouvés dans les structures non-tumorales des organes envahis (Bendriss-Vermare et al. 2004).

4. Reconnaissance des pathogènes et capture d'antigènes par les PDC

Une des caractéristiques propres des PDC, par rapport aux MDC, concerne leurs récepteurs de reconnaissance de pathogènes et leurs réponses à une invasion microbienne ou virale. En effet, les deux sous-populations de DC expriment des éventails différents de TLR, les récepteurs de reconnaissance des motifs microbiens hautement conservés de la drosophile à l'homme (Janeway and Medzhitov 2002; Takeda et al. 2003) et ont donc des fonctions orientées et spécialisées.

Ainsi, tandis que les MDC expriment les TLR1, -2, -3, -4, -5, -6, -8 et -10 reconnaissant les bactéries à la surface cellulaire, les PDC expriment les TLR-1, -6, -7, -9 et -10 reconnaissant les virus et les bactéries dans les compartiments endosomaux (voir tableau 02 et figure 03) (Jarrossay et al. 2001; Ito et al. 2005).

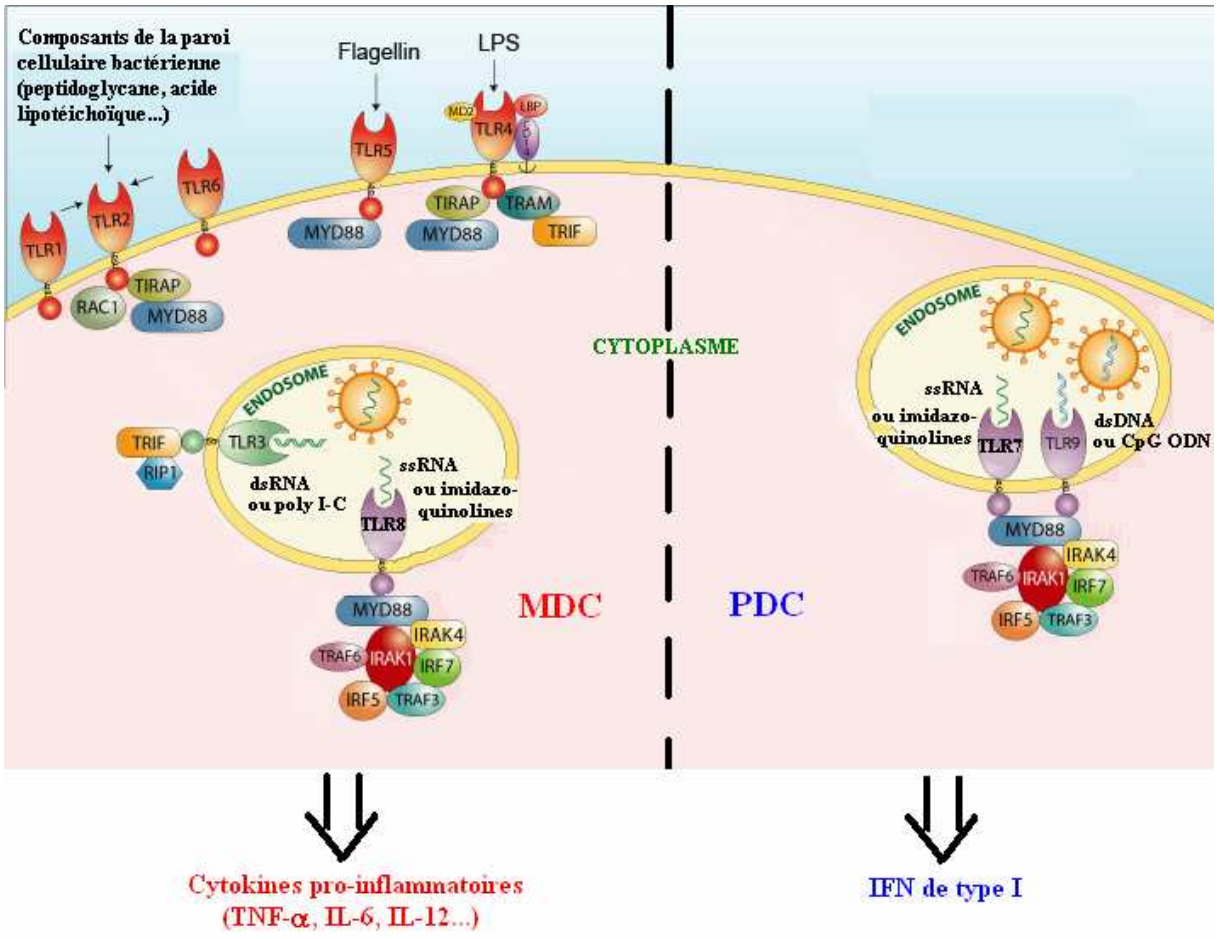


Figure 03. Expression différentielle des TLR et activation consécutive pour les MDC et PDC. Adapté de *Invivogen.* (ss = simple brin ; ds = double brin)

En accord avec ces profils d'expression des TLR, les deux sous-populations de DC reconnaissent des pathogènes différents et induisent des réponses propres à chaque type de

DC, ce qui leur octroie un rôle complémentaire. Ainsi, les MDC répondent aux ligands microbiens connus pour le TLR2 (peptidoglycane, acide lipotéichoïque) et le TLR4 (LPS) en produisant de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-12 (Kadowaki et al. 2001), tandis que les PDC produisent de grandes quantités d'IFN de type I en réponse aux virus à ADN et aux oligodeoxynucléotides CpG (CpG ODN) (ligands du TLR9) ou aux ARN viraux simple brin (ligands du TLR7) (Ito et al. 2005).

Les voies de signalisation des TLR et leurs ligands seront décrites de façon plus approfondie dans la 2ème partie de l'introduction ("Reconnaissance des pathogènes, et ensuite").

Par ailleurs, les MDC et les PDC expriment différentes lectines. Les MDC mais pas les PDC expriment les récepteurs au mannose et peuvent rapidement ingérer de grandes quantités d'antigènes solubles ou particulaires comme l'OVA (Burgdorf et al. 2006), le dextran-FITC (Grouard et al. 1997; Robinson et al. 1999) et le zymosan (Reis e Sousa et al. 1993). Elles expriment aussi les récepteurs DEC205 et DC-SIGN alors que les PDC expriment spécifiquement une lectine unique reconnue par l'anticorps monoclonal BDCA-2 (Dzionek et al. 2000).

Une étude suggère que les PDC pourraient capturer l'antigène *via* BDCA-2, dans le sang et les tissus lymphoïdes (ganglions lymphoïdes, amygdales, thymus) pour l'apprêter et le présenter aux cellules T (Dzionek et al. 2001). Par ailleurs, la liaison d'anticorps à BDCA-2 inhibe la production d'IFN-α par les PDC en présence de virus, de CpG ODN ou de complexes immuns ADN / anticorps anti-ADN double-brin (tels qu'on les rencontre dans le lupus). Cette inhibition pourrait participer au début de la différenciation des PDC immatures en PDC matures, liée à la capture d'antigène par le BDCA-2, qu'elle en représente une cause ou une conséquence (Dzionek et al. 2001). Ce mécanisme d'inhibition de l'IFN-α pourrait être dû à l'apparition de calcium intracellulaire dans les PDC ayant lié un anticorps anti-BDCA-2 (Kerkmann et al. 2003). Une autre étude retrouve les mêmes propriétés pour l'ILT7 (appelé également CD85g et LILRA4), un récepteur à motif ITAM sélectivement exprimé à la surface des PDC humaines et qui se lierait à la protéine adaptatrice FcεRIγ par laquelle il transmettrait son signal, pour former un complexe récepteur (Cao et al. 2006). La liaison de CpG ou du virus de l'*influenza* sur l'ILT7 inhiberait la transcription et la sécrétion d'IFN de type I et d'autres cytokines, en induisant une voie de signalisation passant par la phosphorylation de kinases de la famille Src et de la kinase Syk et par l'induction d'un influx de calcium. La liaison au récepteur de haute affinité IgE qui induit le signal par FcεRIγ inhibe

Encadré 2: Les différents types d'interférons (IFN)

Les IFN de type I appartiennent à la famille des cytokines α-hélicoïdales de classe II, qui inclut l'IFN-γ de type II (Schroder et al. 2004), les IFN-λ nouvellement identifiés, l'IL-10 et plusieurs homologues de l'IL-10 (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 (Mda-7), IL-26 (AK155)) (Pestka et al. 2004a). Les IFN de type I englobent 7 classes: IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-κ, IFN-ω, IFN-δ et IFN-τ (voir tableau 1).

Ligands	Autres noms	espèce/tissu	Chaîne 1 du récepteur	Chaîne 2 du récepteur	Voies de transduction du signal
IFN de type I	IFN-α	Mammifères	IFN-αR1	IFN-αR2	Jak1, Tyk2
	IFN-β	Mammifères			Stat1, Stat2, Stat3
	IFN-δ	Porcins			Stat4, Stat5
	IFN-ε	placenta humain et murin			PI3K
	IFN-κ	kératinocytes humains			Akt
	IFN-τ	trophoblaste des ruminants			NFκB
	IFN-ω	Mammifères			MAPK
	IFN-ζ (Limitine)	Souris			p53
					PRMT1
IFN de type II	IFN-γ	Mammifères	IFN-γR1	IFN-γR2	Jak1, Jak2
					Stat1, Stat3, Stat5
					PI3K
					Akt
					NFκB
					MAPK
IL-28A	IFN-λ2	Mammifères	IL-28R1	IL-10R2	Jak1, Tyk2
IL-28B	IFN-λ3	Mammifères			Stat1, Stat2, Stat3
IL-29	IFN-λ1	Mammifères			Stat5

Tableau 1. IFN et protéines "IFN-like". Adapté de (Pestka et al. 2004b).

Parmi ceux-ci, les IFN-δ (Lefevre et al. 1998) et -τ (Martal et al. 1998) ne sont pas trouvés chez l'humain, l'IFN-ε (Hardy et al. 2004) est exprimé dans le placenta et pourrait jouer un rôle dans la reproduction, et l'IFN-κ (LaFleur et al. 2001) est exprimé dans les kératinocytes. L'IFN-β est représenté par un seul membre, tandis que les génomes humain et murin contiennent tous deux plus de 20 gènes *IFN-α* différents, parmi lesquels 13 codent pour des polypeptides fonctionnels (voir tableau 2). Les gènes *IFN-α* multiples, dépourvus d'introns, semblent avoir été générés par duplications et recombinaisons répétées. Récemment, deux groupes de recherche ont identifié une nouvelle classe de cytokines ressemblant à des IFN de type I, appelées IFN-λ1, λ-2 et λ-3 (Kotenko et al. 2003), ou IL-28A, IL-28B et IL-29 (Sheppard et al. 2003) respectivement, auxquelles on peut ajouter l'IFN-ζ ou limitine (Oritani et al. 2000). Bien que les IFN-λ soient fonctionnellement similaires aux IFN de type I, leurs gènes ont une séquence et une localisation chromosomique distincte, et, à la différence des IFN-α, ils ont plusieurs introns. De plus, ils n'utilisent pas le récepteur de l'IFN-α (IFNAR) mais induisent leur signalisation *via* un récepteur hétérodimérique composé d'une chaîne R1 de liaison à un ligand spécifique (appelée aussi IL-28R), et d'une seconde chaîne (IL-10R2) qui sert aussi de sous-unité R2 pour les récepteurs à l'IL-10, l'IL-22 et l'IL-26.

Genes	Proteins
IFNA1	IFN-αD, IFN-α1
IFNA2	IFN-αA (IFN-α2a), IFN-α2 (IFN-α2b), IFN-α2c
IFNA4	IFN-α4a (IFN-α76), IFN-α4b
IFNA5	IFN-αG, IFN-α5, IFN-α61
IFNA6	IFN-αK, IFN-α6, IFN-α54
IFNA7	IFN-αJ, IFN-αJ1, IFN-α7
IFNA8	IFN-αB2, IFN-αB, IFN-α8
IFNA10	IFN-αC, ΨIFN-α10, ΨIFN-αL, IFN-α6L
IFNA13	IFN-α13 (sequence identical to IFN-α1)
IFNA14	IFN-αH, IFN-αH1, IFN-α14
IFNA16	IFN-αWA, IFN-α16, IFN-αO
IFNA17	IFN-αI, IFN-α17, IFN-α88
IFNA21	IFN-αF, IFN-α21
IFNAP22	YIFN-aE

Tableau 2. Gènes et protéines d'IFN-α humain. D'après (Pestka et al. 2004b).

également la production d'IFN de type I induite par les PDC humaines (Novak et al. 2004; Schroeder et al. 2005), tout comme la liaison au récepteur NKp44, qui induit le signal *via* l'adaptateur à motif ITAM DAP12 (Novak et al. 2004; Fuchs et al. 2005). Ces récepteurs seraient donc responsables de la régulation négative de la sécrétion d'IFN de type I par les PDC humaines.

Mis à part l'hypothèse du BDCA-2, peu de choses sont connues au sujet de la capture d'antigènes par les PDC. Elles semblent moins efficaces que les MoDC pour l'endocytose d'antigènes solubles ou cellulaires, mais sont capables de capturer du matériel cellulaire provenant de cellules vivantes exposées au virus de l'*Influenza* (Lui et al. in preparation).

Après capture d'un antigène protéique entier (toxine tétanique), les PDC préalablement exposées 2 jours à IL-3 et TNF-α acquièrent de manière temporaire la capacité de stimuler des lymphocytes T $CD4^+$ autologues spécifiques. De la même manière, les PDC ont la propriété particulière de présenter efficacement des néo-antigènes (tels que KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*)) à des lymphocytes T autologues spécifiques de ces antigènes (Kohrgruber et al. 1999). A la différence des MDC, les PDC ne semblent pas capables de présenter les antigènes lipidiques aux cellules T. En effet, les MDC, mais pas les PDC, peuvent présenter l'alpha-galactocéramide aux NKT *via* le CD1d (Kadowaki et al. 2001). Cette caractéristique peut s'expliquer par le fait que les PDC n'expriment pas les molécules CD1a, b, c et d.

Ces données suggèrent que les lignées humaines de MDC et de PDC ont évolué pour reconnaître préférentiellement différents antigènes ou pathogènes et pourraient activer différentes réponses immunes *via* les cellules T.

5. Activation des PDC

La PDC semble ainsi représenter une entité cellulaire unique au sein du système immunitaire, qui joue des rôles différents en fonction de son état de maturation, avec : 1°) après activation par un motif bactérien ou viral, une forte capacité à sécréter de l'IFN de type I (Seeds et al. 2006) et une action en tant que cellule effectrice dans les réponses immunes innées anti-microbiennes et anti-virales, et 2°) après capture d'un antigène, une capacité à se différencier en cellule présentatrice d'antigène professionnelle pour initier les réponses immunes adaptatives.

Les PDC immatures expriment de faibles niveaux de CMH de classe II et des niveaux faibles à indétectables de CD80 et CD86, et elles sont incapables de stimuler une forte

Encadré 3: Les voies de signalisation des IFN de type I et II

Les IFN de type I et II se lient à leurs récepteurs de surface cellulaire spécifiques (IFNAR1/2 et IFNGR1/2) et activent les Janus kinases (JAK) qui sont liées en permanence à ces récepteurs (JAK1 et la tyrosine kinase 2 (TYK2) pour IFNAR, et JAK1 et JAK2 pour IFNGR). Les JAK activées phosphorylent des résidus tyrosine dans le récepteur, ce qui créé des sites d'ancrage pour les transducteurs de signal et activateurs de transcription (STAT)1 pour l'IFNGR et complexes STAT1-STAT2 pour l'IFNAR. Les STAT associés aux récepteurs sont phosphorylés sur des résidus tyrosine par les JAK associées aux récepteurs. Les STAT phosphorylés forment des homodimères STAT1 après stimulation des récepteurs IFNAR et IFNGR et des hétérodimères STAT1-STAT2 après stimulation du récepteur IFNAR. Ces dimères vont ensuite dans le noyau pour induire l'expression des gènes stimulés par l'IFN (Interferon-Stimulated Genes = ISG). Les homodimères STAT1 (α-IFN-activated factor = AAF) se lient aux séquences promotrices du site activé par l'IFN-γ (γ-IFN-activated site = GAS) et les hétérodimères STAT1-STAT2 s'associent avec la protéine nucléaire p48, appelée aussi facteur de régulation de l'IFN 9 (IFN-Regulatory Factor 9 = IRF9) ou sous-unité γ du facteur 3 des gènes stimulés par l'IFN (IFN-Stimulated Gene Factor 3 γ), pour former l'ISGF3, qui est un complexe de transcription multi-composants. Le tout se fixe sur les séquences promotrices de l'élément de réponse stimulé par l'IFN (IFN-Stimulated Response Element = ISRE) pour induire la transcription stimulée par l'IFN de plus de 100 gènes, dont l'action concertée conduit à la génération d'un "état antiviral". Bien que la signalisation *via* les dimères STAT1/STAT2 et STAT1/STAT1 soit la mieux caractérisée, une variété d'autres voies de signalisation peuvent aussi être activées (Platanias 2005). Certaines d'entre elles sont révélées en l'absence de STAT1 (Nguyen et al. 2000a), dépendent de STAT4 (Cho et al. 1996; Nguyen et al. 2002), pourraient être dépendantes de STAT2 mais indépendantes de STAT1 (Hahm et al. 2005), et/ou résultent de l'activation de STAT3 ou 5 (Brierley and Fish 2002). La flexibilité qu'ont les récepteurs aux IFN de type I pour accéder aux molécules de signalisation en aval pourrait être régulée par l'abondance relative des STAT eux-mêmes (Nguyen et al. 2002).

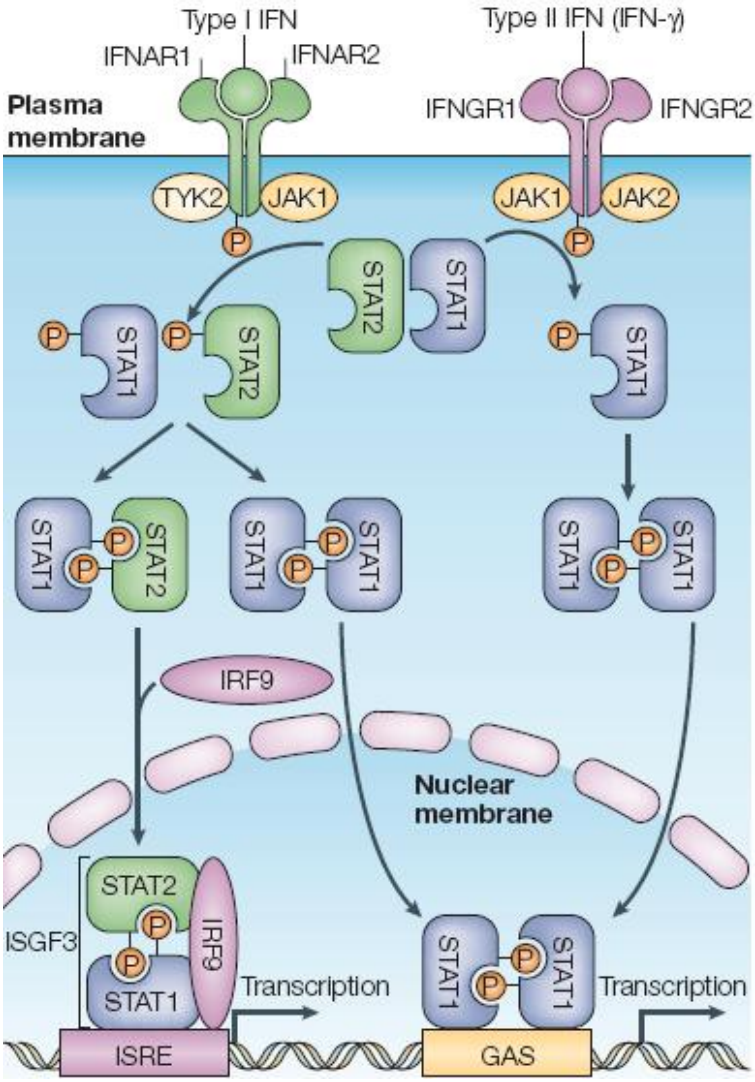


Figure 2. Voies de signalisation des IFN de type I et II. D'après (Decker et al. 2005).

prolifération de cellules T spécifiques de l'antigène (Grouard et al. 1997; Kadowaki et al. 2000). De nombreux signaux peuvent cependant induire la différenciation des PDC immatures en PDC matures, tels que l'IL-3 accompagné de CD40L (Grouard et al. 1997) et une variété de stimuli microbiens, dont les virus (Kadowaki et al. 2000), les bactéries (Bauer et al. 2001), les imidazoquinolines (Ito et al. 2002) et les CpG ODN (Kadowaki et al. 2001).

Alors que les PDC induites en maturation par l'IL-3 et le CD40L polarisent préférentiellement les cellules T $CD4^+$ naïves vers la voie T_H2 (production d'IL-4, IL-5 et IL-10) (Rissoan et al. 1999), les DC induites en maturation par le virus polarisent préférentiellement les cellules T $CD4^+$ naïves vers la voie T_H1-*like* (production d'IFN-γ et d'IL-10) (Kadowaki et al. 2000). Ces études suggèrent que les PDC présentent une plasticité fonctionnelle en terme d'initiation de réponses cellulaires T effectrices différentes, selon le type de signaux de maturation (voir figure 05).

Durant la transition entre la PDC immature et la PDC mature, une transformation morphologique radicale s'effectue. Les PDC immatures rondes acquièrent une morphologie dendritique typique, étroitement associée aux fonctions effectrices spécialisées des PDC dans la stimulation des cellules T (voir figure 02 droite). Les dendrites permettent aux PDC d'interagir efficacement avec plusieurs cellules T (Banchereau and Steinman 1998; Hugues et al. 2004). Cette morphologie dendritique a été bien décrite *in vitro*, après stimulation des PDC immatures avec l'IL-3 ou les ligands des TLR (Grouard et al. 1997; Liu 2005).

Les changements fonctionnels des PDC immatures sont parallèles aux changements morphologiques. Au stade plasmacytoïde, les PDC immatures sont des cellules professionnelles en termes de synthèse de protéine et sécrétion potentielles, mais n'ont pas la capacité d'apprêter et présenter l'antigène (Siegal et al. 1999; Fiebiger et al. 2001; Salio et al. 2004). Au cours de la différenciation, les cellules acquièrent une capacité de présentation d'antigène, expriment une large gamme de molécules de co-stimulation importantes pour l'interaction entre PDC et cellule T, et perdent leur potentiel de production d'IFN de type I (Liu 2005). En même temps, l'expression de récepteurs de l'immunité innée tels que TLR-9 diminue (Dzionek et al. 2001; Hornung et al. 2002).

6. Activation d'une réponse immune innée par les PDC

La plupart des virus enveloppés à ADN (Cytomégalovirus (CMV), *Herpes Simplex Virus* (HSV)) ou à ARN (Sendai, oreillons, *Newcastle Disease Virus* (NDV), rougeole, *Influenza*, *Vesicular stomatitis virus* (VSV), virus de l'immunodéficience humaine (VIH)), de

Encadré 4: Effets pléiotropiques de l'IFN de type I (1ère partie)

Si la production d'IFN de type II est restreinte aux lymphocytes T et aux cellules NK, tous les types de cellules semblent capables de produire l'IFN de type I en réponse à une infection virale. D'abord identifiés pour leurs propriétés antivirales (Isaacs and Lindenmann 1957), leur implication dans le contrôle de la prolifération cellulaire et dans la régulation du système immunitaire est maintenant clairement établie. La diversité de leurs effets confère donc aux IFN un potentiel thérapeutique important.

1- Rôle antiviral:

L'activité antivirale des IFN de type I est à l'origine de leur nom d'"interférons", et elle sert toujours pour définir l'unité d'activité de l'IFN (Pestka 1986). Le système de l'IFN de type I est indispensable chez les vertébrés pour le contrôle des infections virales.
L'induction de la voie de signalisation de l'IFN de type I aboutit à la transcription de nombreux gènes, les ISG (de Veer et al. 2001), dont certains codent pour des protéines antivirales. A ce jour, trois voies antivirales ont été clairement établies. Celles-ci comprennent la protéine kinase stimulée par l'ARN double-brin (PKR) (Williams 1999), le système 2'-5' oligoadénylate synthétases (OAS)/RNaseL (Silverman 1994) et les protéines issues du gène de résistance au myxovirus (Mx) (Isaacs and Lindenmann 1957; Haller and Kochs 2002). **Mx** est une guanosine triphosphatase (GTPase) appartenant à la superfamille des grandes GTPases ressemblant aux dynamines qui séquestrent les ribonucléoprotéines virales dans des compartiments sous-cellulaires spécifiques. La **PKR** est une kinase à sérine-thréonine qui phosphoryle les substrats en aval après reconnaissance d'ARN double-brin, dont le facteur d'initiation de l'élongation (eIF2α), ce qui entraîne l'inhibition de la traduction protéique (Samuel 2001). Les **protéines OAS** sont aussi activées par l'ARN double-brin, conduisant à la génération de 2'-5' oligoadénylates, qui activent la ribonucléase L (RNase L), cette dernière dégradant l'ARN cellulaire et viral (Samuel 2001). Cependant, même en l'absence de ces voies, l'IFN peut toujours induire une réponse antivirale *via* l'existence d'autres ISG multiples ayant une activité antivirale (Zhou et al. 1999). Les protéines additionnelles issues de ces ISG sont l'**ISG20** (Espert et al. 2003), la protéine de leucémie promyélocytique (**PML**) (Regad et al. 2001), la protéine de liaison à la guanylate 1 (**GBP-1**) (Anderson et al. 1999), **P56** (Guo et al. 2000; Hui et al. 2003) et la désaminase à adénosine spécifique de l'ARN 1 (**ADAR1**) (Samuel 2001). P56 se lie à une sous-unité du facteur d'initiation de la traduction eucaryotique eIF3 et supprime ensuite la traduction de l'ARN viral aussi bien que cellulaire (Hui et al. 2003; Wang et al. 2003). P56 et ADAR 1 sont tous deux capables de limiter la réplication du virus de l'hépatite C (HCV) à un certain degré (Wang et al. 2003; Taylor et al. 2005).

même que les cellules infectées par un virus, les cellules tumorales, les bactéries (Gram-positif et Gram-négatif) (Svensson et al. 1996), et l'ARN double brin synthétique (Baron and Dianzani 1994) activent la sécrétion par les PDC des cytokines inflammatoires, et de hauts niveaux d'interféron de type I (IFNα/β) correspondant à 100 à 1000 fois plus que la quantité produite par un autre type cellulaire sanguin (Cella et al. 1999; Siegal et al. 1999). Ces IFN de type I régulent un éventail varié de cytokines et leurs récepteurs, et inhibent directement le cycle de vie intracellulaire du virus (voir encadré n°4 "Effets pléoitropiques de l'IFN de type I"). En sécrétant de si grandes quantités d'IFN de type I, les PDC pourraient également être importantes dans la stimulation de la réponse immunitaire innée de l'hôte. En effet, il a été décrit en particulier que l'IFNα/β orchestrait l'élimination des cellules infectées et tumorales en induisant l'expression du *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (Simonet et al.) sur les cellules NK (Sato et al. 2001), et les lymphocytes T (Kayagaki et al. 1999).

6.1. Sécrétion d'IFN de type I par les PDC

Si on suit la cinétique d'apparition de l'ARNm des IFN de type I dans les PDC (Kadowaki et al. 2000; Ito et al. 2004), on trouve qu'elles ne contiennent pas de transcrits

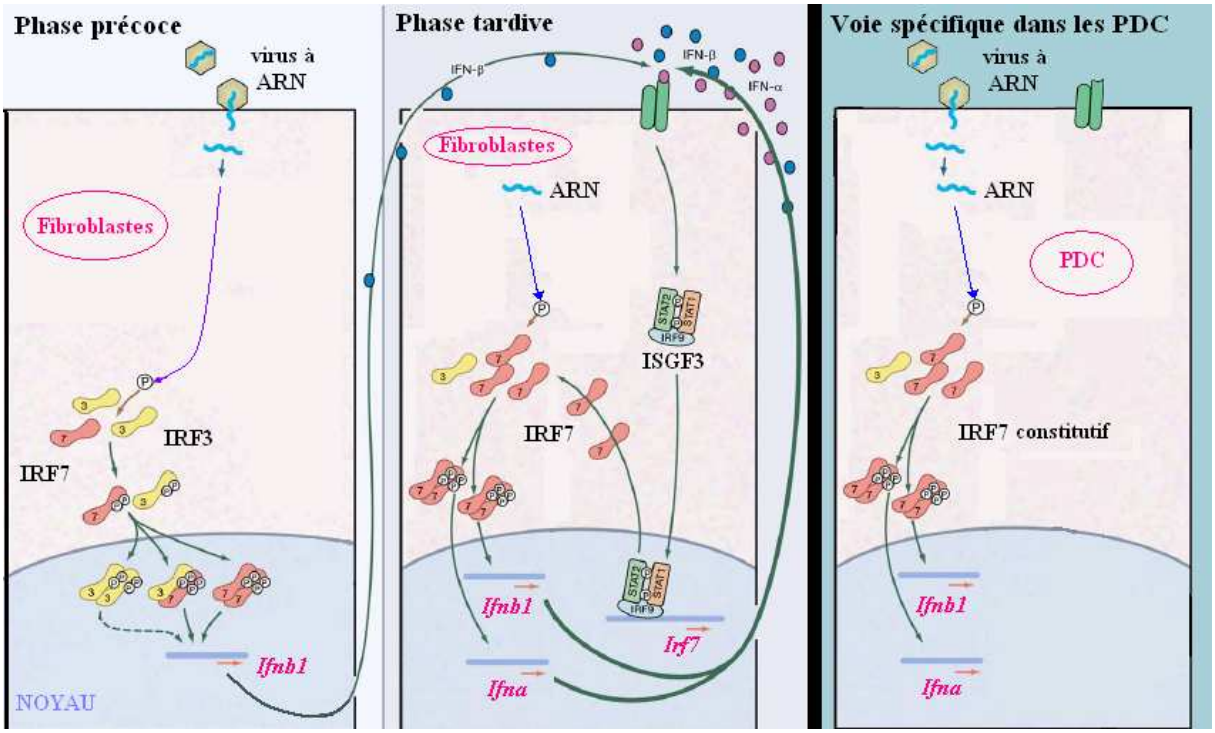


Figure 04. Boucle de rétrocontrôle positive menant à l'augmentation de sécrétion d'IFN de type I dans les fibroblastes (deux cadres de gauche) et voie spécifique aux PDC qui expriment l'IRF7 de façon constitutive et ne nécessitent donc pas de boucle de rétrocontrôle pour la production d'IFN de type I (cadre de droite). Adapté de (Honda et al. 2006).

Encadré 5: Effets pléiotropiques de l'IFN de type I (2ème partie)

2- Contrôle de la prolifération cellulaire:

Les IFN-α/β **suppriment la prolifération** de nombreuses cellules normales et transformées *via* la prolongation de la phase G1 du cycle cellulaire et un taux d'entrée en phase S réduit (Creasey et al. 1980). L'IRF-1 semble médier l'inhibition de la croissance (Kirchhoff et al. 1993). La PKR et les 2'-5' OAS sont des gènes cibles en aval de IRF-1 et ils influencent la prolifération cellulaire en plus de leur importance en tant qu'agents antiviraux (Rysiecki et al. 1989; Koromilas et al. 1992). En sus de leurs effets cytostatiques, les IFN-α/β **induisent l'apoptose** dans certains types de cellules. Les précurseurs des lymphocytes B sont très sensibles aux IFN-α/β, et meurent par apoptose (Wang et al. 1995; Shimozato and Kincade 1997; Kouro et al. 2001). En effet, le développement des lymphocytes B est sévèrement inhibé chez les souris surexprimant IRF-1 (Yamada et al. 1991), et le nombre de lymphocytes B est réduit chez les souris auxquelles il manque IRF-2 (Matsuyama et al. 1993). Le rôle normal de IRF-2 est de contrecarrer les effets de l'IRF1. Il est aussi connu que l'expression du gène de l'enzyme de conversion de l'interleukine (IL)-1β (ICE) est dépendante de l'IRF-1 (Tamura et al. 1995). ICE est un homologue chez les mammifères de gène de mort cellulaire *ced3* chez *Caenorhabditis elegans*.

3- Régulation du système immunitaire:

Les IFN-α/β peuvent influencer la prolifération, la différenciation et la fonction de types cellulaires variés dans le système immunitaire. Par exemple, les IFN de type I **suppriment la prolifération** spécifique de l'antigène ou induite par un mitogène **des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$**, bien qu'ils induisent une production d'IL-15 par les macrophages et que l'IL-15 puisse augmenter la croissance des cellules T (Tough et al. 1999). Il a été également montré qu'à l'opposé les IFN-α/β **augmentaient l'activité lytique des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques** (Ortaldo et al. 1983; Blackman and Morris 1985). L'augmentation d'expression des antigènes de surface cellulaire du complexe majeur d'histocompatibilité (**CMH**) représente un mécanisme important pour l'influence de l'IFN sur l'immunité (Fellous et al. 1982). La voie **perforine/granzyme**, qui médie l'activité tueuse, est aussi activée (Kaser et al. 1999). Les IFN-α/β modulent ensuite les fonctions du système immunitaire en influençant la production de **cytokines proinflammatoires** comme l'IL-1, le facteur de nécrose des tumeurs (TNF)-α et l'IL-8 (Schindler et al. 1989; Tzung and Cohen 1991; Oliveira et al. 1994).

4- Effets sur l'hématopoïèse:

Les récepteurs aux IFN-α/β sont largement distribués sur les progéniteurs des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Ils semblent influencer la lympho-hématopoïèse dans les conditions de traumatisme ou d'inflammation. Les infections virales sont fréquemment associées à une réduction transitoire du nombre de cellules circulantes du sang comme conséquence de la suppression de la moelle osseuse (Rosenfeld and Young 1991). Cette dépression de l'hématopoïèse est principalement médiée par les IFN-α/β induits par les virus (Binder et al. 1997). Les IFN-α/β induisent également la suppression de l'hématopoïèse en régulant l'expression des facteurs de croissance hématopoïétiques qui incluent l'IL-8, l'IL-11, le Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et le Granulocyte-CSF (Oliveira et al. 1992; Aman et al. 1994; Aman et al. 1996).

ARNm pré-existants pour les IFN de type I avant stimulation virale, mais que cet ARNm peut être détecté dès 4h suivant la stimulation virale, et que le niveau atteint un pic à 12h. Entre 6 et 12h après la stimulation virale, environ 50% de l'ARNm total code pour les IFN de type I, dont tous les types d'IFN-α, IFN-β , IFN-ω, IFN-λ, et IFN-τ (Liu 2005) (voir encadré n°2 "Les différents types d'interférons"). Les PDC produisent la plupart des protéines IFN-α durant les premières 24h suivant la stimulation virale, tandis que après, elles fabriquent seulement des quantités modérées d'IFN-α et deviennent réfractaires à une stimulation secondaire avec le même virus ou des virus différents (Liu 2005). Par ailleurs, les PDC humaines produisent des quantités modérées de TNF-α et d'IL-6, mais pas d'IL-1α, d'IL-1β, d'IL-3, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-γ, lymphotoxine-α, ou GM-CSF au niveau protéique après une stimulation virale. Ces résultats suggèrent que les PDC sont spécialisées dans la production d'IFN de type I en immunité innée antivirale.

Les mécanismes moléculaires expliquant la capacité des PDC à produire rapidement une si grande quantité d'IFN de type I après une stimulation virale sont peu connus. La régulation moléculaire de la production d'IFN-α a été largement étudiée dans les fibroblastes, et un modèle de rétrocontrôle positif a été proposé (Taniguchi and Takaoka 2002) (voir figure 04). Après infection virale, diverses molécules entrent en jeu pour aboutir à la phosphorylation du facteur de transcription IRF-3 (voir 2ème partie de l'introduction "Reconnaissance des pathogènes, et ensuite"). Celui-ci est ensuite transloqué dans le noyau, où il active la transcription du gène de l'IFN-β. L'IFN-β sécrété par les cellules infectées par le virus active les voies de signalisation Jak/Stat, conduisant à la formation des complexes de transcription ISGF3, qui activent à leur tour la transcription de l'IRF7. La synthèse *de novo* de l'IRF-7 active fortement la transcription des gènes IFN-α et IFN-β. La transcription rapide et robuste des gènes IFN-α et IFN-β, et la production des protéines IFN-α et IFN-β par les PDC après une stimulation virale suggèrent que la régulation de la production d'IFN-α dans les PDC ne serait pas induite par l'effet de rétrocontrôle positif de l'IFN-β. Cette hypothèse est soutenue par la découverte que, à la différence des fibroblastes, les PDC expriment de hauts niveaux d'IRF-7 constitutivement, ce qui pourrait contribuer en partie à la capacité extraordinaire des PDC à produire de grandes quantités d'IFN-α sans mécanisme de rétrocontrôle IFN-β autocrine (Izaguirre et al. 2003; Kerkmann et al. 2003). Cette hypothèse a été directement testée dans une étude qui utilisait des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN de type I ; les fibroblastes dérivés de ces souris produisaient beaucoup moins d'IFN-α que les fibroblastes dérivés des souris sauvages. Cependant, les PDC dérivées des deux types

de souris produisaient des quantités similaires d'IFN-α en réponse au VSV, suggérant que la capacité des PDC à produire de grandes quantités d'IFN-α est indépendante du rétroncontrôle positif *via* les récepteurs à l'IFN de type I (Barchet et al. 2002).

Une étude utilisant une molécule appelée R848, qui active le TLR8 sur les MDC et le TLR7 sur les PDC humaines, montre que, alors que les MDC produisent préférentiellement de l'IL-12 en réponse au R848, les PDC produisent de l'IFN-α (Ito et al. 2002). Cette découverte soutient le concept que les PDC sont spécialisées pour produire de l'IFN-α, mais pas de l'IL-12, en réponse à une stimulation microbienne. Pourtant, les PDC activées peuvent sécréter aussi d'autres cytokines et chimiokines comme l'IL-6, l'IL-8 et le TNF-α (Cella et al. 1999; Rissoan et al. 1999; Bauer et al. 2001; Kadowaki et al. 2001; Krug et al. 2001; Krug et al. 2001). La sécrétion d'IL-12 biologiquement active (l'IL-12 p75 ou p70) par les PDC humaines est sujette à controverse dans la littérature. Classiquement et de façon opposée aux MDC, les PDC sont décrites comme ne sécrétant pas ou peu d'IL-12. Toutefois, ce concept a été ébranlé par Krug *et al.* qui ont montré les capacités des PDC à sécréter de l'IL-12 biologiquement active lors d'une stimulation combinée par CpG ODN et CD40L (Krug et al. 2001) et la capacité des PDC stimulées dans ces conditions à induire des lymphocytes T naïfs à se différencier en lymphocytes produisant des cytokines de type 1. Cette production d'IL-12 semble être inhibée par la sécrétion d'IFN-α et vice-versa (Krug et al. 2001; Dzionek et al. 2002). Ainsi, les PDC humaines pourraient avoir, comme leur équivalent murin, (Hochrein et al. 2002) la capacité de sécréter de l'IL-12 dans certaines conditions de stimulation.

6.2. Rôle de l'IFN de type I en immunité innée

L'IFN-α/β, sécrété par les PDC en présence de virus, ou de ligands des TLR, est connu pour induire la maturation des MDC, et la cross-présentation (Ito et al. 2001; Honda et al. 2003; Le Bon et al. 2003). Mais il peut également induire l'expression du ligand de mort TRAIL sur les NK (Sato et al. 2001), lymphocytes T (Kayagaki et al. 1999), monocytes (Griffith et al. 1999) et MDC (Liu et al. 2001).

Les PDC pourraient donc jouer un rôle important dans les phases précoces des infections virales, en exerçant des fonctions cytotoxiques leur permettant de détruire les cellules infectées, ce que montrent nos résultats, mais également en mettant en jeu des interactions qui aboutissent à l'activation d'autres cellules de l'immunité innée comme les cellules NK (Della Chiesa et al. 2006), NKT (Marschner et al. 2005), ou les monocytes, par le biais de la sécrétion de cytokines.

7. Présentation des antigènes par les PDC

Contrairement aux PDC fraîchement isolées, les PDC activées augmentent leur expression de surface cellulaire de molécules du CMH de classe II et de molécules de costimulation, accroissant leur capacité de stimulation des cellules T (Grouard et al. 1997; Cella et al. 2000; Asselin-Paturel et al. 2001). Les PDC activées induisent d'ailleurs l'expansion de populations de cellules T $CD8^+$ mémoire spécifiques de l'antigène et de cellules T $CD4^+$ T_H1 spécifiques du virus de l'*influenza* (Fonteneau et al. 2003). Les PDC leucémiques humaines présentent aussi efficacement les antigènes aux clones de cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques du virus de l'*influenza* et aux clones de cellules T spécifiques de la toxine tétanique (Chaperot et al. 2004). Des PDC murines dérivées de la moelle osseuse et activées par ODN CpG+CD40L+GM-CSF ont par ailleurs la capacité d'initier la réponse des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ naïves dont le TcR transgénique est spécifique du peptide OVA (Brawand et al. 2002). Il a également été montré que des PDC immatures étaient capables de présenter des antigènes du CMV et d'activer des cellules T mémoire spécifiques du CMV (Lore et al. 2005). De plus, il a récemment été montré que des PDC humaines purifiées du sang pouvaient *cross*-présenter des antigènes HIV provenant de cellules T $CD4^+$ infectées par le HIV, qu'elles soient apoptotiques ou vivantes, ainsi que des antigènes de différents lipopeptides vaccinaux HIV. Cette *cross*-présentation par les PDC pourrait être responsable de la stimulation des cellules T régulatrices durant l'infection HIV, menant à la tolérance du système immunitaire (Hosmalin 2006).

Les PDC activées peuvent donc présenter les antigènes et induire une expansion considérable des populations de cellules T, de manière équivalente aux MDC (Fonteneau et al. 2003). Il est également possible que les PDC coopèrent avec les MDC *in vivo* en induisant la différenciation de populations de cellules T non-polarisées ayant rencontré l'antigène qui ont été amplifiées par les MDC (Iezzi et al. 2001; Krug et al. 2003). Une autre étude, également chez la souris, souligne le rôle des PDC dans l'induction de sécrétion d'IL-12 par les MDC. L'activation des MDC par les CpG ODN induit une expression d'IL-15 elle-même inductrice d'une expression de CD40 par les MDC. L'induction d'expression d'IL-12 par les MDC se fait alors par liaison du CD40 au CD40L des PDC (Kuwajima et al. 2006). Le contrôle indépendant de la prolifération et de la différenciation des cellules T par les MDC et les PDC pourrait fournir une meilleure flexibilité au système immunitaire dans la régulation des réponses immunes.

8. Activation d'une réponse immune adaptative par les PDC

En ce qui concerne les réponses immunes adaptatives, l'IFN de type I, ou une infection virale, activent la maturation des DC (Ito et al. 2001), leur permettent d'effectuer le *cross-priming* (Le Bon et al. 2003), et favorisent l'orientation des cellules T $CD4^+$ vers la voie T_H1(Ito et al. 2002). Les PDC sont considérablement flexibles dans la direction qu'elles donnent aux réponses cellulaires T, selon leur état de maturation et la nature et la concentration de l'antigène (Liu et al. 2001; Boonstra et al. 2003; Salio et al. 2004) (voir figure 05). Les PDC activées par le virus peuvent induire les cellules T $CD8^+$ à devenir des lymphocytes T cytotoxiques (Fonteneau et al. 2003) (voir figure 05 d). Elles permettent également une polarisation T_H1-*like* puissante, induisant les cellules T $CD4^+$ à produire de larges quantités d'IFN-γ et d'IL-10 (Cella et al. 2000; Kadowaki et al. 2000) (voir figure 05 c) Cette polarisation des T $CD4^+$vers T_H1 peut également être obtenue grâce à des PDC activées par CpG ODN+CD40L et serait due à une production d'IL-12 par les PDC (Krug et al. 2001) (voir figure 05 b). Les PDC exprimant la molécule de costimulation OX40L et produisant peu d'IFN de type I, activées par IL-3+CD40L, permettent plutôt une polarisation T_H2, *via* un mécanisme dépendant du OX40L (Ito et al. 2004), induisant les cellules T à produire de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 (voir figure 05 f). Une troisième orientation des lymphocytes T naïfs a été découverte assez récemment et nommée T_H17 pour rappeler la production d'IL-17 par ces cellules T effectrices. Les cellules T naïves seraient polarisées vers T_H17 suite à une stimulation cytokinique comprenant le TGF-β et l'IL-6, puis cette polarisation serait amplifiée et stabilisée par addition d'IL-23. La cellule T_H17 sécrète de l'IL-17A, IL-17F, IL-6, TNF-α et des chimiokines pro-inflammatoires et pourrait jouer un rôle dans la lutte contre des pathogènes différents de ceux ciblés par les T_H1, tout comme dans le développement de certaines formes d'auto-immunité et d'inflammation chronique (pour revues, voir (Harrington et al. 2006; Weaver et al. 2006)). Dans ce cadre, l'étude menée par Vanden Eijnden *et al.* montre que les MDC dérivées de PBMC humaines adultes, tout comme les MDC dérivées de cellules mononucléées de sang de cordon sont capables de sécréter de l'IL-23 en réponse aux ligands des TLR2, 3, 4 et 8 (Pam_3CSK_4, poly(I :C), LPS et R848) et d'induire la sécrétion d'IL-17 par des cellules T $CD8^+$ néonatales activées de façon polyclonale (Vanden Eijnden et al. 2006). Les MoDC néonatales étant incapables de synthétiser de l'IL-12(p35) après

activation par LPS ou poly(I :C), cette sécrétion d'IL-23 pourrait jouer un rôle compensatoire dans la défense immunitaire contre les pathogènes. Les PDC néonatales présentent un défaut de sécrétion d'IFN-α en réponse au R848 et au CpG, ce qui les rend inaptes à polariser une réponse T_H1. Il se pourrait donc que les PDC néonatales utilisent également l'axe IL-23/IL-17 en compensation de la sécrétion d'IFN-α (Willems 2006), bien que les PDC adultes ne sécrètent pas d'IL-23 en réponse aux ligands des TLR3, 4, 7 ou 9 (Waibler et al. 2007) (voir figure 05 g).

Les PDC peuvent également induire l'activation des lymphocytes B en plasmocytes. Jego et al. (Jego et al. 2003) ont montré que, quand les PBMC totales d'un donneur vacciné avec un vaccin *influenza* étaient cultivées avec le virus *influenza*, de grandes quantités d'anticorps IgG polyclonaux spécifiques du virus étaient induites. Cette réponse anticorps spécifique du virus *in vitro* pouvait être complètement abolie en éliminant les PDC des PBMC cultivées. Cette étude montrait également que deux cytokines sécrétées par les PDC activées par le virus, l'IFN-α et l'IL-6 (Kadowaki et al. 2000), agissaient séquentiellement pour induire les cellules B spécifiques du virus à se différencier en plasmoblastes puis à devenir des plasmocytes matures (Jego et al. 2003) (voir figure 05 i). Une autre étude a démontré que l'activation des cellules B humaines passant par le TLR7 nécessitait la présence des PDC contrairement à l'activation induite par le TLR9. En effet, la sécrétion d'IFN de type I par les PDC permettait d'induire l'expression sélective de TLR7 à la surface des cellules B (Bekeredjian-Ding et al. 2005).

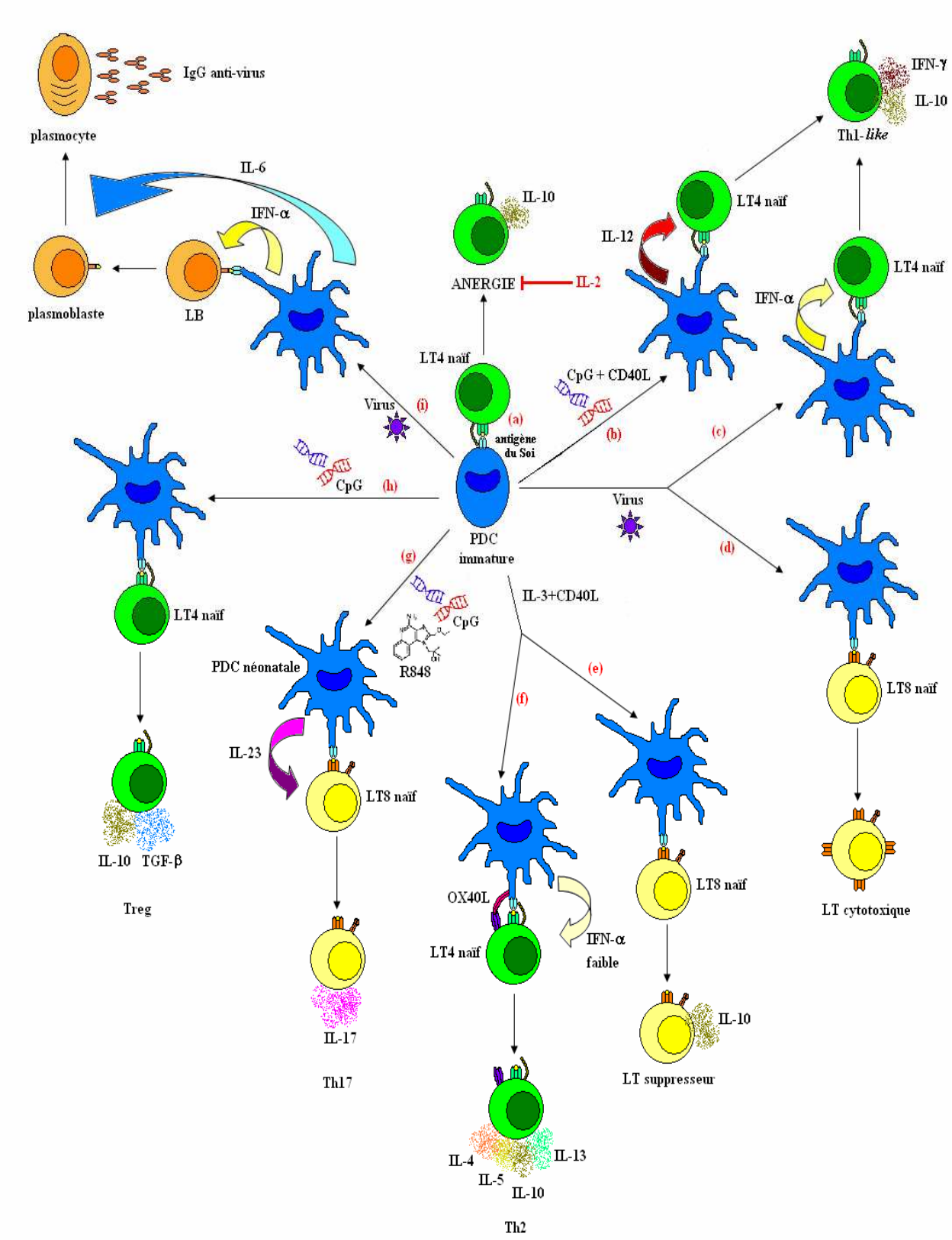


Figure 05. Plasticité de la réponse immune adaptative induite par les PDC humaines selon le signal qu'elles reçoivent.

9. PDC et Tolérance

Dans des conditions physiologiques normales, la tolérance au Soi est établie et maintenue par délétion des cellules T auto-réactives et par la régulation active de cellules qui échappent à la délétion. Dans ce contexte, les cellules T_{reg} sont vitales pour maintenir la tolérance au Soi. Des sous-populations variées de DC semblent impliquées dans le développement et l'homéostasie des cellules T_{reg}. Des signaux de maturation "incomplets" délivrés aux DC immatures (acquisition de capacités migratoires vers les ganglions lymphatiques drainants sans augmentation d'expression de molécules de costimulation et redistribution des molécules du CMH de classe II du compartiment intracellulaire vers la membrane) mènent à la tolérance des cellules T (Saas and Tiberghien 2002). Cette particularité pourrait servir à faciliter la prise de greffe en diminuant les risques de rejet.

Parmi ces DC, les PDC portant un allo-antigène sont la principale sous-population impliquée dans la tolérance en transplantation d'organe solide vascularisé, induites par la thérapie combinée de transfusion spécifique du donneur et anticorps anti-CD40L (Tang and Bluestone 2006). L'effet tolérogène de ces PDC semble passer par le recrutement actif et l'induction de cellules T_{reg} $Foxp3^+$ spécifiques de l'allo-antigène. En effet, des PDC devenues matures par la liaison du TLR9 peuvent induire la génération de cellules T_{reg} $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ *in vitro* productrices d'IL-10 et TGF-β (Moseman et al. 2004) (voir figure 05 h).

Il semblerait aussi que les PDC induisent des cellules T $CD4^+CD25^+$ régulatrices, capables de supprimer la prolifération cellulaire T de manière indépendante de l'antigène (Moseman et al. 2004) (voir figure 05 h).

Par ailleurs, la stimulation de PDC murines *via* OX2L et B7 (les récepteurs respectifs de OX2 et du CTLA-4 ou du CD28) induit la production de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Liu et al. 2001; Fallarino et al. 2005). Cette enzyme mène à la diminution du tryptophane et à la génération de métabolites toxiques, qui ont un fort effet inhibiteur sur la prolifération et la survie des cellules T et pourraient contribuer au potentiel tolérogène de ces cellules. L'IDO est impliquée dans la tolérance à l'allo-greffe.

Chez l'homme, les PDC fraîchement isolées induisent l'anergie de clones de cellules T $CD4^+$ avec des spécificités antigéniques variées. La production d'IL-2 et d'IFN-γ par les

cellules T est empêchée tandis que la production d'IL-10 est augmentée. L'anergie est levée par l'addition d'IL-2 exogène (Kuwana 2002) (voir figure 05 a).

Contrairement aux MDC, la capacité des PDC à initier une production d'IL-10 par les cellules T est maintenue après différenciation en PDC matures activées. Les PDC activées par l'IL-3 et le CD40 polarisent les cellules T $CD4^+$ naïves vers T_H2 (produisant l'IL-4, IL-5 et IL-10) (Rissoan et al. 1999; Ito et al. 2001; Ito et al. 2004) et les cellules T $CD8^+$ naïves vers des cellules T $CD8^+$ suppresseurs (produisant l'IL-10) (Gilliet and Liu 2002) (voir figure 05 e). Les PDC induites par le virus initient la production d'IFN-γ et IL-10 par les cellules T naïves (Kadowaki et al. 2000; Kawamura et al. 2006). Ces études suggèrent que les PDC matures ont une capacité intrinsèque à initier la production d'IL-10 par des cellules T naïves, sans tenir compte de leurs états de maturation et des signaux d'activation. Les résultats d'une étude suggèrent en effet que les PDC pourraient jouer un rôle critique dans la suppression des réponses immunes asthmatiques aux antigènes inhalés (de Heer et al. 2004).

10. Présence et rôle des PDC dans les maladies humaines

Comme nous l'avons vu, à l'état physiologique, les PDC ne sont retrouvées que dans le sang, les ganglions lymphatiques, les amygdales, le thymus et les poumons. Cependant, en conditions pathologiques, lors d'une infection virale ou en association avec des tumeurs ou des maladies auto-immunes, les PDC sont présentes dans les tissus concernés et elles semblent jouer, selon l'état immature, tolérogène ou activé dans lequel elles sont, un rôle dans le développement de la pathologie ou un rôle dans les tentatives du système immunitaire pour l'éliminer. Un troisième cas est représenté par les PDC inactivées par l'environnement pathogénique et qui ne peuvent donc pas exercer leur fonction de cellules immunitaires.

Un certain nombre d'études a également rapporté la présence et les fluctuations de la population de PDC au cours de pathologies auto-immunes ou allergiques sans qu'on puisse déterminer si la corrélation entre la gravité de la maladie et le nombre de PDC signifie que ces cellules constituent un facteur aggravant ou bien si ces dernières ont été recrutées pour lutter contre la maladie mais sont malencontreusement inactivées ou éliminées. Par exemple, des PDC infiltrant la muqueuse respiratoire pendant l'allergie (Jahnsen et al. 2000) ou l'infection par le RSV (*Respiratory Syncitial Virus*) (Gill et al. 2005) ont été décrites. Le RSV est le principal agent causant la bronchiolite et la pneumonie virale chez les enfants et les nouveaux-nés. Il semble recruter les PDC dans le compartiment nasal, en corrélation avec une diminution significative des PDC dans le sang. Les PDC sont également présentes dans le

liquide synovial, dans les cas de polyarthrite rhumatoïde et de rhumatisme psoriasique (Lande et al. 2004).

Dans la plupart des cas, les PDC sont retrouvées en grand nombre à l'état immature dans ces lésions allergiques et elles ont été recrutées depuis le sang par chimiotactisme.

10.1. Rôle des PDC dans le développement de la pathologie

10.1.1. PDC et IFN-α dans les pathologies auto-immunes :

Les nombres de PDC circulantes sont diminués dans les patients atteints de lupus érythémateux systémique (SLE), mais de grands nombres de PDC activées infiltrent les lésions cutanées et produisent activement l'IFN de type I chez ces patients (Farkas et al. 2001). Les PDC ont également été retrouvées dans la dermatite atopique et le psoriasis (Gilliet et al. 2004). Dans ces pathologies auto-immunes, lorsque les PDC sont activées, leur sécrétion de quantités importantes d'IFN de type I est un élément aggravateur de la pathologie.

Les hauts niveaux d'IFN-α dans les sera des patients atteints de SLE sembleraient activer le déclenchement par les MDC de l'autoimmunité induite par les cellules T (Blanco et al. 2001), ainsi que la stimulation de la différenciation des cellules B en plasmocytes (Jego et al. 2003). Des études récentes ont montré que l'expression des gènes de l'IFN de type I et des gènes induits par l'IFN représentaient les signatures moléculaires les plus frappantes des cellules du sang périphérique de SLE (Baechler et al. 2003). Les IFN de type I représentent donc les molécules effectrices les plus importantes dans la pathologie du SLE, ainsi que les cibles pour le traitement du SLE.

Une étude récente a apporté un éclairage nouveau sur le mécanisme menant à l'activation des PDC et donc à la sécrétion d'IFN de type I responsable de la maladie (Means et al. 2005). En effet, le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune caractérisée par des auto-anticorps pathogènes dirigés contres des nucléoprotéines et l'ADN. L'étude a montré que les complexes immuns contenant de l'ADN dans le sérum de patients atteints de lupus stimulaient la production de cytokines et chimiokines par les PDC *via* une coopération entre le TLR9 et le CD32 (FcγRII). Une nouvelle interaction fonctionnelle entre récepteurs à Fc et TLR a donc été décrite, les complexes immuns étant libérés par le CD32 dans les lysosomes contenant des TLR9, induisant une cascade de signalisation menant à l'activation des PDC $CD32^{+}$. Par ailleurs, une autre étude a montré que les snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein particles*), des macromolécules cellulaires également ciblées par les auto-anticorps du SLE, comportaient des séquences d'ARN hautement conservées

capables de stimuler les TLR7 et 8 ainsi que d'activer la sécrétion de hauts niveaux d'IFN de type I par les PDC, responsable de l'initiation du SLE (Vollmer et al. 2005). Cette activation interviendrait aussi par l'intermédiaire du CD32, qui pourrait capter les complexes immuns formés par les auto-anticorps dirigés contre les snRNP.

10.1.2. PDC tolérogènes dans les tumeurs solides :

Dans les tumeurs de cancer du sein, des nombres élevés de PDC $CD123^+$ infiltrantes sont corrélés avec un risque accru de dissémination tumorale et de rechute (Treilleux et al. 2004) et dans les carcinomes ovariens, de grands nombres de PDC ont été trouvées dans les liquides d'ascite. Ces PDC, qui semblent avoir été attirées par la chimiokine SDF-1, induisent des cellules T régulatrices productrices d'IL-10 (Zou et al. 2001), ou bien produisent du TNF-α et de l'IL-8, favorables à l'angiogénèse (Curiel et al. 2004).

Ces découvertes suggèrent que les MDC et les PDC immatures à l'intérieur de la tumeur solide sont incapables d'induire des réponses immunes anti-tumorales mais à la place pourraient induire des cellules T régulatrices qui inhibent l'immunité anti-tumorale.

10.2. PDC inactivées par l'environnement pathologique

10.2.1. Absence d'activation ou de maturation efficaces dans les tumeurs :

Des PDC péritumorales immatures ont été retrouvées dans le mélanome (Salio et al. 2003; Vermi et al. 2003). De plus, l'expression de TLR9 des PDC retrouvées dans le carcinome de la tête et du cou était diminuée par l'environnement tumoral, les rendant incapables de sécréter de l'IFN-α en réponse à un signal adéquat et d'exercer ainsi leurs fonctions antitumorales (Hartmann et al. 2003). Dans les leucémies myéloïdes aiguës, les PDC ont une capacité altérée de maturation, et des activités allostimulatrice et de production d'IFN-α diminuées (Mohty et al. 2001), alors que dans les leucémies myéloïdes chroniques, le nombre de PDC circulantes est diminué (Mohty et al. 2002).

10.2.2. Absence d'activation efficace lors d'une infection HIV :

L'expression de CD4, CXCR4, et CCR5 par les PDC humaines a suggéré qu'elles pourraient être les cibles de l'infection HIV (Grouard et al. 1997; Penna et al. 2001). Le marquage immunohistochimique des amygdales et du thymus d'individus infectés par le HIV révèle la présence de PDC HIV $p24^+$, indiquant que les PDC sont infectées productivement par le virus HIV (Fong et al. 2002). Des études ont également démontré que les nombres de

PDC du sang périphérique sont diminués dans les stades avancés de l'infection HIV (Soumelis et al. 2001; Chehimi et al. 2002). La perte de PDC circulantes était corrélée avec une haute charge virale en HIV et l'apparition d'infections opportunistes et du sarcome de Kaposi (Soumelis et al. 2001). Les PDC ne pourraient donc pas exercer leurs activités de stimulation de l'immunité et de lutte anti-virale lors d'une infection HIV, étant elles-mêmes potentiellement détruites par l'infection.

10.3. Rôle des PDC dans la lutte immunitaire contre la pathologie

10.3.1. Spécialistes de la lutte anti-virale :

Une étude a montré que l'infection par RSV dans un modèle murin entraînait l'augmentation du nombre de MDC et PDC dans le poumon et ses ganglions drainants, avec une augmentation particulièrement soutenue pour les PDC, qui restaient jusqu'à 30 jours après infection. La déplétion des PDC entraînait par ailleurs une diminution de l'élimination du virus et une exacerbation de toutes les manifestations de la pathologie immuno-induite causée par l'infection du RSV (Smit et al. 2006). Les PDC semblent donc jouer un rôle protecteur durant l'infection par le RSV en modulant les réponses immunitaires locales.

Une autre étude a montré que les réponses $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques du CMV et du HIV-1 pouvaient être augmentées par les PDC activées par les ligands des TLR7 et 9 (Imiquimod et R848, et oligodéoxynucléotides CpG respectivement) (Lore et al. 2003).

D'autre part, les PDC présentes dans le carcinome du col utérin induit par le papillomavirus humain (HPV) expriment un récepteur potentiel des particules virales et sécrètent de l'IFN-α après activation par les particules virales. Elles pourraient donc jouer un rôle dans les réponses immunes naturelles contre HPV (Bontkes et al. 2005).

10.3.2. Aide à l'activation des PDC dans les tumeurs :

Les PDC humaines semblent exploiter le CD32 (FcγRII) pour internaliser des complexes antigène-anticorps, comme cela a déjà été montre dans le cas du lupus, ce qui conduirait à la présentation d'antigènes exogènes aux lymphocytes T. Une étude à montré que des PDC isolées de patients atteints de mélanome et vaccinés avec des MoDC autologues chargées avec la KLH étaient capables de stimuler une prolifération de cellules T spécifiques de la KLH. L'internalisation de la KLH par les PDC dépendait de la présence de sérum de patients vaccinés qui développaient une réponse anti-KLH. Les anticorps anti-CD32 inhibaient la capture et la présentation de l'antigène. CD32 serait donc un récepteur de capture

de l'antigène sur les PDC et la présentation d'antigènes par les PDC fonctionne mieux quand des anticorps circulants sont présents (Benitez-Ribas et al. 2006).

10.3.3. Rôle de l'imiquimod :

L'imiquimod est un agoniste du TLR7, qui agit sur le système immunitaire en induisant la production d'IFN-α et d'autres cytokines importantes pour la stimulation de l'immunité à médiation cellulaire, par les monocytes, macrophages et cellules dendritiques. L'imiquimod est utilisé en clinique pour le traitement des carcinomes basocellulaires, dont il induit la régression (Geisse et al. 2004). Ses effets ont été découverts par l'observation d'une aggravation de plaques psoriasiques après traitement local avec cet agoniste du TLR7. (Gilliet et al. 2004). L'exacerbation du psoriasis s'accompagnait d'une induction massive de l'activité IFN de type I dans les lésions, détectée par l'expression de MxA (témoin de l'activité IFN de type I) après thérapie par l'imiquimod. Des quantités importantes de PDC ont parallèlement été identifiées dans les lésions de peau psoriasiques, contrairement à la peau humaine normale ou à la dermatite atopique. Les PDC seraient donc vraisemblablement recrutées par l'imiquimod *via* leur TLR7 dans les lésions psoriasiques où elles libéreraient de grandes quantités d'IFN de type I.

L'imiquimod appliqué de façon locale sur la peau normale ou dans des mélanomes induits de façon intradermique chez la souris pourrait également recruter des cellules $CD4^+CD3^-$ probablement analogues aux PDC (Palamara et al. 2004). Le nombre de ces cellules PDC-*like* est corrélé avec la diminution des tumeurs induite par l'imiquimod, allant de la réduction significative à la régression complète, suggérant un rôle bénéfique de ces cellules dans le mélanome.

De la même manière, une étude sur des patients atteints de maladies épithéliales néoplasiques comme le carcinome basocellulaire et de maladies lymphoprolifératives de la peau comme le lymphome T cutané a montré que les PDC étaient recrutées et activées dans les deux types de lésions et qu'elles produisaient de l'IFN-α après traitement par l'imiquimod *in vivo*. L'imiquimod induisait également des profils d'activation immune similaires dans les deux maladies, en association avec le nombre de PDC recrutées au site du traitement (Urosevic et al. 2005).

Les ligands des TLR7 (comme l'imiquimod) et 9 (comme les CpG ODN), principaux récepteurs de reconnaissance des pathogènes présents sur les PDC pourraient donc constituer des candidats intéressants pour l'établissement de thérapies anti-virales et anti-cancéreuses.

11. Les Leucémies à PDC (LPDC)

Cette nouvelle entité leucémique dérivée des PDC a été décrite assez récemment au laboratoire (Chaperot et al. 2001). La leucémie/lymphome à PDC est une néoplasie hématologique rare qui ne représentait que 95 cas potentiels dans la littérature mondiale en 2003 (Jacob et al. 2003). Les lésions cutanées de quelques millimètres à plus de 10 centimètres, largement envahies par les PDC tumorales, isolées au moment du diagnostic, sont les symptômes les plus constants de la maladie, affectant plus de 90% des patients. En clinique, cette pathologie agressive progresse fréquemment et rapidement (quelques mois) vers la leucémie, avec une dissémination des PDC tumorales dans le sang, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et d'autres organes lymphoïdes et non-lymphoïdes (rate, foie, système nerveux central, amygdales, muqueuses, poumons, reins, muscles…) (Feuillard et al. 2002). L'analyse des lésions cutanées montre une infiltration dermique de cellules mononucléées sans angiotropisme, sans destruction des vaisseaux atteignant le tissu adipeux, mais épargnant toujours l'épiderme.

Les PDC leucémiques partagent leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec leurs homologues normaux, à l'exception, peut-être, du CD56, exprimé sur les LPDC et absent de la surface des PDC normales (Bendriss-Vermare et al. 2004; Chaperot et al. 2004), mis à part sur certaines sous-populations (MacDonald et al. 2002), comme les NKPDC (Ghanekar 2006). Elles sont caractérisées par leur phénotype: $CD4^+$, $CD56^+$, $CD3^-$, $CD13^-$, $CD33^-$ et $CD19^-$. Des analyses complémentaires vérifiant l'expression de marqueurs plus spécifiques des PDC les montrent comme étant également HLA-DR^+, $CD123^{+fort}$, $CD116^{faible}$, $CD45RA^+$, BDCA-2^+ ou BDCA-4^+. Ces analyses peuvent être utiles pour confirmer l'identité des cellules en cas de phénotype initial atypique, surtout lors d'une négativité du CD56 ou d'une expression de CD33 (Garnache-Ottou et al. 2005).

De plus, les LPDC surexpriment l'ARNm codant pour la chaîne lymphoïde J caractéristique de la cellule B et les chaînes légères des immunoglobulines λ et κ (Briere et al. 2002) ; elles polarisent les cellules T naïves vers les voies T_H1 ou T_H2 (Chaperot et al. 2004) selon le signal d'activation reçu.

Le développement clinique de cette pathologie rare est toujours agressif, conduisant à la mort en trois ans malgré une réponse initiale à la chimiothérapie (Jacob et al. 2003). Dans une série de 23 patients rapportée en 2002, seuls deux patients allo-transplantés ont survécu à long terme (Feuillard et al. 2002). Etant donné ce faible résultat, la nécessité d'alternatives thérapeutiques dans le traitement des leucémies à PDC est devenue évidente.

A cause de la faible fréquence des PDC dans le sang humain, de la difficulté à générer ce type de cellules à partir de cellules $CD34^+$ et du temps et du coût qu'il faut compter pour les isoler, l'établissement d'une lignée facilite grandement l'étude de ces cellules. Au laboratoire, nous avons réussi à générer une lignée de PDC, établie à partir des LPDC. Cette lignée était, à notre connaissance, la seule lignée de LPDC humaines au monde à l'époque où elle a été brevetée (Chaperot and Plumas 2002). Depuis, une équipe japonaise a également publié l'établissement d'une nouvelle lignée cellulaire humaine de PDC (Maeda et al. 2005) et il a été fait mention d'une autre au congrès annuel de l'*American Society of Hematology* en 2006 (Narita 2006).

Dans la mesure où les cellules malignes partagent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles (Chaperot et al. 2004) avec leur homologue normal, ces LPDC et la lignée cellulaire GEN2.2 que nous allons décrire dans la partie "Résultats" représentent une source alternative de PDC.

12. Conclusion de la 1ère partie

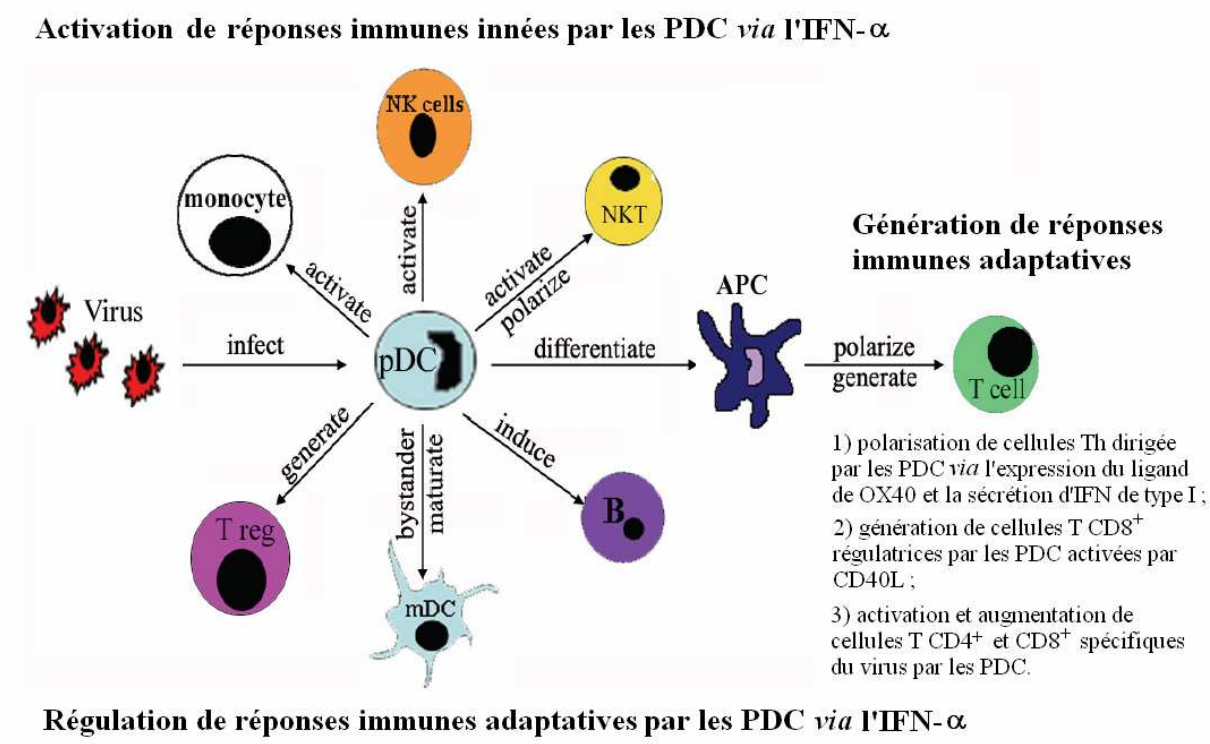


Figure 06. Les PDC, par le biais de leur sécrétion d'IFN de type I, jouent un rôle pivot dans l'activation de différentes cellules impliquées dans les réponses immunes innée et adaptative. D'après (Zhang and Wang 2005).

Les PDC sont une entité cellulaire différente des MDC et elles ne jouent pas le même rôle au sein du système immunitaire. Les deux types de cellules sont, en effet, localisées dans

des zones différentes (sites d'entrée des pathogènes comme la peau et les tissus des muqueuses pour les MDC et sang et zones T des tissus lymphoïdes pour les PDC), elles possèdent des récepteurs leurs permettant de reconnaître différents antigènes ou pathogènes (TLR2, 3, 4, 5, 8 pour les MDC et TLR7 et 9 pour les PDC) contre lesquels elles pourraient activer différentes réponses immunes *via* les cellules T. Un exemple de situation dans laquelle les deux sous-populations de DC n'ont pas la même réaction est l'infection par le HIV. Les MDC contribuent à l'expansion de l'infection en capturant le virus et en le transmettant aux cellules T tandis que les PDC inhibent sa réplication dans les cellules T grâce à la sécrétion d'IFN-α (Groot et al. 2006).

D'autre part, la PDC représente un lien intéressant entre immunité innée et immunité adaptative (voir figure 06), principalement par le biais de sa capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I (Zhang and Wang 2005) et pourrait être considérée comme la cellule impliquée de façon primordiale dans la lutte anti-virale.

2ème partie : Reconnaissance des pathogènes, et ensuite.

Le système immunitaire est capable de reconnaître les motifs moléculaires conservés des micro-organismes (PAMP = *pathogen-associated molecular pattern*). Les récepteurs responsables de cette reconnaissance sont donc appelés *pattern recognition receptors* (PRR) (Medzhitov and Janeway 1997). Parmi les PRR, les *Toll-like receptors* (TLR), des récepteurs très conservés dans l'évolution, homologues chez les mammifères du Toll initialement décrit chez la Drosophile, semblent être des éléments importants de reconnaissance du système immun inné (Akira et al. 2006). Cependant, la reconnaissance et la réponse de l'hôte aux pathogènes ne sont pas restreintes aux TLR. La deuxième catégorie regroupe les PRR cytosoliques, qui incluent la famille des RLR (*RIG-like receptors*) (comprenant Mda5 (*melanoma-differentiation-associated gene 5*) et RIG-I (*retinoic acid-inducible gene I*)), la PKR (*double stranded RNA-dependent proteine kinase*) inductible par l'IFN, et les NLR (*NOD-like receptors*) (comprenant, entre autres, les protéines NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)) (Janeway and Medzhitov 2002; Akira et al. 2006).

Un récepteur supplémentaire, RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), de la superfamille des immunoglobulines, est exprimé sur la membrane des cellules hématopoïétiques, dont les PDC, et reconnaît HMGB1 (*high mobility group box 1*), une protéine nucléaire qui va sortir du noyau et de la cellule après activation des PDC humaines par le TLR9. L'interaction de HMGB1 avec son récepteur RAGE pourrait induire la maturation et la sécrétion d'IFN de type I par les PDC (Dumitriu et al. 2005). Ces effets pourraient donc indirectement être liés à la reconnaissance de signaux microbiens par le TLR9.

13. Les TLR

13.1. Différents TLR identifiés et leurs ligands

Les TLR jouent un rôle crucial dans la détection des infections microbiennes. On connaît à ce jour 10 TLR chez l'homme (voir figure 09), qui reconnaissent spécifiquement divers composants issus des pathogènes (Takeda et al. 2003). Ces TLR sont exprimés différentiellement par les cellules. Ils présentent des homologies entre eux et transduisent majoritairement leur signal *via* deux voies aboutissant à des effets allant de la sécrétion d'IFN de type I à la production de chimiokines pro-inflammatoires.

13.1.1. Structure :

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type 1, fidèlement conservées au cours de l'évolution (Akira et al. 2001; Medzhitov 2001). Sur la base de la similarité de leurs domaines intracytoplasmiques, les TLR sont liés à la famille des récepteurs de l'IL-1. Chaque TLR contient un domaine extracellulaire riche en séquences répétées de leucine, participant à la reconnaissance du ligand, et un domaine intracellulaire contenant une région appelée *Toll-IL-1 receptor* (TIR) *homology domain*, requise pour l'initiation de la signalisation intracellulaire (voir figure 07). Ce domaine TIR est une structure phylogénétiquement conservée, que partagent les TLR, le domaine intracytoplasmique des récepteurs de l'IL-1 et de l'IL-18, ainsi que la protéine MyD88. Celle-ci est une protéine adaptatrice qui, après interaction avec les TLR par son propre domaine TIR carboxyterminal, active la transduction du signal liée à la fixation du ligand par le TLR. Les régions extracellulaires des TLR et de l'IL-1R sont très différentes. Alors que l'IL-1R possède un domaine *Ig-like*, les TLR contiennent des LRR (*leucine-rich repeat*), responsables de la reconnaissance des PAMP (Akira et al. 2006). Les gènes codant pour les TLR sont positionnés à différents endroits du génome, mais certains sont regroupés (TLR1, 6, 10 sur le chromosome 4, TLR7 et 8 sur le chromosome X).

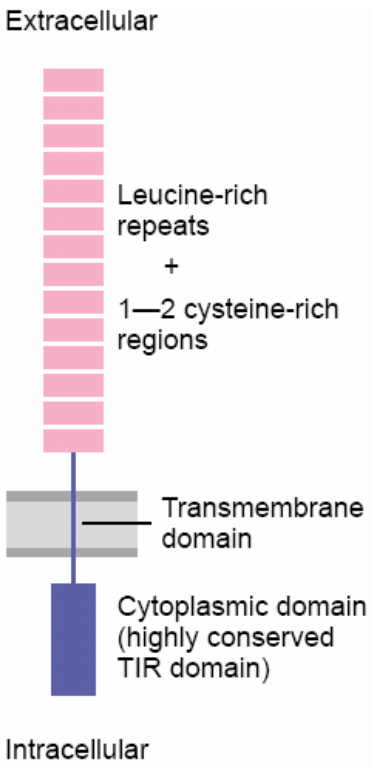


Figure 07. Structure des TLR. D'après (Cario 2003).

13.1.2. Expression cellulaire et tissulaire :

La plupart des tissus expriment au moins un TLR (Fearon and Locksley 1996; Lemaitre et al. 1996; Medzhitov and Janeway 2000; Akira et al. 2001). Les compartiments de l'organisme engagés dans la réponse immune, ainsi que les tissus les plus exposés à l'environnement microbien (poumon, intestin grêle, côlon), possèdent le plus grand répertoire de TLR. Le répertoire des TLR exprimés par les cellules mononucléées du sang circulant a fait l'objet de nombreuses études par RT-PCR quantitative, montrant que le répertoire Toll est variable selon les cellules. Ainsi, les TLR1 et 6 sont exprimés dans tous les types cellulaires ; les TLR 2, 4, 5 et 8, de leur côté, sont principalement présents dans les monocytes $CD14^+$, tandis que les TLR9 et 10 sont exprimés à un niveau élevé dans les cellules B $CD19^+$. Le TLR3 est, quant à lui, exprimé par les MDC et les cellules NK (Sivori et al. 2004). Les PDC

expriment les TLR7 et 9, à un niveau élevé. La variété et le niveau d'expression des TLR varie en fonction de la maturation du monocyte vers la cellule dendritique : ainsi, l'expression du TLR3 est accrue lors du passage du monocyte vers la cellule dendritique immature, tandis que celle du TLR5 décroît.

TLR	Ligands	Types cellulaires
TLR1	lipoprotéines triacylées bactériennes	la plupart des types cellulaires, dont les MDC, les PDC, les cellules B, les monocytes et les cellules NK
TLR2	peptidoglycane bactérien ; particules de levures zymogènes ; lipoprotéines bactériennes ; glycolipides spirochete ; LPS atypique ; lipoarabinomannane mycobactérien ; protéines de choc thermique hsp60, hsp70 et hsp90	MDC, monocytes, cellules épithéliales, leucocytes polynucléaires et cellules microgliales
TLR3	ARN double-brin viral ; poly(I:C)	MDC, cellules NK, cellules neurales et astrocytes
TLR4	LPS bactérien Gram-négatif ; glycoprotéines virales ; produit de plante Taxol	MDC, monocytes, macrophages, cellules endothéliales, cellules épithéliales, lignées cellulaires de mélanome et autres types cellulaires
TLR5	Flagellines bactériennes	MDC, cellules épithéliales, monocytes, cellules NK et cellules T
TLR6	lipoprotéines diacylées mycoplasmiques ; acide lipotéichoïque ; particules de levures Zymosan	cellules B, monocytes, cellules NK et cellules épithéliales ; un peu sur les MDC et PDC
TLR7	analogues de guanine (tels que R848, loxoribine et imiquimod) ; ARN simple-brin viral ; ARN ou petits ARN interférents dirigés contre les ARNm viraux et/ou humains synthétisés chimiquement, attachés au liposome ; complexes immuns contenant de ARN du Soi	PDC, cellules B et monocytes
TLR8	R848 ; ARN simple-brin viral ; ARN ou petits ARN interférents dirigés contre les ARNm viraux et/ou humains synthétisés chimiquement, attachés au liposome	MDC, cellules NK, cellules T, cellules B et monocytes
TLR9	ADN-CpG non-méthylé viral ou bactérien ; ADN ; oligonucléotides CpG ; complexes immuns contenant de l'ADN de Soi	PDC, cellules B, macrophages, monocytes, cellules NK, leucocytes polynucléaires et cellules épithéliales
TLR10	Inconnu	PDC, cellules B et MDC

Tableau 03. Répartition de l'expression des TLR humains, et leurs ligands. Adapté de (Sioud 2006).

13.1.3. Reconnaissance de PAMP :

Les TLR reconnaissent des structures moléculaires associées aux pathogènes, les PAMP (Fearon and Locksley 1996; Lemaitre et al. 1996; Medzhitov and Janeway 2000; Akira et al. 2001). Ces molécules, spécifiques des bactéries, sont très conservées, et présentes dans de nombreuses familles bactériennes. La stratégie de l'immunité innée n'est donc pas de

reconnaître tous les antigènes possibles, mais un petit nombre d'entre eux, sous la forme de structures hautement conservées présentes dans un important groupe de micro-organismes.

De nombreux ligands des TLR (TLR2, 3, 4, 5, 9) ont été mis en évidence : la multiplicité des agonistes possibles, de même que la diversité de structure des différents TLR, n'ont pour l'instant pas reçu d'explication satisfaisante. D'autres TLR ne semblent pas avoir de ligand spécifique : ainsi, les TLR1, 6 et 10 seraient des corécepteurs, agissant en association avec les autres TLR en modulant leur réponse. Les rôles des TLR8 et 10 sont, quant à eux, encore à préciser.

Tous les TLR ne sont pas exprimés par les mêmes types cellulaires, mais ils sont également localisés différemment au sein d'une même cellule. En effet, les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10 sont présents à la surface membranaire alors que les TLR3, 7, 8 et 9 se retrouvent à l'intérieur de la cellule, dans des endosomes.

13.1.4. Les TLR membranaires et leurs ligands :

13.1.4.1. Le TLR1

Le **TLR1** est exprimé de façon prédominante dans la rate et les cellules du sang périphérique. Il est présent dans les MDC et les PDC (voir tableau 03). Aucun ligand direct n'a été identifié pour l'instant pour le TLR1, et sa fonction reste peu claire. Il semble agir en tant que corécepteur pour le TLR2. Les TLR1 et 2 forment des hétérodimères à la surface cellulaire et dans le cytosol (Sandor et al. 2003).

13.1.4.2. Le TLR2

Le **TLR2** est exprimé par les MDC mais pas par les PDC (voir tableau 03). Il est impliqué dans la reconnaissance d'une grande variété de molécules microbiennes. Il reconnaît l'acide lipotéichoïque (LTA) et les lipoprotéines (LP) des bactéries $Gram^+$, le lipoarabinomannane des mycobactéries, et le zymosan des parois cellulaires des levures. De plus, le TLR2 participe à la reconnaissance de certains types de lipopolysaccharides (LPS). Il est connu pour s'hétérodimériser avec d'autres TLR, une propriété qui pourrait étendre encore l'éventail des molécules microbiennes qu'il peut reconnaître (Ozinsky et al. 2000). Le TLR2 coopère avec le TLR6 en réponse au lipopeptide diacylé mycoplasmique, et s'associe avec le TLR1 pour reconnaître les lipopeptides triacylés. De plus, la reconnaissance des pathogènes par le TLR2 est fortement augmentée par le CD14.

13.1.4.3. Le TLR4

Le **TLR4** a été le premier TLR humain identifié. Il est présent dans les MDC mais pas les PDC (voir tableau 03). Il reconnaît le LPS des bactéries Gram$^-$. Cependant, le TLR4 seul n'est pas suffisant pour induire une réponse au LPS. Il a besoin que MD-2, une molécule sécrétée, interagisse de façon fonctionnelle avec le LPS (Shimazu et al. 1999). De plus, deux autres protéines, le CD14 et LBP (*LPS binding protein*), participent également à la signalisation du LPS en contrôlant la présentation du ligand au complexe récepteur et en influençant l'amplitude des réponses (Miyake 2006). Cette signalisation passe par plusieurs protéines adaptatrices : MyD88, TIRAP/Mal (Horng et al. 2001), TRIF/TICAM1 et TRAM/TICAM2 (Fitzgerald et al. 2003).

13.1.4.4. Le TLR5

Le **TLR5** est exprimé dans les MDC mais pas les PDC (voir tableau 03). Il reconnaît la flagelline des bactéries Gram$^+$ et $^-$, une protéine pro-inflammatoire nécessaire à la propulsion bactérienne. La flagelline pourrait jouer un rôle dans la résistance aux infections à salmonelles. L'activation du récepteur stimule la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF-α, à travers la signalisation *via* la protéine adaptatrice MyD88 et la kinase à sérine IRAK (Gewirtz et al. 2001; Hayashi et al. 2001). Le TLR5 peut générer un signal pro-inflammatoire en tant qu'homodimère, suggérant qu'il pourrait être le seul TLR participant à la reconnaissance de la flagelline (Hayashi et al. 2001). Cependant, le TLR5 pourrait nécessiter la présence d'un corécepteur ou d'une molécule adaptatrice pour une reconnaissance du ligand et/ou une signalisation efficaces (Tallant et al. 2004).

13.1.4.5. Le TLR6

Le **TLR6**, qui est étroitement lié au TLR1, est présent dans les MDC et les PDC (voir tableau 03). Le TLR6 coopère avec le TLR2 pour reconnaître les LP diacylées trouvées dans les mycoplasmes, mais n'est pas requis dans la reconnaissance des LP triacylées trouvées dans les bactéries (Takeuchi et al. 2001).

13.1.4.6. Le TLR10

Le **TLR10** est préférentiellement exprimé sur les cellules immunitaires présentes dans les tissus lymphoïdes comme la rate, le ganglion lymphatique, le thymus, et les amygdales. Il est présent dans les MDC et dans les PDC (voir tableau 03). Sa fonction et son ligand direct sont toujours inconnus (Chuang and Ulevitch 2001). Une analyse phylogénétique indique que

Encadré 6: Le virus *Influenza*: structure

Les virus de la grippe appartiennent à la famille Orthomyxoviridae des virus enveloppés et constituent le genre *Influenzavirus*. Ce sont des virus à ARN simple brin de polarité négative. On en dénombre trois principaux sérotypes (Influenza A, B ou C) qui ont des caractéristiques différentes, mais leur morphologie reste plus ou moins semblable.
Il s'agit de particules sphériques d'une taille variant entre 80 et 120 nm de diamètre.

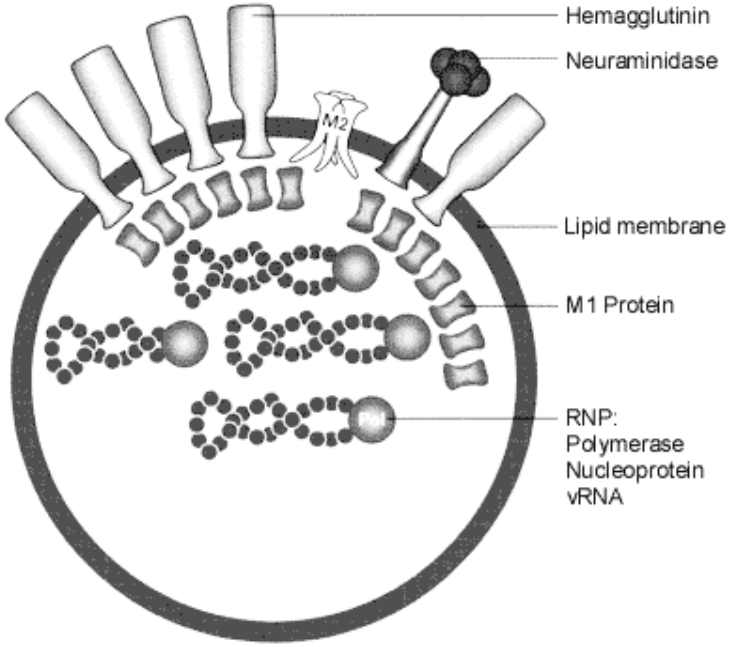


Figure 3. Structure du virus *Influenza*. D'après *Xing Han*

Les 8 segments d'ARN du virus de type A (codant pour 10 protéines virales) sont encapsidés indépendamment par les nucléoprotéines virales (NP). Chaque segment est associé avec un complexe polymérase et forme ainsi une particule ribonucléoprotéine (RNP). Les RNP sont localisées à l'intérieur d'une barrière de protéines matricielles (M1) qui bordent la double couche de lipides virale. Celle-ci est dérivée de la membrane plasmique de la cellule infectée pendant le processus de bourgeonnement. Trois protéines sont enclavées dans cette membrane: deux glycoprotéines formant des spicules, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (N), et un canal membranaire (M2). HA est un trimère de sous-unités identiques qui porte les activités de liaison au récepteur et de fusion membranaire.

Le virus de la grippe pénètre dans l'organisme principalement par voie aérienne, *via* le système respiratoire et amorce son cycle de réplication dans une des cellules ciliées ou épithéliales de l'arbre respiratoire supérieur pour créer de nouveaux virus infectieux.

parmi les TLR humains, le TLR10 est plus proche du TLR1 et du TLR6. Ces observations suggèrent que le TLR10 est impliqué dans la réponse immunitaire comme les autres TLR connus. Des variations génétiques du TLR10 semblent contribuer au risque asthmatique (Lazarus et al. 2004).

13.1.5. Les TLR endosomaux et leurs ligands :

Une étude récente a montré que le TLR3 était ciblé dans les endosomes par une séquence de 23 acides aminés présente dans la région lien entre le domaine transmembranaire et le domaine TIR (Nishiya et al. 2005). En revanche, la localisation endosomale des TLR7 et 9 est obtenue par leur domaine transmembranaire. Malgré les différences dans le mécanisme par lequel ils sont localisés, ces récepteurs sont en fait colocalisés préférentiellement près des phagosomes contenant des particules de cellules apoptotiques (Nishiya et al. 2005). Après une infection virale, les phagocytes capturent les cellules apoptotiques infectées, et des hydrolases lysosomales induisent la libération des ARN dérivés du virus, facilitant ainsi l'accès des TLR endosomaux à leurs ligands ARN respectifs. Bien que l'ARN viral pourrait être reconnu par les TLR anti-viraux (Kato et al. 2005) il faut noter que l'ARN double-brin dérivé de virus pourrait aussi être reconnu par l'hélicase à ARN cytosolique RIG-I, induisant l'IFN de type I de manière indépendante des TLR (Yoneyama et al. 2004; Seth et al. 2006). Plus récemment, une autre étude a révélé que la localisation endosomale du TLR9 facilitait l'accès à l'ADN viral et empêchait la reconnaissance de l'ADN du Soi (Barton et al. 2006).

Cette localisation endosomale des TLR7 et 9 est suggérée par l'utilisation d'inhibiteurs de l'acidification endosomale comme la chloroquine, qui inhibent les réponses des PDC aux virus (Lund et al. 2003; Diebold et al. 2004; Lund et al. 2004). La reconnaissance des virus à ADN et à ARN simple-brin par ces TLR ne nécessite pas une réplication virale active (Lund et al. 2003; Diebold et al. 2004; Hochrein et al. 2004; Krug et al. 2004; Lund et al. 2004). Il est donc possible que, après liaison et fusion aux cellules, les virus à ADN et à ARN simple-brin soient internalisés puis incorporés dans un endosome. Leur enveloppe fusionnerait ensuite avec la membrane de l'endosome, ce qui libèrerait la nucléocapside dans le cytosol. Mais au cours du séjour un peu délétère dans le milieu acide de l'endosome, une partie de l'ADN et de l'ARN simple-brin pourrait être libérée pour interagir avec les TLR.

13.1.5.1. Le TLR3

Le **TLR3** est exprimé dans les MDC mais pas les PDC (voir tableau 03). Il reconnaît l'ARN double-brin, une structure moléculaire associée aux infections virales, produite par de

Encadré 7: Le virus *Influenza*: cycle de réplication

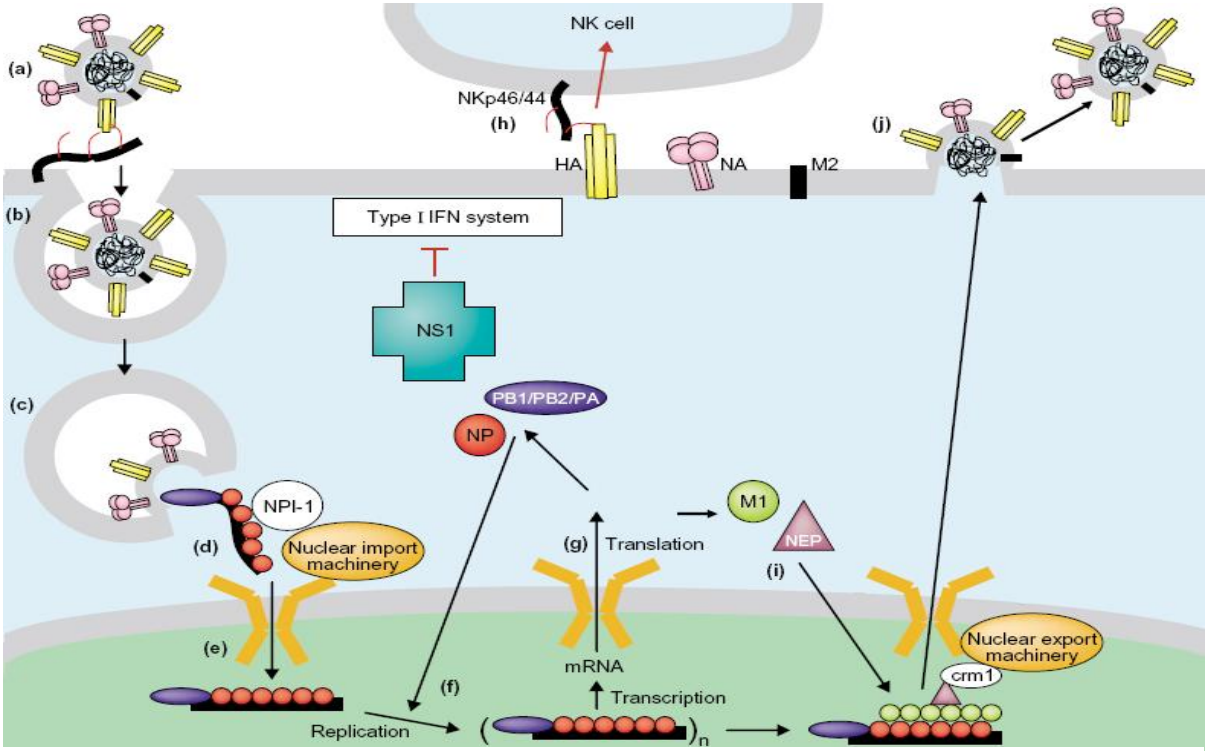


Figure 4. Cycle de réplication du virus *Influenza*. Adapté *de* (Yewdell and Garcia-Sastre 2002).

(a) Le virus se lie à l'aide de ses HA aux récepteurs contenant de l'acide sialique présents à la surface de la membrane plasmique de la cellule hôte. (b) Les virions sont internalisés dans des endosomes. (c) Quand le pH endosomal devient suffisamment acide (autour de 5-6), une altération conformationnelle des HA induit la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale. (d) L'acide nucléique viral est libéré dans le cytosol sous la forme de RNP. L'efficacité de la libération dépend de l'activité de canal à ions de la protéine M2. (e) Un signal de localisation nucléaire sur la NP facilite l'import des RNP virales entrantes dans le noyau de la cellule hôte *via* des interactions avec la protéine cellulaire NPI-1 ou karyophérine-α. (f) Une fois dans le noyau, la réplication et la transcription de l'ARN sont initiées par la polymérase à ARN dépendante de l'ARN viral, qui est un complexe de trois protéines virales (la sous-unité de polymérase basique 1 (PB1), la sous-unité 2 (PB2) et la sous-unité de polymérase acide (PA)). (g) Les ARNm viraux sont transportés vers le cytosol et traduits en 11 protéines définies. Les protéines NP et polymérases nouvellement synthétisées retournent vers le noyau pour amplifier encore la réplication de l'ARN. Les protéines HA, N et M2 entrent dans le réticulum endoplasmique et sont transportées vers la membrane plasmique. (h) HA se lie aux protéines NKp46 et NKp44, activant les cellules NK, qui mobilisent le système immunitaire inné contre le virus. Pendant ce temps, la protéine non-structurale 1 (NS1) désarme le mécanisme de défense antivirale de l'hôte médié par le système de l'interféron de type I. Tandis que le cycle d'infection progresse, M1 et les protéines d'export nucléaire (NEP) migrent dans le noyau (i) et déclenchent l'export des RNP vers le cytosol. Ce processus semble être médié par l'interaction des RNP avec la protéine cellulaire CRM1. Le bourgeonnement viral se produit sur la membrane plasmique (j) *via* l'interaction des cœurs de RNP recouverts de M1 avec les protéines de membrane plasmique virales, excluant les protéines de l'hôte dans le processus. L'agrégation virale passant par l'interaction des HA avec les acides sialiques est empêchée par la désialylation des glycoprotéines virales médiée par les N, qui permettent aussi la libération de virus à partir de la surface cellulaire.

nombreux virus durant leur étape de réplication. La stimulation avec le poly(I:C) (polyinosine - acide polycytidylique), un analogue synthétique du dsRNA, semble passer par le TLR3 (Alexopoulou et al. 2001). Celui-ci transmettrait le signal principalement par une voie indépendante de MyD88, impliquant la protéine adaptatrice TRIF/TICAM1 qui mène à la production d'IFN-β et induit la maturation des cellules dendritiques (Yamamoto et al. 2002).

13.1.5.2. Les TLR7 et 8

13.1.5.2.1. Expression

Le **TLR7**, qui est exprimé dans les PDC (voir tableau 03), est phylogénétiquement proche du TLR8 et du TLR9 (Chuang and Ulevitch 2000). Le **TLR8** a été identifié avec le TLR7 et le TLR9 et est exprimé plus abondamment dans les monocytes (Chuang and Ulevitch 2000), mais également les MDC, à la différence des PDC qui ne l'expriment pas (voir tableau 03).

13.1.5.2.2. Ligands imidazoquinolines

En utilisant des souris déficientes pour le TLR7 et des cellules HEK293 transfectées avec le TLR7 humain, Hemmi *et al.* ont démontré que les TLR7 murin (mTLR7) et humain (hTLR7) étaient impliqués dans la reconnaissance des composés imidazoquinolines (une famille de petites molécules antivirales synthétiques) imiquimod® (R837) et resiquimod (R848) (Hemmi et al. 2002). Le TLR8 humain (hTLR8) permet aussi la reconnaissance du R848 mais, de façon surprenante, pas du R837. Le TLR8 murin (mTLR8) ne reconnaît aucun de ces composants, ce qui pourrait suggérer que le TLR8 est non fonctionnel chez la souris (Jurk et al. 2002). De plus Lee *et al.* ont rapporté que les analogues de la guanosine, comme la loxoribine, activaient les cellules immunitaires *via* hTLR7 mais pas hTLR8 (Lee et al. 2003) (voir figure 08). Cette activation dépend de l'acidification et de la maturation des endosomes (Heil et al. 2003). La stimulation de PDC humaines exprimant TLR7 par le R848 et l'imiquimod mène à la production d'interférons de type I (IFN-α et -ω), tout comme d'autres cytokines ou chimiokines, dont le TNF-α et l'IP-10 (Gibson et al. 2002).

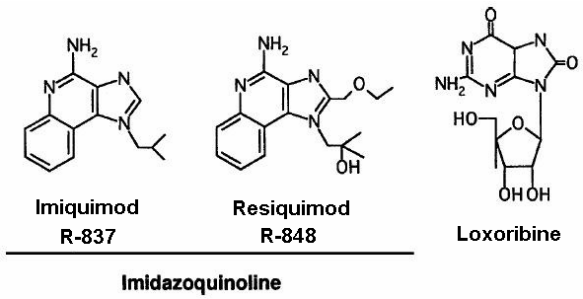


Figure 08. Exemple de structures reconnues par le TLR7.

Encadré 8 : Reconnaissance des virus par les PRR

Virus	type de virus	cible moléculaire	TLR	RIG/Mda5/PKR/?	Références
Measle virus (MV)	ARN simple brin positif	hémagglutinine	2	/	Bieback, J.Virol., 2002
Human cytomegalovirus (HCMV)	ADN double brin	/	2	/	Compton, J.Virol., 2003
Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)	ADN double brin	/	2 et 9	?	Krug, Blood, 2004 et Honda, Nature, 2005
Herpes simplex virus type 2 (HSV-2)	ADN double brin	ADN génomique	9	?	Lund, JEM, 2003 et Honda, Nature, 2005
Murine cytomegalovirus (MCMV)	ADN double brin	/	3 et 9	/	Tabeta, PNAS, 2004
Respiratory syncytial virus (RSV)	ARN simple brin négatif	protéine F	4	/	Kurt-Jones, Nat.Immunol., 2000
Mouse mammary tumor virus (MMTV)	ARN simple brin positif (retrovirus)	protéine d'enveloppe	4	/	Rassa, PNAS, 2002
Virus Influenza A	ARN simple brin négatif	ARN génomique	7 et 8	RIG-1	Diebold, Science, 2004 ; Lund, PNAS, 2004 et Kato, Immunity, 2005
Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)	ARN simple brin positif (retrovirus)	/	7 et 8	/	Heil, Science, 2004
Vesicular stomatitis virus (VSV)	ARN simple brin négatif	/	7 et 8	RIG-1	Lund, PNAS, 2004 et Kato, Immunity, 2005
Newcastle disease virus (NDV)	ARN simple brin négatif	/	/	RIG-1	Kato, Immunity, 2005
Sendai virus (SeV)	ARN simple brin négatif	/	7 et 8	RIG-1	Melchjorsen, J.Virol., 2005 et Kato, Immunity, 2005
Virus de l'encéphalite japonais	ARN simple brin positif	/	/	RIG-1	Kato, Immunity, 2005
Virus de l'encéphalomyocardite (EMCV)	ARN simple brin positif	/	/	Mda5	Kato, Nature, 2006
Virus de Theiler	ARN simple brin positif	/	/	Mda5	Kato, Nature, 2006
Virus Mengo	ARN simple brin positif	/	/	Mda5	Kato, Nature, 2006
	ARN double brin	/	/	PKR	
Virus Coxsackie B (CBV)	ARN simple brin	/	7 et 8	/	Triantafilou, Cell.Microbiol., 2005

13.1.5.2.3. Ligands naturels

Récemment, les ligands naturels des mTLR7 et hTLR8 ont été identifiés comme étant les ARN simple-brin (Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004; Lund et al. 2004). Le mTLR7 et le hTLR8 reconnaissent les virus à ARN simple-brin comme l'*influenza* (Diebold et al. 2004; Lund et al. 2004), le virus de Sendai (Melchjorsen et al. 2005) et le virus Coxsackie B (Triantafilou et al. 2005). L'interaction entre les ARN simple-brin et les mTLR7 et hTLR8 déclenche le recrutement de la molécule adaptatrice MyD88 menant à l'activation du NF-κB et d'autres facteurs de transcription et la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. Après stimulation avec les ARN simple-brin, les mTLR7 et hTLR8 induisent l'activation du NF-κB alors que le hTLR7 et le mTLR8 (potentiellement non-fonctionnel) échouent, impliquant une différence de spécificité d'espèces dans la reconnaissance des ARN simple-brin.

13.4.5.2.4. Ligands synthétiques ARN simple-brin et siRNA

Des ARN simple-brin viraux purifiés ou des ARN simple-brin synthétiques, complexés avec des lipides cationiques pour les protéger de la dégradation et faciliter leur internalisation, peuvent avoir le même effet que les virus. Bien que la spécificité de séquence reste peu définie, les ARN simple-brin contenant des séquences poly(U) ou riches en GU peuvent stimuler les mTLR7 et hTLR8 (Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004). Il a également été trouvé que des *duplex* de siRNA (*short interfering RNA*) synthétiques contenant un motif interne 5'-UGUGU-3' stimulaient les mTLR7 et hTLR8 (Judge et al. 2005). Les séquences poly(U) ou riches en GU pouvant être trouvées dans des ARN non viraux, il semblerait que les TLR7 et 8 soient capables de discriminer entre les ARN du Soi et viraux en reconnaissant la localisation endocytaire des ARN viraux. Un autre facteur distinguant l'ARN de mammifère de l'ARN viral ou de l'ARN bactérien est le niveau de modification de nucléosides. L'ARN microbien, qui est rarement modifié, est un activateur potentiel des DC *via* les TLR7, 8 et 3, contrairement à l'ARN de mammifère, qui contient des nucléosides modifiés en abondance (Kariko et al. 2005).

Il a également été montré que les siRNA étaient de puissants stimulateurs de la production d'IFN-α par les PDC murines et semblaient être reconnus par le mTLR7. En effet,

des souris déficientes pour ce récepteur n'étaient plus immunostimulées par les siRNA (Hornung et al. 2005).

13.1.5.3. Le TLR9

13.1.5.3.1. Expression et ligands

Le **TLR9** est exprimé dans le réticulum endoplasmique des cellules au repos (Latz et al. 2004). Il est très présent dans les PDC et les cellules B et pas du tout dans les MDC (voir tableau 03). Il reconnaît des structures présentes dans l'ADN des mycobactéries (ADN double-brin), les séquences CpG non méthylées, connues pour leur capacité stimulatrice du système immunitaire (c'est la forme méthylée qui prédomine dans l'ADN de mammifère). Les motifs CpG sont présents à une fréquence 20 fois supérieure dans l'ADN bactérien comparé à l'ADN de mammifère. Ils induisent un éventail de réponses immunes basé sur l'activation de cellules immunes primitivement impliquées dans la reconnaissance de ces molécules. Le TLR9 se lie directement aux ADN CpG ou aux ODN CpG. L'ADN CpG peut être simple ou double-brin, mais l'ODN a une activité immunostimulatrice plus puissante lorsqu'il est non-méthylé et simple-brin (Zelenay et al. 2003; Rutz et al. 2004). Le TLR9 reconnaît ainsi différents motifs CpG, les séquences optimales étant 5'-GTCGTT et 5'-GACGTT pour les TLR9 humain et murin respectivement (Bauer et al. 2001). Certains virus, comme le virus *Herpes simplex,* contiennent aussi des motifs CpG capables de stimuler les PDC à produire de l'IFN-α *via* le TLR9 (Lund et al. 2003).

13.1.5.3.2. Trois classes d'ODN CpG

Les effets biologiques de la signalisation par le TLR9 dépendent fortement de la nature des ligands. Au moins trois classes distinctes d'ODN contenant des motifs CpG ont été décrites (Kerkmann et al. 2003; Klinman 2004).

L'ODN CpG conventionnel, appelé aussi **ODN CpG de type K** ou **CpG-B** (exemple : CpG 2006), a la capacité d'activer les cellules B (Hornung et al. 2002). En revanche, il ne stimule qu'une faible sécrétion d'IFN-α par les PDC. L'ODN CpG-B comporte de multiples motifs CpG, et sa structure est stabilisée par un squelette phosphorothioate.

L'**ODN CpG de type D** ou **CpG-A** (exemples : CpG 2336 et CpG 2216), possède une plus faible capacité à activer les cellules B, mais une plus forte capacité à induire la production d'IFN de type I par les PDC. L'ODN CpG-A contient un seul motif CpG, et son activité requiert un squelette composé d'un mélange phosphodiester-phosphorothioate. En

particulier, la région entourant un motif CpG devrait être palindromique et liée au phosphodiester. De plus, une queue poly-G devrait être incluse à la terminaison 3'.

L'**ODN CpG de type C** présente à la fois des fonctions d'induction d'IFN de type I et d'activation des cellules B (Hartmann et al. 2003). Il est constitué d'un squelette phosphorothioate avec des motifs CpG multiples et des dimères TCG à la terminaison 5'. Cette structure unique avec un ou plusieurs motifs CpG en 5' et un palindrome en 3' pourrait autoriser la formation de *duplex* dans l'environnement endosomal. La séquence la plus puissante est appelée M362 et contient une séquence palindromique centrale avec des dinucléotides CG, une caractéristique du CpG-A, et un "motif TCGTCG" à l'extrémité 5', présent dans le CpG-B (Jurk et al. 2004).

13.1.5.3.3. Un même TLR pour des effets différents

Pour expliquer comment les différents agonistes du TLR9 pouvaient conduire à des résultats aussi distincts, l'importance de leur localisation intracellulaire a été suggérée (Honda et al. 2005; Guiducci et al. 2006) (voir figure 09).

Les étapes précoces dans les voies de transduction du signal induit par le CpG peuvent être bloquées par des inhibiteurs de l'acidification/maturation endosomale (Hacker et al. 1998; Yi et al. 1998; Manzel et al. 1999; Ahmad-Nejad et al. 2002) ou par des inhibiteurs de la PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), qui semble avoir un rôle dans l'internalisation de l'ODN CpG-B (Ishii et al. 2002).

Après internalisation dans un compartiment endosomal, l'ADN CpG monomérique de type B est rapidement transféré et dégradé dans le lysosome (endosomes positifs pour LAMP-1 (*Lysosome-associated membrane protein 1*)) en présence des molécules transductrices du signal, telles que MyD88 et l'IRF5, ce qui induit en majorité la production de TNF-α (Asselin-Paturel and Trinchieri 2005; Honda et al. 2005), alors que l'ADN CpG multimérique de type A est retenu dans l'endosome des PDC humaines (endosomes positifs pour TfR (*Transferrin receptor*)), en présence de MyD88 et IRF7, ce qui induit en majorité la production d'IFN-α (Asselin-Paturel and Trinchieri 2005; Honda et al. 2005). Quand le CpG-B est complexé dans des microparticules pour mimer la structure des CpG-A multimériques, il se retrouve dans les endosomes TfR^+ et induit la sécrétion d'IFN-α par les PDC, alors que des formes monomériques de CpG-A se retrouvent dans les endosomes $LAMP\text{-}1^+$, accompagnées par une perte de production d'IFN-α et un gain dans l'activité de maturation

des PDC. Les séquences CpG-C, qui induisent à la fois l'IFN-α et la maturation des PDC, sont distribuées dans les deux types d'endosomes. De plus, si l'ADN CpG-B est modifié par des lipides cationiques pour être retenu dans l'endosome, il peut induire la production d'IFN de type I, tandis que la formation d'une tétrade G par la queue poly-G tend à induire un auto-assemblage des ADN CpG-A en nanoparticules, qui ressemblent à une structure virale (Kerkmann et al. 2005). Cette structure particulière contribuerait à la localisation intracellulaire de l'ADN CpG-A et à sa potentialité "virus-*like*" à induire l'IFN-α dans les PDC. La structure des CpG serait donc essentielle pour orienter leur localisation et ainsi leur action sur la PDC.

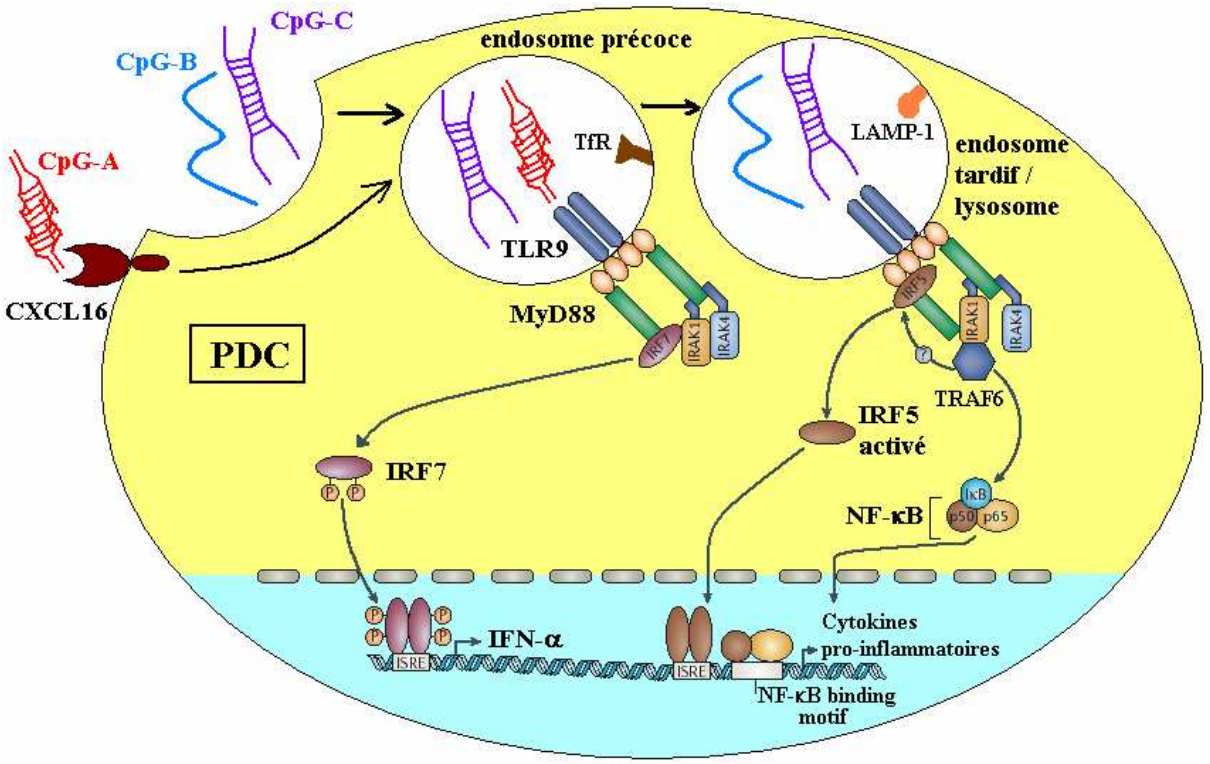


Figure 09. Activation de réponses différentes dans la PDC par l'ajout de différents types de CpG.

Une étude récente semble avoir élucidé en partie la façon dont les CpG-A se retrouvaient localisés dans des endosomes précoces alors que les CpG-B étaient dirigés vers des lysosomes. En effet, le récepteur *scavenger* CXCL16, exprimé sur les PDC humaines mais pas les cellules B, semble contribuer à la liaison, capture et activité stimulatrice du CpG-A (Gursel et al. 2006). Cette interaction sélective aboutit à l'accumulation du CpG-A dans les endosomes précoces plutôt que dans les vésicules lysosomales.

13.1.5.3.4. TLR9 humain versus murin

Le système TLR9 est différent entre l'homme et la souris. Tout d'abord, l'expression de TLR9 chez l'homme est restreinte aux PDC et aux cellules B, alors que chez la souris elle est aussi observée dans les MDC. Ensuite, la réponse des PDC aux agonistes du TLR9 est également différente. Les PDC humaines peuvent sécréter de l'IFN-α mais ne produisent pas d'IL-12, mis à part peut-être en réponse à CpG ODN+CD40L (Krug et al. 2001). Les PDC murines, cependant, peuvent produire à la fois de l'IFN-α et de l'IL-12 *via* la signalisation du TLR9. De façon intéressante, les PDC murines produisent principalement de l'IFN-α et de l'IL-12 en réponse aux ADN CpG de type A et B, respectivement. Malgré ces différences, le système PDC chez l'homme et la souris est le même en termes d'expression sélective de TLR9 et de capacité unique de produire de l'IFN-α en réponse aux agonistes des TLR9.

13.2. Voies de signalisation intracytoplasmiques dépendantes des TLR

L'activation des voies de signalisation des TLR provient de leurs domaines TIR

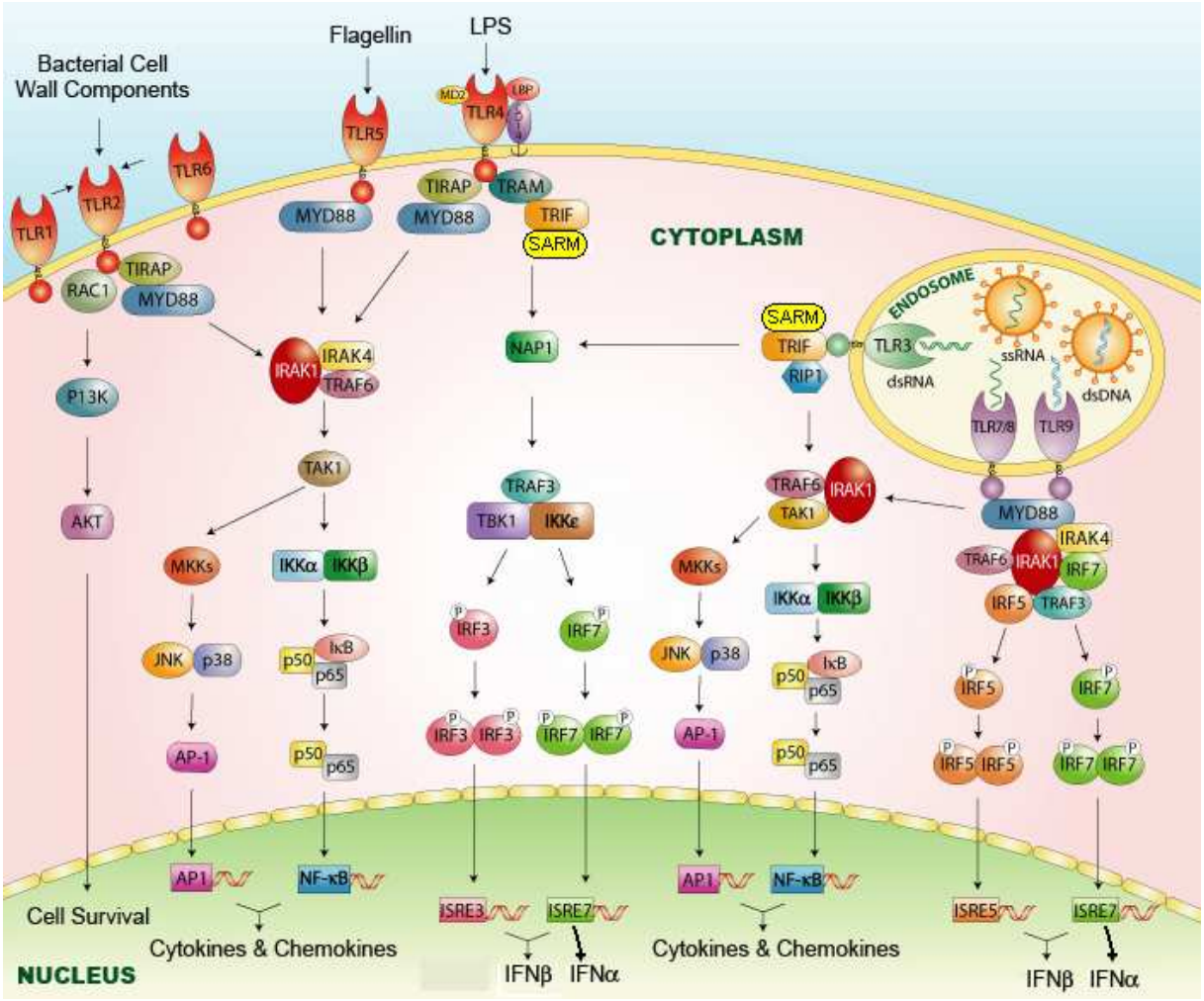


Figure 10. Voies de signalisation induites par les TLR. D'après *Invivogen*.

cytoplasmiques. Quatre adapteurs contenant des domaines TIR semblent jouer un rôle important dans ces voies de signalisation : MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP/MAL (*TIR-domain-containing adaptor protein / MyD88 adaptor-like*), TRIF/TICAM1 (*TIR domain containing adaptor-inducing IFN*) et TRAM/TICAM2 (*Trif-related adaptor molecule*) (Seya et al. 2005; Akira et al. 2006). Ces adaptateurs sont associés avec les TLR par des interactions homophiliques *via* les domaines TIR. Chaque TLR induit des réponses distinctes en association avec une combinaison différente de ces adaptateurs (voir figure 10). **MyD88** fonctionne comme un "adaptateur universel" car il est utilisé par tous les TLR (à l'exception du TLR3) pour déclencher l'activation du facteur de transcription NF-κB ; **TIRAP** est nécessaire pour recruter MyD88 au TLR2 et au TLR4 ; la signalisation du TLR4 requiert **TRIF** pour l'activation du NF-κB et du facteur de transcription IRF3 ; et enfin, le TLR4 a besoin de **TRAM** pour recruter TRIF et la signalisation en aval consécutive. Un cinquième adaptateur contenant un domaine TIR, **SARM** (*sterile alpha and HEAT/Armadillo motif*), a été récemment identifié comme étant un inhibiteur de la signalisation de TLR3 et TLR4 (Carty et al. 2006) et pourrait ainsi contribuer au contrôle de l'inflammation. Il interagit faiblement avec TRIF dans les cellules non-stimulées, mais une stimulation par le LPS conduit à la stabilisation du complexe SARM-TRIF, atténuant ainsi l'effet de TRIF et la signalisation en aval des TLR4 et 3.

Les voies de signalisation induites par les TLR peuvent se diviser grossièrement en trois catégories : les voies dépendantes de la molécule adaptatrice MyD88 aboutissant à l'activation du NF-κB (utilisées par tous les TLR, sauf le TLR3), les voies indépendantes de MyD88 (utilisées par les TLR3 et TLR4), et la voie dépendante de MyD88 aboutissant à l'activation des IRF (*Interferon-regulatory factors*), spécifique aux TLR7/8 et TLR9.

13.2.1. Voie dépendante de MyD88 menant à l'activation du NF-κB :

L'adaptateur **MyD88** possède un domaine TIR dans son extrémité C-terminale et un domaine de mort dans son extrémité N-terminale. Après stimulation, MyD88 recrute IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*) par l'interaction des domaines de mort des deux molécules (voir figure 10). Deux membres de la famille IRAK, **IRAK-1** et **IRAK-4** sont activés par phosphorylation et s'associent avec **TRAF6** (*tumor necrosis factor* (TNF) *receptor-associated factor 6*). TRAF6 forme un complexe avec des enzymes conjugant l'ubiquitine pour activer **TAK1** (*TGF-β-activated kinase 1*), menant à l'activation du facteur nucléaire (**NF**)-**κB** et de **AP-1** (*activator protein-1*) *via* le complexe canonique **IKK** (*IκB kinase*) et la

Encadré 9: Le NF-κB (Chen 2001)

Le NF-κB (*Nuclear factor κB*) est un facteur de transcription nucléaire eucaryote qui contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes critiques pour la régulation de l'apoptose, la prolifération cellulaire, la réplication virale, la tumorigénèse, l'inflammation et des maladies autoimmunes variées. Des signaux pro-inflammatoires, principalement le TNFα, l'IL-1 ou des ligands des TLR, mais également des facteurs de croissance, des cytokines, des lymphokines, les UV et des agents pharmacologiques se lient à leurs récepteurs correspondants, conduisant à un recrutement des protéines associées au récepteur (voir figure 5). Ces protéines recrutent à leur tour TRAF2 ou TRAF6 qui activent des kinases à sérine-thréonine de la famille des MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) telles que TAK1 (*TGFβ-Activated Kinase 1*), NIK (*NF-κB-inducing kinase*) et MEKK1 (*MAP-kinase kinase*). Ces kinases phosphorylent et activent les complexes IKK (*IκB kinases*), dont le principal contient deux sous-unités catalytiques, IKKα et IKKβ, et un composant structural appelé NEMO/IKKγ/IKKAP, qui pourrait transmettre les signaux en amont aux IKK et peut-être induire l'assemblage du complexe IKK.

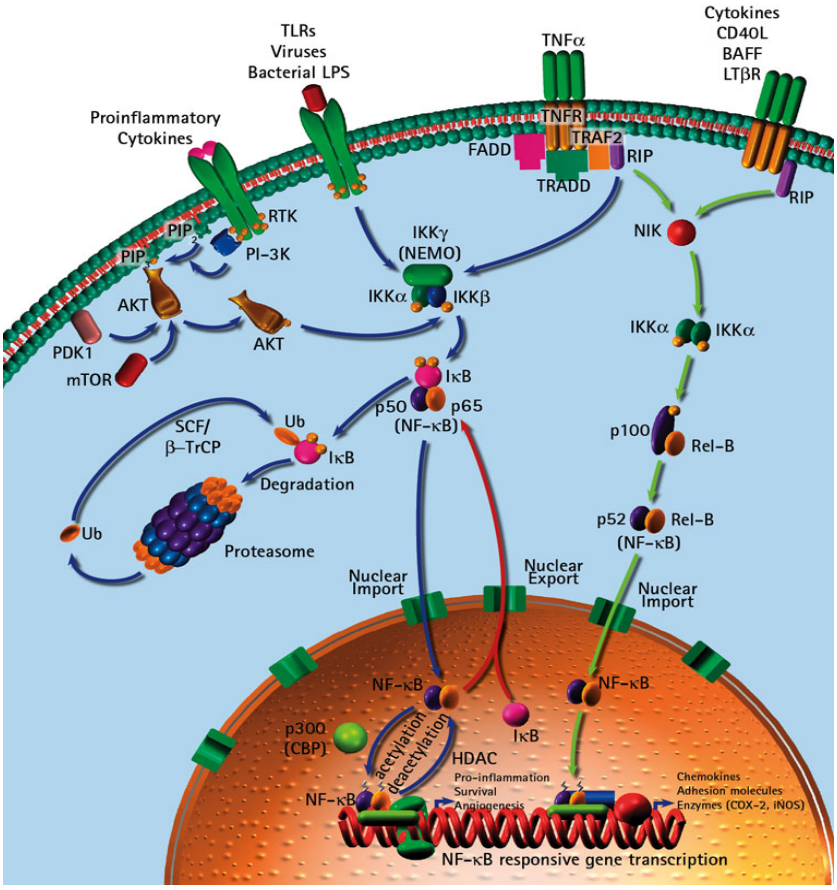


Figure 5. Voies de signalisation menant à l'activation du NF-κB et à l'induction de transcription de plusieurs gènes, après divers stimuli.

Le NF-κB est composé d'homo- et hétérodimères de cinq membres de la famille Rel/NF-κB incluant NF-κB1(p50/p105), NF-κB2(p52/p100), RelA(p65), RelB, et c-Rel (Rel). La forme active prévalente de NF-κB est un hétérodimère de sous-unité p50 ou p52 et p65, qui contient les domaines de transactivation nécessaires pour l'induction de gènes. Dans sa forme inactive, le NF-κB est séquestré dans le cytoplasme, lié par l'une d'entre les plusieurs molécules inhibitrices, incluant IκBα, IκBβ, IκBε, p105 et p100. Les IKK induisent la phosphorylation des molécules inhibitrices, suivie par l'ubiquitination puis la dégradation complète des IκB, ou la dégradation partielle de la partie C-terminale des précurseurs p100 et p105. Ceci aboutit à l'exposition des signaux de localisation nucléaire (NLS) sur les sous-unités de NF-κB, ou au clivage du précurseur p100 en sous-unité p52, et la translocation de la molécule dans le noyau. Dans le noyau, NF-κB se lie à la séquence consensus (5'GGGACTTTCC-3') de gènes variés, activant leur transcription.

voie de signalisation de la **MAPK** (*mitogen-activated protein kinase*), respectivement. Le complexe IKK phosphoryle l'inhibiteur **IκB**, ce qui libère le facteur de transcription NF-κB, pour induire l'expression des gènes cible. Cette voie de signalisation est essentielle pour l'expression des gènes de **cytokines inflammatoires**, dont TNF-α, IL-6, IL-12, et IL-1β, et des **molécules de costimulation** (Akira et al. 2006). Dans le cas des voies de signalisation du TLR2 et du TLR4, **TIRAP** est aussi requis pour l'activation de la voie dépendante de MyD88 (Horng et al. 2002; Yamamoto et al. 2002). TIRAP contient un domaine de liaison au PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) qui permet le recrutement de TIRAP à la membrane plasmique (Kagan and Medzhitov 2006), où il aide au recrutement de MyD88 au TLR4 activé pour initier la transduction du signal.

13.2.2. Voie indépendante de MyD88 :

En plus des signaux pro-inflammatoires, certains membres de la famille du TLR déclenchent l'induction des IFN de type I (voir figure 10). En particulier, TLR3 et TLR4 ont la capacité d'induire les IFN de type I, les cytokines de la famille de l'IL-10 et les gènes inductibles par l'IFN de manière indépendante de MyD88 (Kawai et al. 1999). Ainsi, cette voie de signalisation est appelée la voie indépendante de MyD88. L'adaptateur **TRIF** (Yamamoto et al. 2002; Oshiumi et al. 2003) est essentiel pour la voie indépendante de MyD88 induite par TLR3 et 4 (Hoebe et al. 2003; Yamamoto et al. 2003). TRIF est aussi requis pour l'induction des cytokines inflammatoires dans la voie de signalisation de TLR4. L'adaptateur **TRAM** est également essentiel pour la voie indépendante de MyD88 induite par TLR4 (Bin et al. 2003; Oshiumi et al. 2003; Yamamoto et al. 2003). L'extrémité N-terminale de TRAM a un site de myristoylation, responsable de sa localisation membranaire et de la signalisation de TLR4. TRAM agit comme adaptateur liant TLR4 et TRIF (Oshiumi et al. 2003).

TRIF interagit avec deux IKK non-canoniques, IKK*i* (*inducible IKK*) / **IKKε** et **TBK1** (*TRAF family member-associated NF-κB activator-binding kinase 1*) / NAK (*NF-κB-activating kinase*) / T2K (*TRAF-2-associated kinase*), conjointement avec **TRAF3** (Hacker et al. 2006; Hoebe and Beutler 2006; Oganesyan et al. 2006). TBK1 est également activée par **NAP1** (*NAK-associated protein 1*), qui facilite son oligomérisation (Fujita et al. 2003). Les deux IKK phosphorylent **IRF3**, permettant à ce dernier de se transloquer dans le noyau et d'activer le promoteur de l'**IFN-β** (Fitzgerald et al. 2003; Sharma et al. 2003; Hemmi et al.

2004; McWhirter et al. 2004; Perry et al. 2004). Cependant, l'IRF3 serait également impliqué dans l'activation du gène de l'IL-12p35 après liaison des TLR3 et 4 (Goriely et al. 2006).

D'un autre côté, la signalisation du TLR3 induit également l'activation du facteur de transcription NF-κB, mais par une voie indépendante de MyD88. En effet, **RIP1** (*receptor-interacting protein-1*) est impliqué dans la réponse NF-κB à l'ARN double-brin induite par TLR3. RIP1 se lie à l'extrémité C-terminale de TRIF *via* un motif d'interaction homotypique RIP (RHIM). Dans les cellules sans RIP1, l'activation du NF-κB induite par TLR3 et l'induction consécutive de ICAM 1 (*intercellular adhesion molecule 1*) sont défectueuses, alors que l'induction d'IFN-β est intacte. Au contraire, les réponses au LPS sont normales en absence de RIP1. Cependant, le LPS ne peut pas stimuler l'activation du NF-κB dans des cellules *rip*$^{-/-}$*MyD88*$^{-/-}$, révélant que RIP1 est aussi requis pour la voie de signalisation du NF-κB induite par TLR4 dépendante de TRIF. Après activation du TLR3, RIP1 est modifié par des chaînes polyubiquitines et est recruté par le TLR3 avec **TRAF6** et **TAK1**, suggérant que RIP1 utilise un mécanisme dépendant de l'ubiquitine similaire pour activer IKK-β en réponse au TNF-α et aux ligands du TLR3 (Meylan et al. 2004). Une étude supplémentaire nous apprend que l'inhibition de la PI3K augmente l'activation du NF-κB et la synthèse d'IFN-β dépendantes de TRIF en aval des TLR3 et 4 (Aksoy et al. 2005).

13.2.3. Voie dépendante de MyD88 menant à l'activation des IRF :

La signalisation des TLR7 et 9 peut induire, non seulement des cytokines inflammatoires, mais également des IFN de type I, dont l'IFN-α et l'IFN-β. Tous ces effets sont dépendants de MyD88 (Hemmi et al. 2003) (voir figure 10). L'induction de gènes de l'IFN de type I peut se faire en absence de TRIF, mais il est essentiel pour l'expression d'IFN-β induite par le TLR4. De plus, IKKε et TBK1 ne sont pas non plus indispensables pour l'induction de gènes de l'IFN de type I passant par les TLR7/9.

En aval de MyD88, les voies de signalisation se séparent entre la voie activant le NF-κB et celle activant l'IRF-

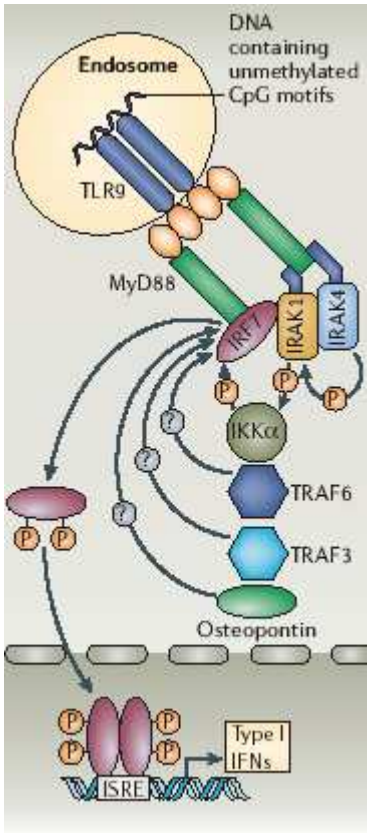


Figure 11. Voies de signalisation induites par le TLR9. D'après (Honda and Taniguchi 2006).

7. Cette dernière est évidente dans les PDC. Le NF-κB est requis pour l'expression de gènes inflammatoires, alors que l'IRF7 est essentiel pour l'induction de gènes de l'IFN de type I. Les deux facteurs de transcription résident dans le cytoplasme sous formes inactives et sont transloqués dans le noyau après stimulation.

L'IRF-7 est colocalisé avec MyD88, alors que l'IRF-3 ne l'est pas (Honda et al. 2004; Kawai et al. 2004), et peut s'associer directement avec MyD88 ou TRAF6, formant un large complexe moléculaire qui mène à la production d'IFN de type I (voir figure 11).

Après liaison du TLR9 par les ADN-CpG, le lien entre **IRF7** et **MyD88** est activé par une cascade de protéines kinases qui implique **IRAK-4**, **IRAK-1** et **IKKα**, en association avec **TRAF6**. Une activation similaire de l'IRF7 se produit aussi après activation du TLR7 avec des ARN simple-brin.

Il a été montré que L'IRF7 était impliqué de façon critique et sélective dans cette voie car une déficience en IRF7 interférait sérieusement avec la capacité des PDC stimulées par les TLR7/9 à produire des IFN de type I, mais pas les autres cytokines (Honda et al. 2005). IRAK-1 s'associe aussi avec l'IRF7 et est critique pour son activation et l'induction de gènes de l'IFN de type I. Tout comme pour la déficience en IRF7, une déficience en IRAK-1 ne conduit pas à une production défectueuse de cytokines inflammatoires, mais à une production défectueuse d'IFN-α (Uematsu et al. 2005).

Le mode d'activation du NF-κB et de l'IRF7 par le complexe moléculaire comprenant MyD88, IRAK-1 et IRF7 n'est toujours pas élucidé. De façon intéressante, une déficience en TRAF3 menait à un phénotype défectueux dans la signalisation des TLR7/9 similaire à celui des souris déficientes en IRF7 ou IRAK1, en termes d'inactivation sélective de l'induction d'IFN de type I (Hacker et al. 2006; Oganesyan et al. 2006). **TRAF3** semble fonctionner comme un gouvernail moléculaire pour diriger vers l'induction d'IFN de type I. La déficience en TRAF3 mène aussi à une production défectueuse d'IL-10, qui induit une surproduction de cytokines inflammatoires. TRAF3 semble jouer de nombreux rôles critiques pas seulement dans la signalisation des TLR7/9, mais également dans les voies des TLR3/4 et les voies cytosoliques indépendantes du TLR *via* l'interaction avec TRIF ou IKKε/TBK1 (Hacker et al. 2006; Oganesyan et al. 2006).

La fonction exacte des autres molécules entrant en jeu (nommées dans la figure 11) n'est pas connue, mais des études de *knock-out* de gènes ont montré qu'elles étaient toutes essentielles. Par exemple, le facteur de transcription T-bet permet l'augmentation d'expression, spécifique du tissu, de l'ostéopontine intracellulaire (**Opn-i**) dans les PDC.

L'ostéopontine pourrait donc contribuer à l'expression d'IFN-α dans ces cellules (Shinohara et al. 2006). En effet, une déficience en Opn réduit la production d'IFN-α dépendante du TLR9 mais épargne l'expression et la transcription de cytokines pro-inflammatoires dépendantes de NF-κB.

13.2.4. Les IRF (Interferon-Regulatory Factors), facteurs de transcription impliqués dans l'activation des gènes de l'IFN de type I :

L'induction de gènes de l'IFN de type I dans des cellules infectées par un virus est principalement une conséquence de l'activation transcriptionnelle d'éléments de réponse au virus (VRE = *Virus-Responsive Elements*), qui sont localisés dans la région en amont du site d'initiation de la transcription des gènes de l'IFN de type I. Les VRE contiennent généralement des sites de liaison pour les IRF (appelés ISRE), et le VRE du gène IFNB contient également des sites de liaison pour le NF-κB et la protéine activatrice AP1 (Wathelet et al. 1998; Mamane et al. 1999; Taniguchi et al. 2001). Parmi les IRF, quatre (IRF1, IRF3, IRF5 et IRF7) ont été impliqués en tant que régulateurs positifs de la transcription des gènes de l'IFN de type I (Mamane et al. 1999; Taniguchi et al. 2001).

La famille des IRF de mammifères comprend neuf membres : IRF1, IRF2, IRF3, IRF4 (aussi connu sous le nom de LSIRF, PIP ou ICSAT), IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 (aussi connu sous le nom de ICSBP) et IRF9 (aussi connu en tant que ISGF3γ) (Taniguchi et al. 2001; Lohoff and Mak 2005). Chaque IRF contient un domaine de liaison à l'ADN bien conservé d'environ 120 acides aminés ; il est localisé dans la partie N-terminale et forme un motif hélice-boucle-hélice. Cette région reconnaît une séquence d'ADN consensus connue comme l'élément de réponse stimulé par l'IFN (ISRE ou IRF-E = *IFN-stimulated response element*) (Taniguchi et al. 2001) car il a été tout d'abord identifié dans les promoteurs de gènes induits par la signalisation des IFN de type I (Taniguchi and Takaoka 2001; Decker et al. 2005; Platanias 2005). Les ISRE sont également trouvés dans les promoteurs des gènes qui codent pour les IFN de type I eux-mêmes, tout comme dans les promoteurs de plusieurs autres gènes qui sont impliqués dans l'immunité et l'oncogénèse. Les régions C-terminales des IRF, à l'exception de IRF1 et IRF2, ont un domaine d'association des IRF qui est responsable des interactions homo- et hétéromériques avec d'autres membres de la famille ou des facteurs de transcription comme PU.1 et STAT (Mamane et al. 1999; Taniguchi and Takaoka 2001).

13.2.4.1. L'IRF1

L'**IRF1** a été le premier membre de la famille des IRF qui fut découvert comme activant les promoteurs dans les gènes de l'IFN de type I (Miyamoto et al. 1988). Le NDV peut induire de l'ARNm codant pour IFN-α et IFN-β de manière normale dans des fibroblastes de souris embryonnaires (MEF = *Mouse Embryonic Fibroblasts*) *Irf1*$^{-/-}$ (Takaoka et al. 2005), indiquant que l'IRF1 n'est pas essentiel pour l'induction de gènes de l'IFN de type I par la voie cytosolique activée par le virus. Par ailleurs, IRF1 est un modulateur puissant du développement et de la maturation fonctionnelle des MDC. En effet, des souris déficientes pour l'IRF1 présentaient une prédominance de PDC et une réduction sélective de MDC. Des DC spléniques IRF1$^{-/-}$ étaient incapables de finir leur maturation et avaient des caractéristiques plasmacytoïdes et tolérogéniques après une infection virale *ex vivo* et *in vivo* (Gabriele et al. 2006).

13.2.4.2. L'IRF3 et l'IRF7

L'**IRF3** et l'**IRF7**, qui sont hautement homologues, ont beaucoup attiré l'attention, en tant que régulateurs clés de l'expression de gènes de l'IFN de type I induite par les virus.

L'IRF3 est exprimé constitutivement tandis que l'IRF7 est exprimé en petites quantités dans la plupart des cellules et est fortement induit par la signalisation de l'IFN de type I. La liaison des IFN de type I à leur récepteur aboutit à l'activation d'un activateur

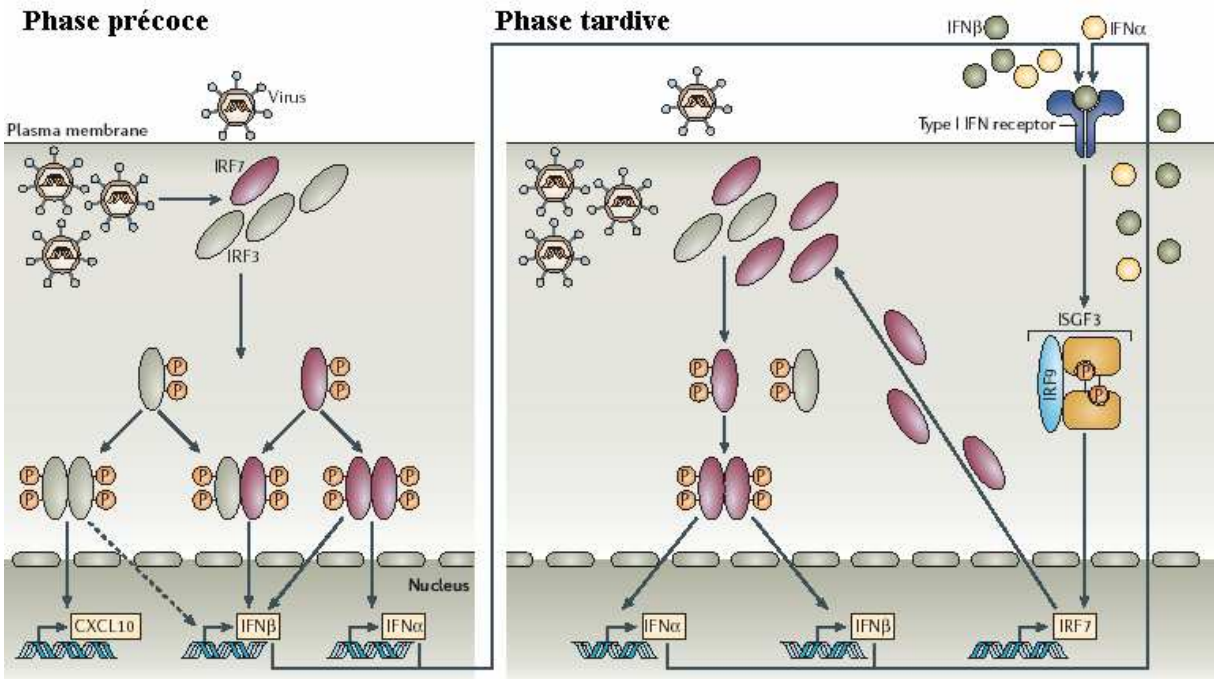


Figure 12. Les deux stades (précoce et tardif) de la boucle de rétrocontrôle positive induisant la production d'IFN de type I après stimulation par un virus. D'après (Honda and Taniguchi 2006).

Encadré 10: Promoteur du gène de l'IFN-β (1ère partie)

On sait depuis longtemps que les membres des familles du NF-κB et des IRF coopèrent pour le contrôle de la transcription de plusieurs gènes de cytokines. Les gènes les plus étudiés ont été ceux associés à l'induction du gène *IFNB*.

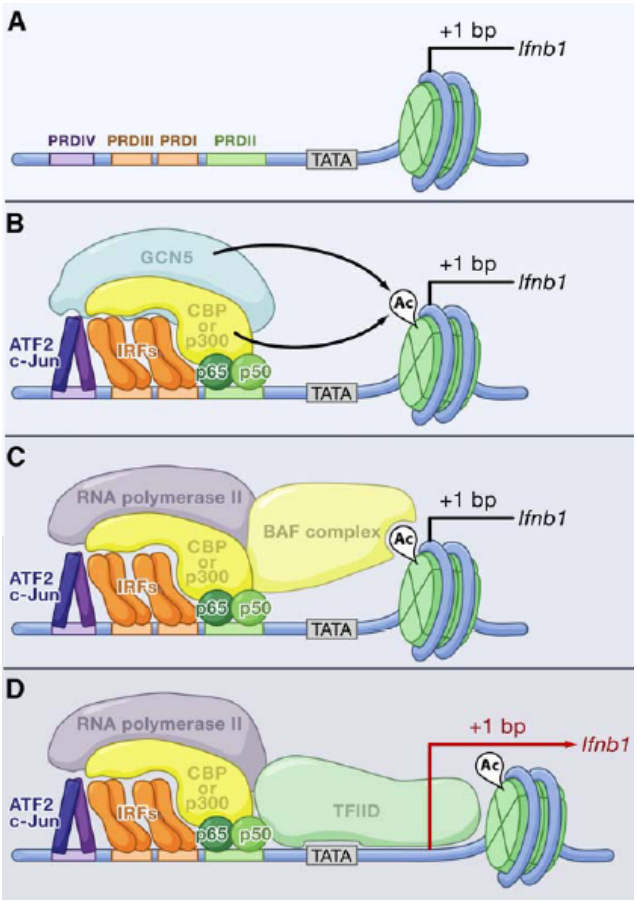


Figure 6. Transcription du gène de l'IFN-β après une infection virale. D'après (Honda et al. 2006).

La région promotrice du gène de l'IFN-β contient au moins quatre *cis* éléments régulateurs, nommés les domaines régulateurs positifs (PRD = *positive regulatory domains*) I, II, III et IV (Kim and Maniatis 1997) (voir figure 6 A). Quant aux régions promotrices des gènes de l'IFN-α, elles contiennent des éléments PRD I et PRD III-*like* (Ryals et al. 1985). PRD I et PRD III sont les sites de liaison pour les membres de la famille des IRF, alors que les éléments PRD II et PRD IV sont respectivement pour le NF-κB et AP-1 (*activator protein 1* ; un hétérodimère de ATF2 (*activating transcription factor 2*) avec c-JUN). A l'état de repos, le site de départ de transcription (localisé à la paire de bases +1) du gène de l'IFN-β est couvert par un nucléosome. Après infection virale, les PRD dirigent l'assemblage des IRF, NF-κB, AP-1 et HMG-I(Y) (*high mobility group protein*) pour former un complexe appelé « enhanceosome » (Kim and Maniatis 1997). L'assemblage de ces facteurs de transcription sur le promoteur du gène *IFNB* aboutit à des interactions physiques coopératives entre ces facteurs de transcription. L'enhanceosome résultant est plus stable et efficace pour induire la transcription qu'aucun de ses composants individuels liés indépendamment au promoteur (Wathelet et al. 1998). L'enhanceosome recrute des histone acetyl transférases (HAT), nommées GCN5 (*general-control-of-amino-acid synthesis 5*) et CBP (*cyclic-AMP-responsive-element-binding protein* (CREB)-*binding protein*) / p300 (Taniguchi et al. 2001) pour acétyler (Ac) les résidus de lysine des histones H3 et H4 dans le nucléosome, qui est localisé au site de départ de transcription du promoteur du gène de l'IFN-β et le couvre, inhibant l'induction du gène à l'état de repos (Agalioti et al. 2000) (voir figure 6 B). Ensuite, l'holoenzyme *RNA polymerase II* (à laquelle il manque le facteur de transcription TFIID) est recrutée au promoteur, puis l'acétylation des histones facilite le recrutement d'un complexe de remodelage de la chromatine, BAF (*Brahma-related gene* (BRG)-*Brahma* (BRM)-*associated factor*) (voir figure 6 C), qui force le déplacement du nucléosome hors du site de départ de transcription. Ce déplacement nucléosomal permet le recrutement du complexe de transcription TFIID au promoteur – un évènement essentiel pour l'induction de l'expression du gène de l'IFN-β (Agalioti et al. 2000) (voir figure 6 D).

transcriptionnel hétérotrimérique connu sous le nom de ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*), constitué de l'IRF9, de STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) et STAT2, et responsable de l'induction du gène *IRF7* (Marie et al. 1998; Sato et al. 1998).

Les IRF3 et 7 résident dans le cytosol sous une forme latente et, après une infection virale, sont phosphorylés sur des résidus sérines spécifiques dans la région C-terminale (régulatrice), permettant leur dimérisation et leur translocation dans le noyau. Les IRF3 et 7 phosphorylés peuvent former des homo- ou hétérodimères, permettant à l'IRF d'interagir avec les co-activateurs CBP (*Cyclic-AMP-responsive-element-binding protein* (CREB)-*binding protein*) ou p300 pour former un holocomplexe dans le noyau (Lin et al. 1998; Sato et al. 1998; Weaver et al. 1998; Yoneyama et al. 1998; Suhara et al. 2000). L'holocomplexe se lie ensuite à sa séquence ADN cible (sur les gènes de l'IFN de type I et certains gènes de chimiokines) et altèrerait la structure chromatinienne locale *via* l'activité histone-acétyltransférase des co-activateurs. De plus, d'autres facteurs de transcription sont recrutés pour former l'*enhanceosome* (voir encadrés n°10 et 11 "Promoteur du gène de l'IFN-β") ; la transcription des gènes cibles est ainsi initiée.

L'IRF3 est un activateur puissant du gène *IFNB* mais pas des gènes *IFNA*, à l'exception de *IFNA4*, alors que l'IRF7 active efficacement à la fois les gènes *IFNA* et *IFNB* (Marie et al. 1998; Sato et al. 1998; Sato et al. 2000).

Ces découvertes ont conduit à l'idée que l'IRF3 était principalement responsable de l'induction initiale du gène *IFNB*, alors que l'IRF7, dont l'augmentation d'expression passe par les IFN de type I eux-mêmes, est impliqué dans la phase tardive de l'induction des gènes de l'IFN de type I (voir figure 12). C'est-à-dire que l'induction du gène *IFNB* qui passe par IRF3 initie une induction en deux temps des gènes de l'IFN de type I par une boucle de rétrocontrôle positive (dans laquelle l'induction d'*IRF7* dépendante de l'IFN de type I assure la seconde étape), permettant ainsi la production efficace d'IFN de type I pendant l'infection virale. Ce modèle de production d'IFN de type I a été soutenu par plusieurs études ; cependant, la génération de souris *Irf7*$^{-/-}$ permit plus tard une vérification plus rigoureuse de ce modèle. Dans les MEF de souris *Irf7*$^{-/-}$, l'induction des gènes de l'IFN de type I par les virus à ARN simple-brin (VSV et *encephalomyocarditis virus* (EMCV)) est sévèrement défectueuse (Honda et al. 2005), indiquant que l'IRF7 est crucial pour la voie cytosolique d'induction des gènes de l'IFN de type I par ces virus et que la contribution de l'IRF3 est mineure en l'absence d'IRF7. Un modèle de rétrocontrôle positif révisé a donc été proposé, dans lequel l'IRF7, exprimé en petite quantité, semble être crucial pour l'activation de la phase initiale de l'induction des gènes de l'IFN de type I. L'homodimère d'IRF7 ou

Encadré 11: Promoteur du gène de l'IFN-β (2ème partie)

L'interaction classique entre les IRF et le NF-κB se produit *via* la liaison indépendante des facteurs de transcription à des sites adjacents. En revanche, il est de plus en plus évident que l'IRF3 peut former un complexe directement avec la sous-unité du NF-κB p65 (connue aussi sous le nom de REL-A), par la liaison du RHD (*REL-homology domain*) de p65. De cette manière, IRF3 peut fonctionner comme un co-facteur spécifique du promoteur et du signal pour activer la transcription d'un éventail de gènes dépendants du NF-κB, sans liaison directe à un ISRE (Wietek et al. 2003; Leung et al. 2004; Ogawa et al. 2005). Ainsi, après liaison du TLR4, l'induction des gènes codant pour CXCL9 et CLIC4 (*chloride intracellular channel 4*), contenant tous deux le site de liaison au NF-κB mais pas les ISRE, requiert l'IRF3 en tant que co-activateur (voir figure 7 F).

A l'inverse, les MEF déficientes en p65 présentent un défaut marqué d'induction de gènes contenant des ISRE en réponse à la liaison du TLR4, indiquant que les complexes IRF3-p65 (avec la liaison de l'IRF3 à l'ISRE) soutiennent une induction totale de ces gènes (Wietek et al. 2003; Ogawa et al. 2005). Après liaison du TLR4, l'activation induite par IRF3 des gènes contenant des ISRE, tels que ceux codant pour CXCL10 (*CXC-chemokine ligand 10*) et IFIT1 (*IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 1*), requiert donc p65 en tant que co-activateur, probablement pour le recrutement de CBP ou p300 (voir figure 7 E).

Mais p65 n'est pas requis pour l'activité d'IRF3 en réponse à la liaison d'un TLR différent, le TLR3 (Wietek et al. 2003). Ainsi, selon la nature de la signalisation, IRF3 fonctionne soit comme un co-activateur essentiel de p65 pour la transcription de gènes dépendants du NF-κB, soit p65 fonctionne comme un cofacteur pour IRF3 pour la transcription de gènes dépendants de l'IRF.

L'importance de la coopération entre NF-κB et IRF3 a également été confirmée par une étude récente montrant que la répression induite par le récepteur du glucocorticoïde (GR = *ligand-bound glucocorticoid receptor*) des programmes d'expression de gènes dépendants du TLR opère *via* IRF3 ou NF-κB (Ogawa et al. 2005). Le récepteur du glucocorticoïde réprime les réponses transcriptionnelles de diverses voies de signalisation pro-inflammatoires et exerce des effets anti-inflammatoires dans des maladies variées. Des études récentes ont révélé que la liaison du ligand au récepteur du glucocorticoïde empêche les interactions entre p65 et IRF3 en liant le RHD de p65 et donc en entrant en compétition avec IRF3 pour la liaison à ce site. En conséquence, le récepteur du glucocorticoïde réprime un large éventail de gènes pro-inflammatoires (Ogawa et al. 2005) (voir figures 7 G et H). Ce mécanisme de *trans*-répression opère sur la voie dépendante de MyD88. L'interaction spécifique du signal d'IRF3 avec p65 pourrait donc réguler différentiellement le programme d'expression des gènes en réponse à divers pathogènes. Il est probable que des interactions additionnelles des IRF avec des co-activateurs, et probablement des co-répresseurs, seront identifiées dans des études futures, et ces efforts devraient mener à une compréhension plus complète des mécanismes soulignant la régulation et la fonction des IRF.

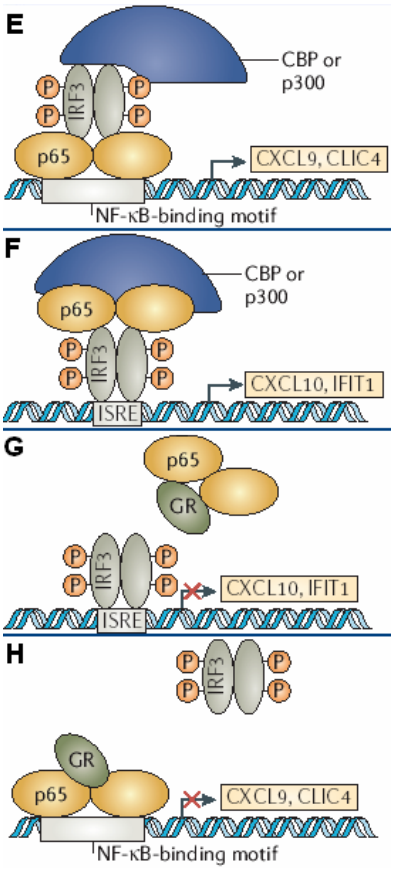


Figure 7. Transcription du gène de l'IFN-β après une infection virale. D'après (Honda and Taniguchi 2006).

l'hétérodimère d'IRF7 et IRF3, plutôt que l'homodimère d'IRF3, pourraient donc être plus importants pour la voie cytosolique d'induction des gènes de l'IFN de type I par les virus. Il est probable que l'homodimère d'IRF3 participe à l'induction d'autres gènes, comme le gène codant pour la chimiokine CXCL10 (Nakaya et al. 2001). Après l'activation initiale des gènes de l'IFN de type I par l'IRF7 (et dans une moindre mesure l'IRF3), la boucle d'amplification entre en jeu, et la participation de l'IRF7 (induit par l'IFN de type I) est cruciale pour que l'induction des gènes de l'IFN de type I soit complète. L'expression des PRR cytosoliques RIG-I et Mda5 est également induite par les IFN de type I, contribuant ainsi à la régulation de rétrocontrôle positif.

13.2.4.3. L'IRF5

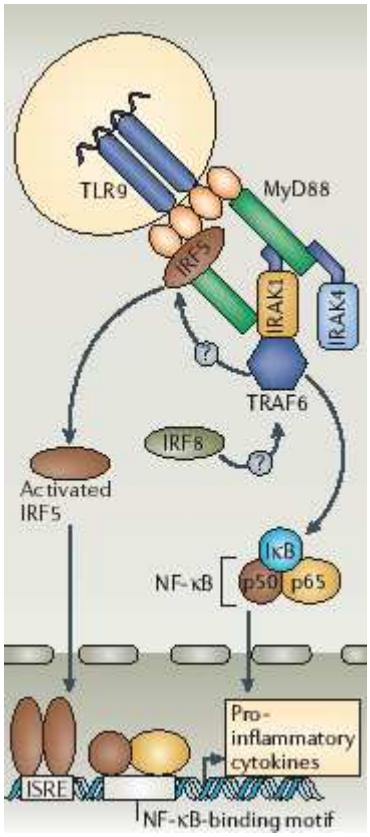


Figure 13. Voies de signalisation induites par le TLR9. D'après (Honda and Taniguchi 2006).

En plus de l'IRF3 et de l'IRF7, les rôles critiques d'autres IRF ont aussi été révélés. L'**IRF5** est également colocalisé avec MyD88 et TRAF6 et s'associe avec eux (Takaoka et al. 2005). A la différence de IRF7, qui se lie au domaine de mort de MyD88, IRF5 interagit avec la région centrale (connue sous le nom de domaine intermédiaire) et une partie du domaine TIR de MyD88 (Negishi et al. 2005). L'activation de la voie dépendante de MyD88 par les ligands des TLR7 et 9 conduit à la dimérisation puis à la translocation de l'IRF5 dans le noyau (Schoenemeyer et al. 2005; Takaoka et al. 2005). L'IRF5 se lierait ensuite aux ISRE dans le promoteur de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (tels que ceux codant pour TNF, IL-6 et IL-12p40) (Takaoka et al. 2005) et pour l'IFN de type I (voir figure 13). En effet, une expression ectopique d'IRF5 autorise la production d'IFN de type I via le TLR7 alors qu'une déficience en IRF5 induite par des siRNA réduit la réponse IFN de type I au R848 (Schoenemeyer et al. 2005).

Cependant, le moyen par lequel IRF5 participe à l'induction d'autres gènes cibles reste à être clarifié.

Bien qu'il soit probable que IRF5 coopère avec NF-κB et les MAPK pour induire des gènes de cytokines pro-inflammatoires, l'activation du NF-κB et des MAPK JNK (*JUN N-terminal kinase*) et p38 intervient normalement dans des cellules B *Irf5*$^{-/-}$ (Takaoka et al.

2005). En accord avec ceci, certains gènes dépendants de NF-κB (comme le gène codant pour IκBα) sont exprimés normalement dans les cellules *Irf5*$^{-/-}$ (Negishi et al. 2005). De plus, après liaison du TLR9 dans les PDC provenant de souris *Irf5*$^{-/-}$, l'induction des gènes *IFNA* n'est pas affectée (Takaoka et al. 2005).

13.2.4.4. L'IRF4

MyD88 interagit aussi avec un autre IRF, l'**IRF4** (voir figure 14). L'IRF4 régule de façon négative la voie de signalisation (Negishi et al. 2005). La déficience en IRF4 n'affecte pas la capacité des PDC stimulées par les TLR7/9 à sécréter de l'IFN-α mais induit une surproduction de cytokines inflammatoires. Celle-ci est accompagnée d'une activation augmentée de NF-κB et de MAPK. Cette hyperactivité n'est pas seulement observée dans la signalisation des TLR7/9 mais également dans celle des TLR2/4. L'IRF4, mais pas l'IRF7, peut entrer en compétition avec l'IRF5 pour l'association avec MyD88, ce qui pourrait être important pour le phénotype des souris déficientes en IRF4. Les membres de la famille des IRF sont donc impliqués de façon critique dans la signalisation des TLR.

13.2.4.5. L'IRF8

L'**IRF8** est impliqué dans les réponses induites par le TLR9 car les PDC *Irf8*$^{-/-}$ n'arrivent pas à produire des cytokines pro-inflammatoires et de l'IFN-α en réponse au ligand du TLR9 (voir figure 14). De plus, dans des cellules déficientes en IRF8, l'activation du NF-κB stimulée par le TLR9 est défectueuse (Tsujimura et al. 2004). L'IRF8 augmente la signalisation en interagissant avec, et en activant, TRAF6 (Zhao et al. 2006). En réponse à la liaison du TLR4 ou du TLR9, des macrophages et des MDC de souris *Irf8*$^{-/-}$ n'arrivent pas à induire les gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires TNF et IL-6 (Tsujimura et al. 2004; Zhao et al. 2006). Ce défaut est attribué à l'incapacité des cellules *Irf8*$^{-/-}$ à activer le NF-κB et/ou les MAPK en réponse à l'activation des TLR. La participation de l'IRF8 à la voie de signalisation dépendante de MyD88 pourrait ajouter à la diversité de la cascade de signalisation en aval des TLR et ainsi

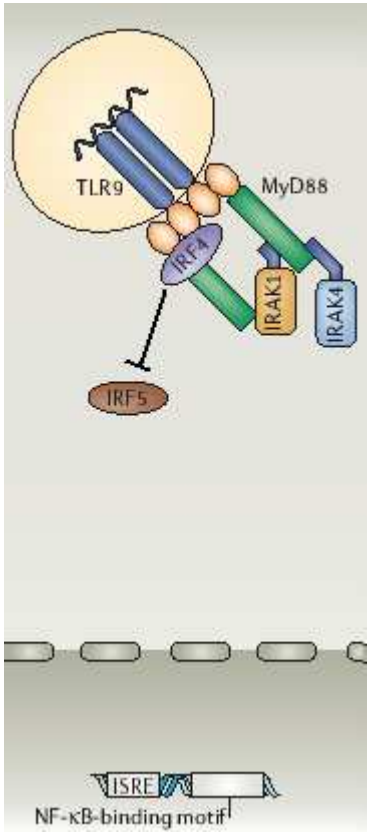


Figure 14. Voies de signalisation induites par le TLR9. D'après (Honda and Taniguchi 2006).

permettre l'activation spécifique du type cellulaire et spécifique du signal de gènes cibles.

13.3. Utilisation des ligands des TLR en thérapeutique

Le premier TLR à avoir été ciblé spécifiquement par les firmes pharmaceutiques pour la production de molécules thérapeutiques est le TLR7. La drogue développée par 3M Pharmaceuticals de Saint Paul, Minnesota, est une crème appelée Aldara qui contient de l'imiquimod et a été approuvée en 1997 comme outil de thérapie anti-cancéreuse avant que les mécanismes d'action du TLR aient été bien compris. De nombreux autres candidats à une thérapie anti-cancéreuse ont ensuite fait leur apparition. La plupart d'entre eux sont des agonistes des TLR7 et 9, ces récepteurs étant spécifiques des PDC, cibles privilégiées pour des thérapies basées sur l'activation des systèmes immuns inné et adaptatif. Plusieurs produits se retrouvent ainsi actuellement en phase clinique I, II ou III (voir tableau 04).

Company (location)	Product	Indication (s)	Development phase	Partner	Mechanism of action
3M	Aldara (imiquimod)	Superficial basal cell carcinoma, Actinic keratosis, Genital warts	Approved (1997)	None	TLR7 agonist
Coley Pharmaceuticals	PF-3512676 (synthetic CpG oligonucleotide, 24 bases long, previously known as Promune	Non-small cell lung cancer & refractory B cell non-Hodgkin's lymphoma	Phase 3	Pfizer (New York)	TLR9 agonist
Dynavax Technologies	HEPSILAV (hepatitis B surface antigen combined with 1018 ISS)	Hepatitis B vaccine	Phase 3	None	TLR9 agonist
Idera Pharmaceuticals	IMO-2055 (IMOxine)	Renal cell carcinoma	Phase 2	None	TLR9 agonist
Eisai	E5564	Sepsis	Phase 2	None	TLR4 antagonist
Anadys Pharmaceuticals	ANA975 (isatoribine)	Chronic hepatitis C	Phase 1	Novartis (Basel) $570-million alliance	TLR7 agonist

Tableau 04. Produits à base d'agonistes de TLR développés par différentes compagnies et leurs phases cliniques de développement pour diverses thérapies anti-tumorales. D'après (Schmidt 2006).

13.3.1. L'imiquimod (agoniste du TLR7) :

L'activité anti-tumorale de l'imiquimod (Sidky et al. 1992; Sidbury et al. 2003) a été démontrée dans différents modèles de tumeur murine. Chez l'homme, le traitement topique avec l'imiquimod est utilisé pour augmenter la réponse immunitaire ; pour traiter l'herpès génital, les maladies causées par le *papilloma virus*, tout comme le carcinome basocellulaire (Geisse et al. 2004). Il pourrait également induire la régression de lésions du mélanome (Bong et al. 2002; Fleming et al. 2004). Les mécanismes responsables des effets anti-tumoraux ou anti-viraux de cet agoniste du TLR7 sont peu compris, mais pourraient impliquer le recrutement et l'activation des PDC. En effet, dans un modèle murin de mélanome, l'effet

anti-tumoral de l'imiquimod pourrait passer en partie par le recrutement de PDC dans la peau traitée (Palamara et al. 2004). De plus, une étude a montré que les PDC étaient recrutées et activées dans dans des lésions de patients atteints de maladies épithéliales néoplasiques et qu'elles produisaient de l'IFN-α après traitement par l'imiquimod *in vivo* (Urosevic et al. 2005).

13.3.2. Les ODN CpG (ligands du TLR9) :

Le fort pouvoir immunostimulant des ODN CpG ouvre plusieurs stratégies thérapeutiques dans les cancers (Carpentier et al. 1999; Ballas et al. 2001; Kawarada et al. 2001; Heckelsmiller et al. 2002). Schématiquement, on peut distinguer deux approches dans le traitement des cancers par les ODN CpG : l'utilisation des ODN CpG seuls, par voie locale, pour favoriser l'émergence d'une réponse immunitaire (immunisation *in situ*), ou l'utilisation combinée des ODN CpG avec un antigène ou un anticorps monoclonal, lorsque ceux-ci sont connus, ou avec des DC (immunisation à distance).

13.3.2.1. Utilisation des ODN CpG seuls

De nombreuses publications rapportent le rôle de l'injection de ODN CpG seuls dans la régression de tumeurs solides (Carpentier et al. 2003). Aucune toxicité n'a été mise en évidence *in vitro*. En revanche, la plupart des études ont souligné le rôle conjoint des systèmes immunitaires inné et acquis dans le rejet tumoral. La déplétion *in vivo* des cellules NK diminue ou abolit les effets antitumoraux des ODN CpG (Carpentier et al. 1999). Les macrophages infiltrants et les DC pourraient intervenir en amont de cette activation (Lanuti et al. 2000; Hafner et al. 2001). L'implication de l'immunité spécifique est clairement démontrée par l'efficacité réduite des ODN CpG dans les souris *nude* ou SCID (Carpentier et al. 2000). Les lymphocytes CD8 sont nécessaires dans la plupart des modèles animaux, alors que la déplétion en cellules CD4 semble avoir moins d'impact (Lanuti et al. 2000; Kawarada et al. 2001), probablement parce que les ODN CpG permettent l'activation directe des lymphocytes CD8 par les DC, de façon indépendante des lymphocytes CD4 (Cho et al. 2000). Cependant, l'existence d'une mémoire immunitaire à long terme, rapportée dans l'ensemble des modèles, suggère un rôle joué par les lymphocytes CD4 mémoire. De façon intéressante, il a été rapporté que les PDC infiltrantes des tumeurs ORL chez l'homme étaient moins sensibles aux ODN CpG de type A que les PDC sanguines du même patient. Cette résistance s'expliquerait en partie par la sécrétion locale d'IL-10 par les cellules tumorales (Hartmann et

al. 2003). Dans un modèle animal, la combinaison de CpG et d'anticorps anti-IL-10 a d'ailleurs révélé l'existence d'un effet synergique (Vicari et al. 2002).

En conclusion, il faut souligner que l'activation de l'immunité non spécifique est locale et persiste tant que le traitement est administré, à l'inverse de l'immunité spécifique. Ainsi, l'immunité non spécifique joue probablement un rôle important dans la phase initiale du traitement, avant qu'une immunité spécifique soit amorcée. La capacité des ODN CpG à induire une bonne réponse spécifique sera donc déterminante pour leur avenir clinique, en particulier pour les cancers métastatiques.

13.3.2.2. ODN CpG en association avec des antigènes, des anticorps ou des DC

La plupart des expériences sont réalisées sur le modèle murin et on peut se demander si les résultats peuvent réellement être interprétés en ce qui concerne les PDC, étant donné que les MDC murines expriment le TLR9. Il est cependant difficile de se passer de ce modèle pour tester des produits à visée thérapeutique.

Les ODN CpG sont des adjuvants très efficaces avec la plupart des antigènes, sauf si ceux-ci sont de nature purement polysaccharidique (Krieg 2002). Les ODN CpG sont ainsi les adjuvants les plus efficaces pour l'induction des réponses immunitaires T_H1 cytotoxiques avec lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques de l'antigène (Miconnet et al. 2002; Zwaveling et al. 2002). Dans un modèle de mélanome exprimant l'épitope OVA, par exemple, les ODN CpG ont augmenté la réponse CTL (réponse des lymphocytes T cytotoxiques) après immunisation avec des peptides synthétiques et ont permis la régression tumorale (Davila and Celis 2000). La conjugaison directe entre l'antigène et les ODN CpG permet de réduire la quantité d'antigène nécessaire (Tighe et al. 2000). La combinaison de ODN CpG et d'anticorps monoclonaux pourrait également se révéler intéressante. Les ODN CpG augmentent la cytotoxicité induite par les anticorps grâce à la stimulation des macrophages et des cellules NK. Dans un modèle animal de lymphome, une telle combinaison permet de prévenir la croissance tumorale (Warren et al. 2000). Plusieurs essais cliniques utilisant cette association ont débuté récemment, avec de l'Herceptin® dans les cancers du sein ou du Rituxan® dans les lymphomes non-hodgkiniens.

Malheureusement, les cibles antigéniques sont rarement identifiées dans les cancers, limitant l'intérêt pratique de telles stratégies thérapeutiques. De plus, la sélection spontanée d'un clone n'exprimant pas l'antigène permettrait à la tumeur d'échapper à un tel traitement.

Les ODN CpG permettent la maturation et l'activation des cellules dendritiques, et favorisent l'activation des lymphocytes CD8 cytotoxiques *in vivo*. La stimulation par des

ODN CpG de DC en présence de lymphocytes T *helpers* et de cellules de lymphome A20 a ainsi permis l'expansion d'un grand nombre de lymphocytes T_H1 spécifiques de la tumeur, capables d'éradiquer le lymphome établi chez l'animal (Egeter et al. 2000). L'utilisation des ODN CpG avec les DC, qui s'affranchit du problème de la sélection des antigènes tumoraux, devrait bientôt rentrer en phase clinique.

Pour les applications thérapeutiques, les ODN CpG sont synthétisés de façon à avoir des squelettes phosphorothioate au moins partiellement modifiés pour leur fournir une résistance à la nucléase et une demi-vie augmentée, et qui produisent généralement un effet stimulateur d'immunité plus important. Une revue récente recense les caractéristiques des ODN CpG et les essais cliniques de phase I, II ou III qui ont déjà été menés par Coley, Dynavax, GlaxoSmithKline, DARPA, NIAID, Pfizer, Idera, Sanofi-Aventis et Novartis en les utilisant comme adjuvants de vaccins ou bien seuls ou en thérapie combinée, pour induire des réponses immunes innées et adaptatives dans différentes pathologies qui vont de l'allergie au cancer en passant par les infections virales (Krieg 2006). Les ODN CpG sont particulièrement intéressants car ils permettent d'ajouter un signal à la PDC recevant des antigènes tumoraux, l'induisant ainsi en maturation et la poussant à stimuler des lymphocytes T cytotoxiques. Sans signal ODN CpG, la PDC recevant les antigènes tumoraux restera immature et induira une tolérance des cellules T, empêchant le développement d'une immunité antitumorale.

14. Voies indépendantes des TLR :

14.1. Récepteurs

Les mécanismes qui précèdent l'induction de gènes de l'IFN de type I ont été largement étudiés dans le contexte de l'immunité anti-virale. Il est connu depuis longtemps que la plupart des virus – par exemple, le NDV (virus à ARN simple-brin négatif), le VSV (virus à ARN simple-brin négatif) et l'EMCV (virus à ARN simple-brin positif) – permettent l'induction de gènes de l'IFN de type I dans la plupart des types cellulaires. Des études récentes ont révélé que cette voie d'induction de gènes de l'IFN de type I est initiée par l'activation de PRR cytosoliques (Yoneyama et al. 2004; Yoneyama et al. 2005). Elle peut donc être appelée la "voie classique" ou la "voie cytosolique", en contraste avec la voie de l'induction de gènes de l'IFN de type I par les TLR.

Le premier senseur de l'ARN double-brin intracellulaire identifié a été la **PKR** (*dsRNA-activated protein kinase*) (Balachandran et al. 2000; Diebold et al. 2003). Il s'agit d'une kinase à sérine-thréonine cytoplasmique exprimée de façon ubiquitaire dont l'activité

catalytique est stimulée par sa liaison à l'ARN double-brin. La PKR activée catalyse la phosphorylation de eIF-2 (*eukaryotic initiation factor 2*) qui éteint la synthèse de protéine de l'hôte, protégeant ainsi les cellules de la réplication virale et des effets cytopathiques (Balachandran et al. 2000). L'activation de la PKR induit aussi la sécrétion de l'IFN de type I, probablement *via* la phosphorylation de I-κB et l'activation consécutive de NF-κB (Williams 2001). L'importance de la reconnaissance de l'ARN double-brin dans les réponses anti-virales est soulignée par le fait que les virus ont évolué pour développer des stratégies afin de contrecarrer les voies de signalisation induites par l'ARN double-brin. Le virus de l'*Influenza* code pour la protéine NS1, qui se lie à l'ARN double-brin et inhibe l'activation de la PKR (Hatada et al. 1999; Bergmann et al. 2000; Wang et al. 2000).

Cependant, bien que la PKR contribue à la production d'IFN de type I en réponse à l'analogue synthétique d'ARN double-brin poly(I:C), le ciblage de gènes chez la souris a montré qu'elle n'était pas indispensable pour les réponses IFN aux infections virales (Yang et al. 1995).

Récemment, les hélicases à ARN **RIG-I** (*retinoic acid-inducible gene-1*) et **Mda5** (*melanoma-differentiation-associated gene 5*) ont été identifiées comme étant des récepteurs cytosoliques essentiels pour les ARN viraux intracellulaires et les ARN double-brin synthétiques, stimulant l'induction, indépendante des TLR, de gènes de l'IFN de type I (Yoneyama et al. 2004; Yoneyama et al. 2005). Le rôle primordial de RIG-I et Mda5 en réponse aux virus à ARN a été prouvé par la génération de souris déficientes pour le gène de RIG-I ou de Mda5 (Kato et al. 2005; Kato et al. 2006). Les souris déficientes pour RIG-I sont défectueuses pour l'induction d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux infections de virus à ARN simple-brin négatif tels que NDV, VSV, le virus de l'*influenza* et le Sendai virus (SeV), ainsi que de virus à ARN simple-brin positif comme le virus de l'encéphalite Japonais. D'autre part, les souris déficientes en Mda5 présentent des défauts de réponses aux infections par les virus à ARN simple-brin positif tels que EMCV, le virus de Theiler et le virus Mengo. Ainsi RIG-I et Mda5 coopèrent pour assurer des réponses innées antivirales efficaces aux virus à ARN simple-brin négatifs et positifs.

En plus de RIG-I et Mda5, une autre hélicase à ARN, **Lgp2**, a été identifiée(Yoneyama et al. 2005). Lgp2 contient un domaine hélicase à ARN mais n'a pas de CARD, ni aucun autre domaine de signalisation. Elle pourrait donc réguler négativement les voies de signalisation de RIG-I et Mda5 en entrant en compétition avec ces molécules pour la liaison des ARN viraux.

Finalement, les **NOD** (*nucleotide-binding oligomerization domain*) sont des récepteurs membres de la famille des NLR (= NACHT-LRR (*leucin-rich repeat*)), qui inclut également les protéines NALP (*NACHT-LRR- and pyrin-domain-containing proteins*) et qui reconnaissent les composants microbiens dans le cytosol (Strober et al. 2006). Les NOD détectent les dipeptides muramyl des peptidoglycanes.

14.2. Voies de signalisation

Le système des PRR cytosoliques pour les acides nucléiques, indépendant des TLR, a été clarifié récemment (Kawai and Akira 2006) et a été décrit tout d'abord pour le système de reconnaissance de l'ARN double-brin (Yoneyama et al. 2004).

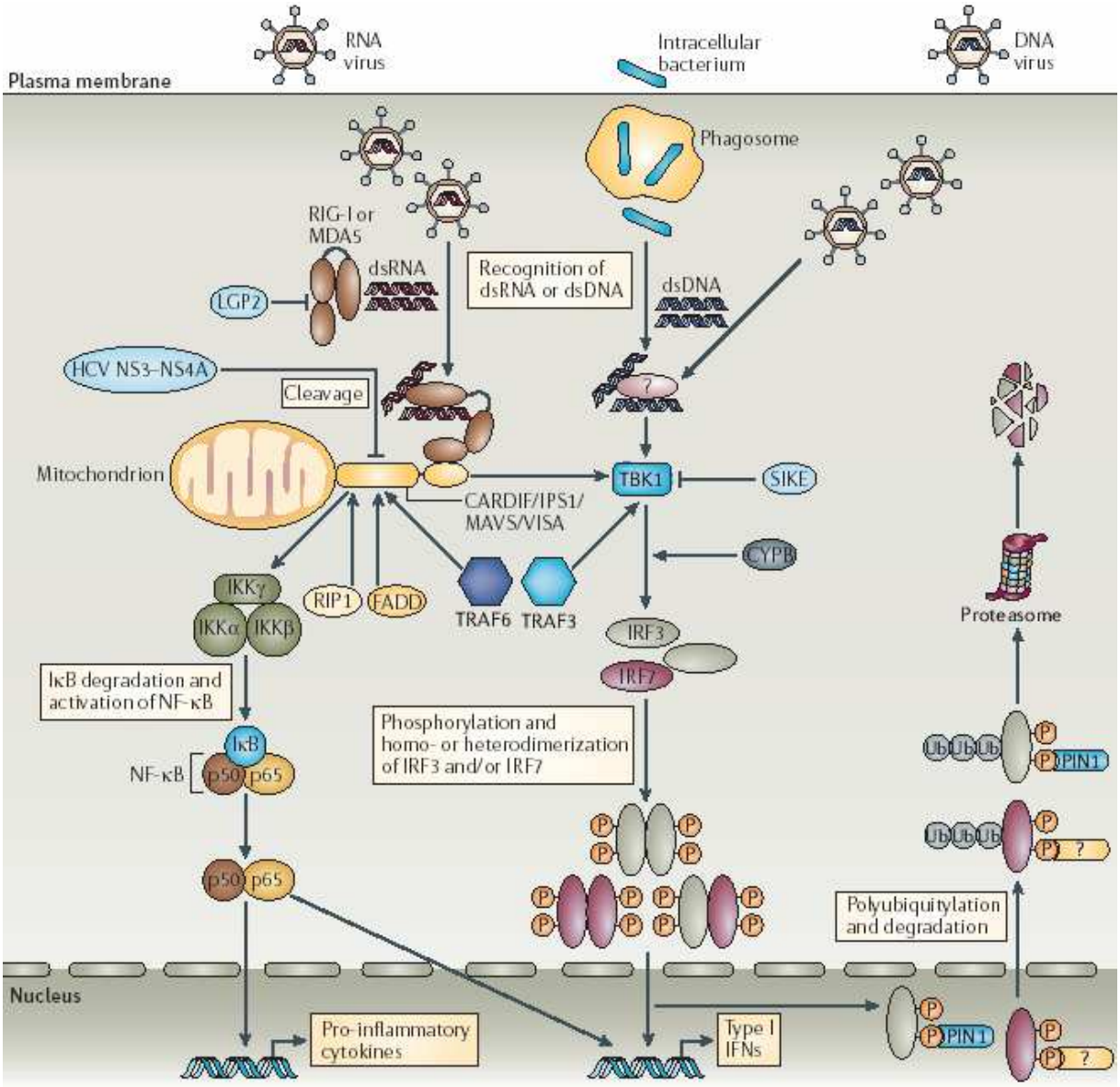


Figure 15. Voies de reconnaissance de l'ARN et de l'ADN double-brin indépendantes des TLR. D'après (Honda and Taniguchi 2006).

14.2.1. Reconnaissance de l'ARN double-brin par RIG-I et Mda5 :

L'ARN double-brin (un intermédiaire de réplication des virus à ARN) n'est pas seulement reconnu par le TLR3 mais aussi par les molécules cytosoliques RIG-I et Mda5. RIG-I et Mda5 sont des hélicases à ARN et contiennent deux domaines CARD-*like* et un domaine hélicase. Le domaine hélicase est impliqué dans la reconnaissance de l'ARN double-brin, et les domaines CARD-*like* jouent un rôle critique dans l'activation des voies de signalisation en aval. Les voies mènent à l'activation du NF-κB et de l'IRF3, induisant ainsi des cytokines inflammatoires et des IFN de type I. **IPS-1** (*IFN-β stimulator 1*) (Kawai et al. 2005), appelée aussi protéine de signalisation antivirale mitochondriale (**MAVS** = *mitochondrial antiviral signaling protein*) (Seth et al. 2005), adaptateur de signalisation induite par le virus (**VISA** = *virus-induced signaling adaptor*) (Xu et al. 2005), ou adaptateur de CARD induisant l'IFN-β (**Cardif** = *CARD adaptor inducing IFN-β*) (Meylan et al. 2005), est une molécule adaptatrice critique qui peut interagir avec RIG-I/Mda5 *via* l'interaction homophilique de leurs domaines CARD-*like* (Kawai and Akira 2006) (voir figure 15). IPS-1 contient aussi une région transmembranaire C-terminale hydrophobe, qui ressemble à celle de plusieurs protéines mitochondriales et permet sa localisation dans la membrane mitochondriale externe (Seth et al. 2005). Le rôle essentiel de IPS-1 dans la signalisation induite par RIG-I et Mda5 de l'induction de gènes de l'IFN de type I, de cytokines inflammatoires et de chimiokines a été prouvé par la génération de souris déficientes pour le gène de IPS-1 (Kumar et al. 2006; Sun et al. 2006). Il a été montré que IPS-1 interagissait avec plusieurs protéines de signalisation, telles que **TRAF2** (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*), **TRAF6**, **FADD** (*Fas-associated protein with the death domain*), et **RIP-1** (*receptor interacting protein-1*) (Kawai et al. 2005; Xu et al. 2005). Ces molécules semblent participer à l'activation d'induction du NF-κB et de cytokines pro-inflammatoires. IPS-1 interagit aussi avec **TRAF3**, qui est requis pour l'activation des kinases pour que les IRF stimulent l'induction des gènes de l'IFN de type I (Oganesyan et al. 2006; Saha et al. 2006). La surexpression de IPS-1 active les promoteur de l'IFN-β, de l'IFN-α4, de l'IFN-α6, et du NF-κB et inhibe la réplication du VSV. Des RNAi de IPS-1 bloquent la production d'IFN de type I en réponse à l'administration intracellulaire d'ARN double-brin ou une infection avec VSV ou NDV.

L'interaction entre récepteur RIG-I/Mda5 et molécule adaptatrice IPS-1 aboutit aussi sur l'activation de deux kinases à sérine/thréonine : **TBK1** (ou T2K ou NAK ; TANK

(tumour-necrosis factor (TNF)*-receptor-associated factor* (TRAF)*-family-member-associated NF-κB activator)- binding kinase 1*) et **IKKε** (ou IKK*i* ; *inhibitor of NF-κB* (IκB) *kinaseε*). Bien que TBK1 et IKKε phosphorylent toutes deux des résidus sérine dans la région C-terminale régulatrice de IRF3 et IRF7 *in vitro*, des études de ciblage de gène ont montré que les gènes de l'IFN de type I étaient principalement induits par TBK1 dans les MEF infectés par un virus (Fitzgerald et al. 2003; Sharma et al. 2003; Hemmi et al. 2004). TBK1 n'est pas associé avec IPS-1, comme il a été déterminé par des tests d'immunoprécipitation (Kawai et al. 2005; Meylan et al. 2005), mais il doit être activé en aval de cet adaptateur. TRAF3 interagit avec IPS-1 (Saha et al. 2006) et représente donc probablement un lien entre IPS-1 et TBK1. Le TBK1 activé induit la phosphorylation d'IRF3 et IRF7 sur des résidus sérine spécifiques, provoquant leur homo- ou hétérodimérisation. Ces dimères sont ensuite transloqués dans le noyau et activent la transcription des gènes de l'IFN de type I.

Plusieurs molécules régulatrices interviennent également dans cette voie de signalisation. Ainsi, TRAF3 régule positivement l'activation des IRF activés par TBK1, tout comme la cyclophiline B (**CYPB**), impliquée dans la phosphorylation de l'IRF3 induite par le virus (Obata et al. 2005). CYPB interagit avec IRF3 immédiatement après l'infection virale et aide à la phosphorylation induite par TBK1 et à la dimérisation de l'IRF3.

Une autre isomérase peptidylprolyl, **PIN1** (*cis-trans-peptidylprolyl isomerase, NIMA-interacting 1*), interagit avec la forme phosphorylée sur sérine de IRF3 dans le noyau et facilite la conjugaison de la polyubiquitine et la dégradation d'IRF3 dépendante du protéasome, achevant ainsi l'action de l'IRF3 (Saitoh et al. 2006). De plus, la molécule **SIKE** (*Suppressor of IκB (inhibitor of NF-κB)-kinase ε*) interagit avec IKKε et TBK1, et pourrait inhiber l'activation d'IRF3 après une infection virale (Huang et al. 2005). **LGP2** fonctionne directement comme un régulateur négatif de Rig-I et Mda5 tandis que la protéine **NS3-NS4A** du virus de l'hépatite C (HCV) est un inhibiteur des voies de signalisation IRF et NF-κB, car elle clive le domaine transmembranaire de IPS-1, libérant ainsi la protéine de la membrane mitochondriale et bloquant la signalisation en aval.

14.2.2. Reconnaissance de l'ADN double-brin :

Non seulement l'ARN double-brin, mais également l'ADN double-brin peuvent activer la voie induite par IPS-1, bien que les molécules de reconnaissance de l'ADN double-brin n'aient pas été identifiées (Ishii et al. 2006; Stetson and Medzhitov 2006) (voir figure 15). Par exemple, les virus à ADN double-brin, comme HSV, induisent les gènes de l'IFN de

type I par une voie indépendante des TLR et dépendante de IRF3 et IRF7 (Honda et al. 2005). Il semble donc que, de façon similaire aux réponses aux virus à ARN, la production d'IFN de type I puisse être induite par un système de surveillance cytosolique pour les virus à ADN, et il pourrait être envisagé que cela implique des molécules semblables à RIG-1 et Mda5. Notamment, plusieurs indices suggèrent que les vaccins à ADN plasmidique peuvent exercer leur activité adjuvante par des voies aussi bien indépendantes que dépendantes du TLR9 (Spies et al. 2003; Babiuk et al. 2004). Ce système de PRR cytosolique pourrait être impliqué dans la voie indépendante du TLR9.

Il a aussi été montré que la forme B de l'ADN (qui a une structure en double-hélice tournant vers la droite ; conformation principale de l'ADN *in vivo*) a une meilleure activité stimulatrice que la forme Z de l'ADN (qui a une structure en double-hélice tournant vers la gauche ; conformation consécutive à une méthylation, trouvée principalement dans les gènes en transcription et présente de façon transitoire) (Ishii et al. 2006), indiquant que la reconnaissance de l'ADN double-brin cytosolique dépend de la structure.

14.2.3. Reconnaissance des peptidoglycanes bactériens par les NOD :

Des études récentes ont montré que certains membres de la famille des NLR étaient impliqués dans la reconnaissance intracellulaire des produits microbiens. Il est bien établi que NOD1 et NOD2 reconnaissent des peptides dérivés du peptidoglycane, l'acide γ-D-glutamyl-*meso*-diaminopimelique (iE-DAP) (Chamaillard et al. 2003) et le muramyl dipeptide (MDP) (Girardin et al. 2003; Inohara et al. 2003), respectivement. La reconnaissance des ligands *via* les domaines LRR active les protéines NOD, qui recrutent ensuite la kinase à sérine-thréonine RICK (appelée aussi RIP2 ou CARDIACK) *via* une interaction CARD-CARD (Kobayashi et al. 2002) (voir figure 16). Dans la voie de signalisation de NOD2, l'activation de RICK mène à la polyubiquitination de NEMO/IKKγ, qui est suivie par la phosphorylation de IKKβ et celle de IκB, conduisant à la translocation de NF-κB dans le noyau (Abbott et al. 2004). CARD12 (connu aussi sous le nom de IPAF et CLAN) se lie à NOD1 et NOD2 *via* des interactions NOD-NOD (Zhou et al. 2004) et inhibe l'activation induite par NOD1 et NOD2 du NF-κB *in vitro* (Damiano et al. 2001). Cependant, des études récentes montrent que des bactéries invasives conduisent à l'activation de CARD12 et à l'induction d'expression de l'IL-1β (Damiano et al. 2004). Il a été montré que CARD6 interagissait physiquement avec NOD1 et RICK (mais pas avec NOD2) et supprimait l'activation du NF-κB induite par NOD1/RICK (Mariathasan et al. 2004). En plus de l'activation du NF-κB, la signalisation de

NOD1 et NOD2 conduit à l'activation de la voie des MAPK bien que le mécanisme précis reste inconnu (Strober et al. 2006).

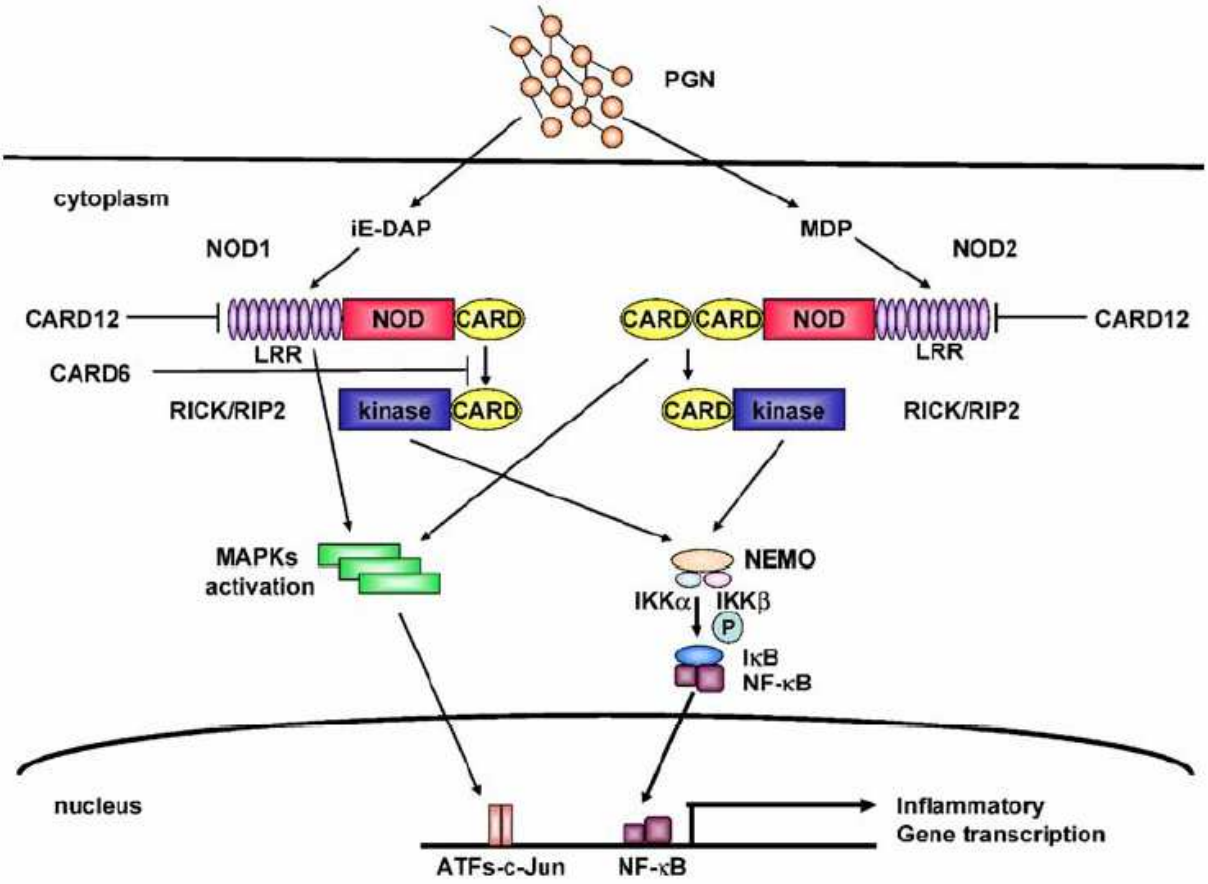


Figure 16. Voies de signalisation en aval des NOD après reconnaissance de peptidoglycanes bactériens. D'après (Uematsu and Akira 2006).

15. Conclusion de la 2ème partie

De nombreuses voies de signalisation différentes sont sollicitées après reconnaissance d'un pathogène, que ce soit par liaison aux TLR ou bien aux récepteurs cytoplasmiques, et les molécules impliquées peuvent être les mêmes pour plusieurs d'entre elles. Ainsi, par exemple, IKKε et TBK1 sont des points de convergence entre les voies des TLR3/4 et de RIG-I/Mda5.

De multiples facteurs entrent en jeu pour l'induction de réponses différentes par la cellule, tels que la localisation des récepteurs et la durée de la stimulation, comme on l'a vu pour les différents types de CpG, mais également le type de récepteur et les molécules qui lui sont associées. Les réponses de la cellule sont principalement de deux types : l'induction de gènes du NF-κB, conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires, et l'induction de gènes de l'IFNα/β. Ces transcriptions de gènes sont réalisées grâce à la liaison de facteurs de transcription différents sur les éléments de réponse, qui peuvent s'assembler en homo- ou

hétérodimères variés tels que IRF3 avec IRF7, IRF3 avec p65 ou p65 avec p50, conduisant à la transcription de gènes différents.

D'autre part, dans le cas de l'IFNα/β, une boucle de rétrocontrôle positive entre en jeu. Les petites quantités d'IFN-β produites après stimulation de récepteurs par un pathogène peuvent se lier au récepteur de l'IFNα/β sur la cellule ou une cellule voisine, activant ainsi la voie de signalisation de l'IFNα/β qui aboutit au final à la transcription de gènes de l'IFN-α, mais également de gènes codant pour l'IRF7, RIG-I et Mda5, permettant une amplification du signal. Dans ce contexte, la PDC représente un cas particulier, car elle contient de l'IRF7 de manière constitutive et peut produire d'emblée de grandes quantités d'IFN-α.

Encadré 12: Les différentes formes de mort cellulaire
Adapté de (Okada and Mak 2004)

Les différents types de mort cellulaire

Type de mort cellulaire	Changements morphologiques			Caractéristiques biochimiques	Méthodes de détection communes
	noyau	*membrane cellulaire*	*cytoplasme*		
Apoptose	Condensation de la chromatine; Fragmentation nucléaire; Clivage de l'ADN en unités nucléosomales	"blebbing"	Fragmentation (formation de corps apoptotiques)	Caspase-dépendante	Microscopie électronique; marquage TUNEL; marquage annexine; tests d'activité des caspases; tests de fragmentation de l'ADN; détection de l'augmentation du nombre de cellules en subG1/G0; détection du changement de potentiel de membrane mitochondrial
Autophagie	Condensation partielle de la chromatine; pas de clivage de l'ADN en unités nucléosomales	"blebbing"	Augmentation du nombre de vésicules autophagiques	Caspase-indépendante; augmentation d'activité lysosomale	Microscopie électronique; tests de dégradation protéique; tests de translocation de protéine-marqueur vers les membranes autophagiques; marquage au monodansylcadavérine (MDC)
Catastrophe mitotique	Micronuclei multiples; fragmentation nucléaire	-	-	Caspase-indépendante (au stade précoce); activation anormale de CDK1/cycline B	Microscopie électronique; tests de marqueurs mitotiques (MPM2); marquage TUNEL
Nécrose	Dégradation aléatoire de l'ADN nucléaire	Enflure; rupture	Augmentation de la vacuolation; dégénérescence des organelles; gonflement mitochondrial	-	Microscopie électronique; marquage nucléaire (généralement négatif); détection d'inflammation et de dommages dans les tissus environnants
Sénescence	Structures hétérochromatiques distinctes (foci hétérochromatiques associés à la sénescence)	-	Augmentation de la granularité	Activité SA-β-gal	Microscopie électronique; marquage SA-β-gal; tests d'arrêt de croissance; tests d'augmentation de p53; niveaux de INK4A et ARF (généralement augmentés); tests de phosphorylation de RB (généralement hypophosphorylé); tests d'activité des métalloprotéinases (généralement uprégulées)

CDK1: cyclin-dependent kinase; MDC: monodansylcadaverine; MPM2: mitotic phosphoprotein 2; SA-β-gal: senescence-associated β-galactosidase; RB: retinoblastoma protein.

3ème partie : TRAIL, inducteur d'apoptose.

16. L'apoptose

Le concept d'apoptose a été introduit pour la première fois en 1972 par John F. Kerr, Andrew H. Wyllie et Alister R. Currie pour désigner une forme de mort cellulaire contrôlée totalement différente - tant sous l'angle morphologique que biochimique - de la nécrose, seule forme de mort cellulaire connue et individualisée à cette époque. L'apoptose est un des principaux types de mort cellulaire programmée (*programmed cell death* = PCD). Les formes de PCD ne partagent pas toutes la morphologie et la séquence caractéristiques de l'apoptose, mais tous les types de PCD sont des processus hautement régulés (voir encadré n°12 "Les différentes formes de mort cellulaire.").

Avant d'être phagocytée, la cellule entrant en apoptose passe par différentes étapes correspondant à des changements intervenant en différents points de la cellule. Un des évènements précoces est la perte de l'asymétrie phospholipidique avec exposition des phosphatidylsérines (PS), normalement présentes sur le feuillet cytosolique de la double couche lipidique de la membrane plasmique, à la surface externe de la membrane cellulaire (*flip-flop*). Ce phénomène très rapide est l'une des marques de reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes, comme les macrophages, grâce à des récepteurs spécialisés appelés *scavenger receptors*. En parallèle, la mitochondrie de la cellule apoptotique va subir plusieurs modifications majeures. L'ouverture des pores de transition de perméabilité (PT) mitochondriale entraîne la réduction du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) (Marchetti et al. 1996). Ces pores autorisent ensuite la libération dans le cytoplasme de plusieurs protéines telles que le cytochrome *c* (Yang et al. 1997), SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspases*) /DIABLO (*direct inhibitor of apoptosis* (IAP)-*binding protein with low pI*), AIF (*apoptosis-inducing factor*), EndoG (endonucléase G) et OMI/HTRA2 (*high-temperature-requirement protein A2*) (Wang 2001), ainsi que des enzymes comme les caspases. Un événement plus tardif concerne l'activation d'une enzyme (CAD = Caspase activated deoxyribonuclease), *via* les caspases, qui entre dans le noyau et clive l'ADN en oligonucléosomes pour donner sur gel d'agarose une image "en barreaux d'échelle", caractéristique des cellules apoptotiques (Sakahira et al. 1998). Finalement, la membrane plasmique bourgeonne et la cellule est soit phagocytée directement, soit partagée en plusieurs vésicules appelées corps apoptotiques, dans lesquels les organites intracellulaires sont structurellement intacts. Les corps apoptotiques formés sont alors phagocytés par les macrophages ou des cellules épithéliales normales du voisinage ; la formation de corps

Encadré 13: Nécrose *vs* Apoptose

(Vermes and Haanen 1994)

La **nécrose** intervient lorsque les cellules sont exposées à d'extrêmes variations de leurs conditions physiologiques (ex: hypothermie, hypoxie…) qui pourraient entraîner des dommages de la membrane plasmique. Dans des conditions physiologiques, ces dommages peuvent apparaître par l'intermédiaire du complément ou de virus lytiques. La nécrose commence avec un trouble dans la capacité de la cellule à maintenir l'homéostasie, conduisant à un influx d'eau et d'ions extracellulaires. Les organites intracellulaires, et plus particulièrement la mitochondrie, ainsi que la cellule entière, se gonflent et rompent (lyse cellulaire). Avec l'éclatement final de la membrane plasmique, le contenu cytoplasmique, dont les enzymes lysosomales, est libéré dans le fluide extracellulaire. *In vivo*, la mort cellulaire nécrotique est donc souvent associée à des dommages tissulaires étendus, conduisant à une réponse inflammatoire intense (Van Furth and Van Zwet 1988).

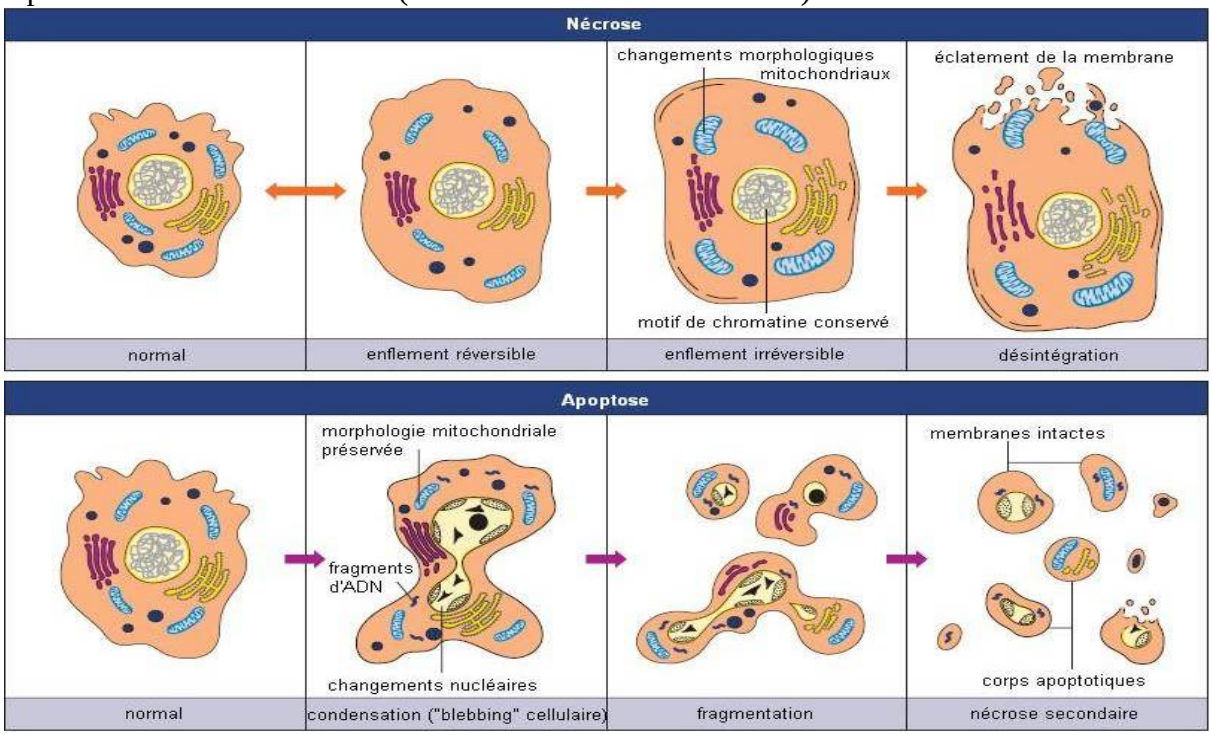


Figure 8. Caractéristiques morphologiques de la nécrose et de l'apoptose. Adapté de (Boehringer-Mannheim 1998).

Au contraire, l'**apoptose** est un type de mort cellulaire qui intervient dans les conditions physiologiques normales et la cellule participe activement à sa propre disparition ("suicide cellulaire"). Elle apparaît le plus souvent pendant le renouvellement cellulaire normal et l'homéostasie des tissus, l'embryogénèse, l'induction et le maintien de la tolérance immune, le développement du système nerveux. Les cellules induites en apoptose présentent des caractéristiques morphologiques et biochimiques particulières (Cohen 1993). Ces caractéristiques comprennent l'agrégation de la chromatine, la condensation nucléaire et cytoplasmique, la partition du cytoplasme et du noyau dans des vésicules formées de morceaux de membrane (corps apoptotiques) qui contiennent des ribosomes, la mitochondrie morphologiquement intacte, et le matériel nucléaire. *In vivo*, ces corps apoptotiques sont rapidement reconnus et phagocytés par les macrophages ou les cellules épithéliales adjacentes (Savill et al. 1989). Grâce à ce mécanisme efficace de suppression des corps apoptotiques, aucune réponse inflammatoire n'est provoquée *in vivo*. *In vitro*, les corps apoptotiques et les fragments cellulaires restants gonflent finalement et se lysent. Cette phase terminale de la mort cellulaire *in vitro* a été appelée "nécrose secondaire".

apoptotiques avec membrane plasmique intacte empêche la libération des constituants intracellulaires et donc la réaction inflammatoire (Savill et al. 2003). L'apoptose est donc une "mort silencieuse" qui doit ainsi être distinguée de la nécrose, forme de mort cellulaire passive, toujours pathologique et déclenchée par une agression, aboutissant à l'éclatement de la cellule suivi d'une réaction inflammatoire locale.

L'apoptose joue un rôle général au sein d'un organisme, dans la régulation de l'homéostasie cellulaire, la "sculpture" de l'organisme au cours du développement et l'élimination des cellules indésirables ou dangereuses comme les cellules tumorales, infectées par un virus ou les cellules immunitaires reconnaissant le Soi pouvant mener à une maladie auto-immune. Une dérégulation de l'apoptose peut aggraver ou causer des maladies comme les maladies neurodégénératives, les attaques ischémiques, le cancer (dans lequel les cellules tumorales perdent leur capacité à entrer en apoptose), les maladies auto-immunes (dans lesquelles les cellules immunitaires auto-réactives induisent les cellules normales en apoptose), les maladies virales, comme le SIDA (dans lequel le nombre de cellules T *helper* $CD4^+$ s'effondre).

Dans le cas particulier du système immunitaire, l'apoptose est importante pour la sélection des lymphocytes. En effet, la survie d'un tissu dépend de sa réception continuelle de signaux de survie. Dans le cas des lymphocytes T, tandis qu'ils se développent et deviennent matures dans le thymus, les signaux de survie correspondent à leur capacité à reconnaître des molécules du CMH du Soi (sélection positive), puis à leur faible affinité pour des antigènes du Soi (sélection négative). Les cellules ayant reçu le signal de survie ne meurent pas, grâce à l'activation de gènes inhibiteurs de l'apoptose. Dans le cas des lymphocytes B, l'apoptose intervient pour éliminer les cellules immatures qui reconnaissent des antigènes du Soi alors qu'elles sont encore dans la moelle osseuse. Cela permet de sélectionner un répertoire de cellules B tolérantes au Soi. Par ailleurs, l'apoptose des lymphocytes T matures permet de préserver l'homéostasie périphérique et la tolérance en prenant en compte les profonds changements du nombre et du type de cellules T stimulées par les antigènes. Il existe au moins deux voies conduisant à l'apoptose des cellules T. L'apoptose dite "active" (ou *Activation-Induced Cell Death* = AICD) se produit si les cellules T sont fortement stimulées par un antigène, avec un réengagement du TcR à plusieurs reprises ou lors de la présence de l'antigène de manière continue. Elle implique les cytokines de mort, telle que FasL et TNF, qui sont fortement induites dans les cellules T stimulées par IL-2 (Zheng et al. 1998). L'apoptose dite "passive", conduisant à l'apoptose des cellules T, accompagne la disparition

d'un antigène à la fin d'une réponse immune. Elle résulte de la disparition d'une substance trophique importante comme l'IL-3 et activerait les caspases (Ohta et al. 1997).

D'un autre côté, les lymphocytes T, tout comme les cellules NK, possèdent des fonctions cytotoxiques. Leur rôle est principalement d'éliminer les cellules non désirées dans l'organisme, telles que les cellules tumorales ou infectées. Les cellules NK activées et les CTL utilisent deux mécanismes principaux pour détruire les cellules tumorales : (1) la libération de granules cytotoxiques contenant la perforine, les granzymes et d'autres constituants (Trapani and Smyth 2002) et (2) l'expression de ligands de mort comme FasL ou TRAIL (Kayagaki et al. 1999). Les produits apoptotiques eux-mêmes jouent un rôle intéressant dans l'immunité anti-tumorale. En effet, les cellules dendritiques sont capables de phagocyter des cellules tumorales apoptotiques (Albert et al. 1998). L'antigène dérivé de ces cellules apoptotiques pourra être *cross*-présenté aux cellules T $CD8^+$ par les cellules dendritiques après maturation. L'antigène issu de cellules nécrotiques ne pourra, à l'inverse, pas activer cette voie, car il n'est pas présenté par le CMH de classe I. Les cellules dendritiques sont en effet des cellules présentatrices d'antigènes "professionnelles". Leur nombre et disponibilité ont donc une influence importante sur la réponse immune résultante. Elles peuvent être tuées par les lymphocytes T cytotoxiques, qui sont capables de réduire rapidement et spécifiquement la réserve de DC présentant l'antigène spécifique qu'ils reconnaissent (Hermans et al. 2000). L'induction de mort des DC pourrait donc être un mécanisme pour diminuer la réponse CTL. Cependant, la situation inverse peut se produire également. En effet, les DC peuvent devenir résistantes à la lyse par les CTL. Des DC murines et humaines qui ont été activées *in vivo* par CD40L ou le LPS expriment un inhibiteur de sérine protéase, SPI-6 chez la souris et PI-9 chez l'homme, qui peut empêcher l'activation des caspases dépendante du granzyme des CTL et l'apoptose consécutive des cellules cibles (Medema et al. 2001). Il est d'autre part intéressant de noter que la baisse de réponse des DC aux signaux de mort induits par FasL ou TRAIL, joue un rôle dans des maladies lymphoprolifératives comme les ALPS (*Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome*) (Wang et al. 1999). Dans ce cas, l'augmentation de survie des DC pourrait entraîner des réponses immunes anormalement amplifiées, suggérant encore que l'élimination des DC est importante dans l'homéostasie de la réponse immune.

17. Les caspases, actrices principales de l'apoptose

Les caspases sont des protéases possédant toutes une cystéine dans leur site actif (QA**C**xG) et clivant sélectivement leurs substrats après des résidus acide aspartique. A ce

jour, 14 caspases de mammifères distinctes ont été identifiées, dont 11 chez l'homme (Shi 2002).

17.1. Structure

Les caspases sont exprimées sous la forme de proenzymes ou zymogènes (30 à 50 kDa), précurseurs inactifs contenant trois domaines : un prodomaine de taille variable, localisé dans l'extrémité N-terminale, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (17-21 kDa, qui porte le centre actif) et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité (10-14 kDa). Certains membres de la famille des caspases possèdent un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité.

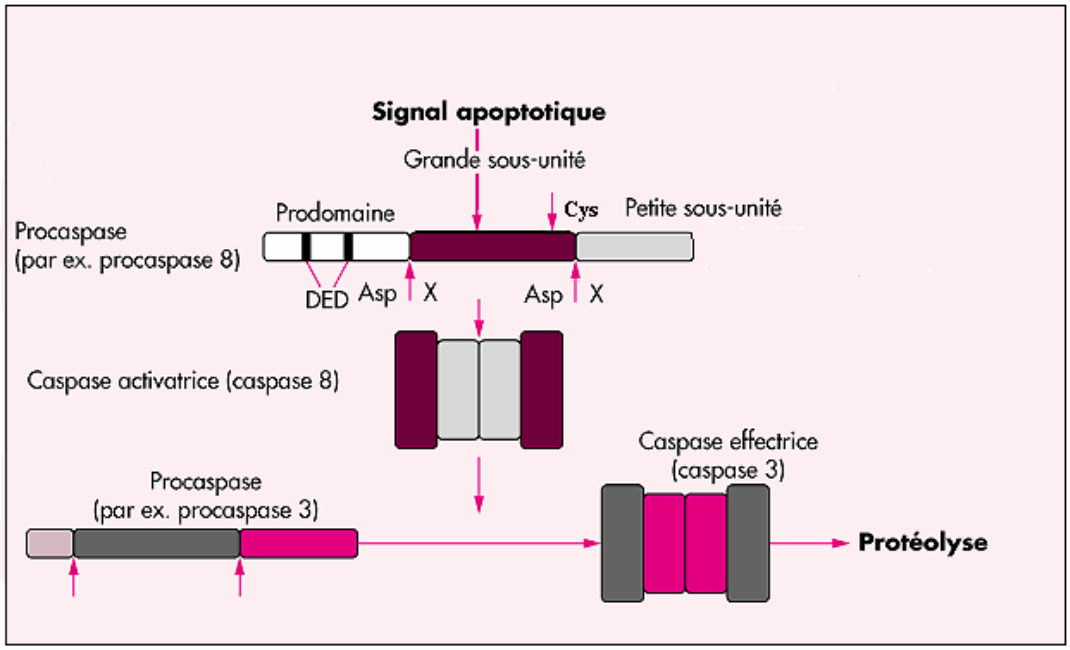


Figure 17. Activation séquentielle des caspases. D'après (Ségal-Bendirdjian 1999).

Les prodomaines sont variables, à la fois dans leur taille et dans leur séquence. On distingue les caspases à prodomaine long (caspases -1, -2, -4, -5, -8, -9 et -10) qui sont initiatrices ou activatrices (elles interagissent avec les protéines adaptatrices et s'oligomérisent avec d'autres pro-caspases avant de s'activer par un mécanisme d'auto-protéolyse) et les caspases à prodomaine court (caspases –3, -6 et –7) qui sont effectrices (elles coupent les substrats spécifiques lorsqu'elles sont activées par les caspases initiatrices).

Les prodomaines semblent jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines. Ainsi les prodomaines des caspases-8 et -10 contiennent des domaines effecteurs de mort cellulaire (ou *Death Effector Domains* : DED) qui sont des structures permettant la liaison de

la caspase aux molécules adaptatrices FADD (Chinnaiyan et al. 1995) ou TRADD (Hsu et al. 1995). Certaines autres caspases (caspases -1, -2, -4 et -9) possèdent un Domaine de Recrutement des Caspases (ou *Caspase Recruitment Domain* : CARD (Hofmann et al. 1997)). Ces CARD jouent un rôle dans l'interaction entre caspases ainsi qu'avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices, comme les récepteurs NOD.

17.2. Activation

La grande sous-unité de toutes les caspases porte le site catalytique, très conservé. Les pro-caspases subissent une maturation par clivages successifs au niveau de leurs aspartates (d'abord coupure entre la grande et la petite sous-unité, suivie par la libération du prodomaine) et l'assemblage en hétérodimère de la petite et de la grande sous-unité. L'enzyme active est un tétramère formé par l'association de ces deux hétérodimères *via* une interaction entre les deux petites sous-unités (voir figure 17).

Les caspases vont pouvoir s'auto-activer et/ou être activées par d'autre caspases. Une fois les caspases initiatrices activées, elles vont pouvoir cliver d'autres caspases encore à l'état de zymogène (notamment les caspases effectrices). Ce type d'activation en cascade permet probablement la régulation et l'amplification du signal.

18. Induction de l'apoptose et voies de signalisation

18.1. Induction

De multiples inducteurs peuvent provoquer *in vitro* l'apoptose. On peut les classer en deux types: d'un côté, les évènements provoquant des lésions de l'ADN ou agissant directement sur la mitochondrie, comme la déprivation en sérum, et de l'autre côté, les facteurs de mort.

18.1.2. Les évènements agissant sur l'ADN et la mitochondrie:

Les formes de stress cellulaire comme la déprivation en nutriments, la carence en facteurs de croissance (NGF, IL-2…), l'oxydation due aux radicaux libres, une infection virale, de nombreux médicaments (en particulier des médicaments anti-tumoraux), l'inhibiteur de protéine kinase staurosporine, mais également des agents physiques comme les rayons UV et les radiations ionisantes ou des composés cytotoxiques comme l'etoposide, la doxorubicine et l'alcool peuvent entraîner une apoptose qui sera induite par activation de la mitochondrie. Certains de ces stress agissent par le biais des lésions qu'ils provoquent dans l'ADN et qui

Encadré 14: Nomenclature des récepteurs et ligands de la famille du TNF

récepteurs			**ligands**		
nom utilisé dans le manuscrit	**noms alternatifs**	**CD**	**nom utilisé dans le manuscrit**	**noms alternatifs**	**CD**
TNF-R1 (*tumor necrosis factor receptor 1*)	DR1/p55/p60	CD120a	TNF-alpha et lymphotoxines alpha		
Fas	DR2/Apo1	CD95	FasL	CD95L	CD178
DR3 (*death receptor 3*)	Apo3/LARD/TRAMP/WSL1		TWEAK	Apo3L	
DR4	TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*)	CD261	TRAIL	Apo2L	CD253
DR5	TRAIL-R2 /Apo2/TRICK2/KILLER	CD262			
DcR1 (*decoy receptor 1*)	TRAIL-R3/LIT/TRID	CD263			
DcR2	TRAIL-R4/TRUNDD	CD264			
OPG (*osteoprotegerin*)	OCIF		TRAIL et RANKL	Apo2L et OPGL/TRANCE	
RANK		CD265	RANKL	OPGL/TRANCE	CD254
DcR3			LIGHT et FasL		CD258
DR6					
CD27		CD27			
CD30		CD30			
CD40		CD40			
TNF-R2		CD120b	TNF-alpha et lymphotoxines alpha		
Ox40		CD134			
4-1BB		CDw137			
NGFR (récepteur p75 du *nerve growth factor*)		CD271			

activent des molécules nucléaires, tandis que d'autres vont agir directement sur la mitochondrie, ou en utilisant des molécules pro-apoptotiques présentes dans le cytoplasme. Un exemple intéressant est le déclenchement de l'apoptose par l'enzyme nucléaire *poly ADP ribose polymerase-1* (PARP-1) (Chiarugi and Moskowitz 2002). Cette enzyme joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité génomique, et l'activation massive de PARP-1 peut réduire le nombre des molécules fournissant l'énergie de la cellule, un évènement qui envoie des signaux du noyau vers la mitochondrie pour déclencher le processus apoptotique.

18.1.3. Les facteurs de mort et leurs récepteurs:

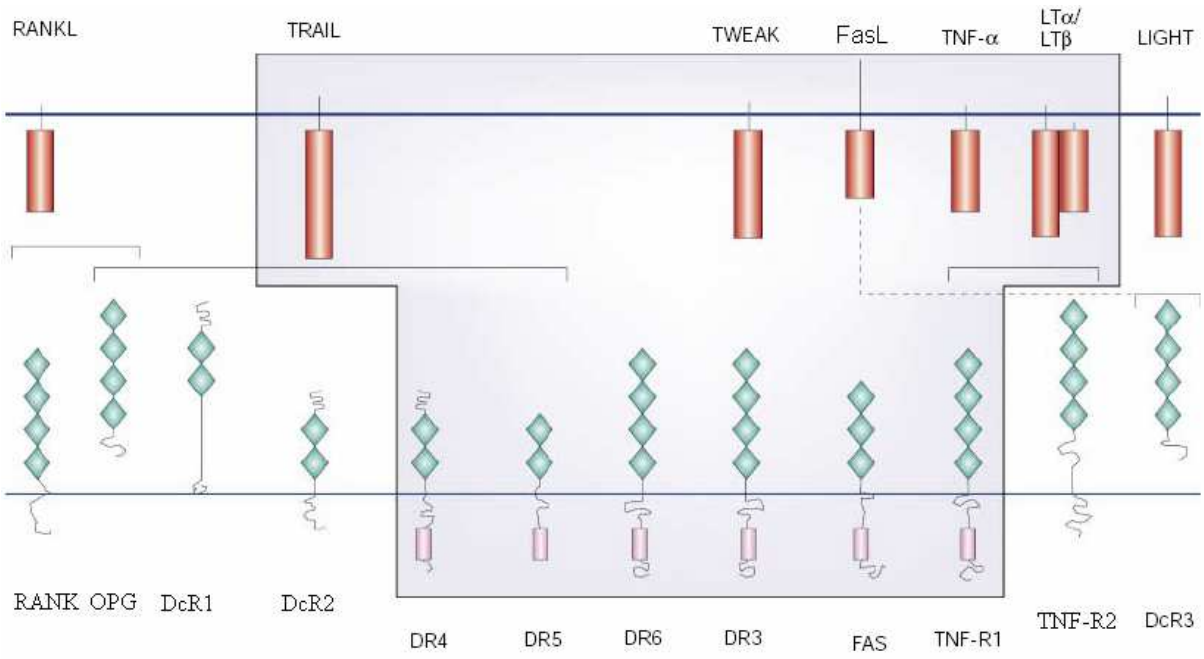


Figure 18. Quelques couples ligand/récepteur de la famille du TNF. Les récepteurs et ligands de mort sont regroupés dans le cadre bleu. DcR3 (*decoy receptor 3*) agit comme récepteur leurre pour FasL (pointillés). D'après (Igney and Krammer 2002).

Il existe plusieurs couples récepteur/ligand impliqués dans l'apoptose (voir encadré n°14 "nomenclature des récepteurs et ligands de la famille du TNF" et figure 18). Les récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des gènes du récepteur au TNF (Zhang 2004). Les membres de la famille du TNF-R sont des protéines transmembranaires de type I possédant dans leur domaine extracellulaire une à six régions riches en cystéines, impliquées dans la liaison du ligand. Cette famille de récepteurs est ambivalente, dans le sens où ses membres peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire, soit la survie, soit la mort soit les deux (Gaur and Aggarwal 2003). Les récepteurs CD27, CD30, CD40, TNF-R2, Ox40, 4-1BB et le récepteur p75 du *nerve growth factor* (NGFR) sont plutôt impliqués dans la survie cellulaire tandis que Fas, TNF-R1, DR3, DR4, DR5 et DR6, également appelés récepteurs de mort, contiennent une séquence cytoplasmique homologue d'environ 80 acides aminés

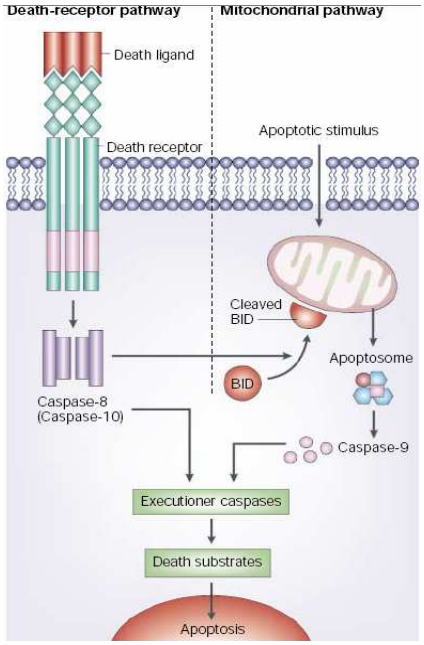


Figure 19. Les deux voies de signalisation de l'apoptose: passant directement par les caspases (à gauche) et passant par la mitochondrie (à droite). D'après (Igney and Krammer 2002).

appelée "domaine de mort" (*death domain* = DD), par laquelle ils transmettent le signal apoptotique.

Les ligands qui activent ces récepteurs sont des molécules appartenant à la superfamille du TNF (Zhang 2004). Ces ligands sont, en grande majorité, des protéines transmembranaires de type II, qui présentent donc leur extrémité C-terminale du côté extracellulaire. Le domaine extracellulaire est composé d'environ 150 acides aminés et possède 20 à 25 % d'homologie avec les autres membres de la famille du TNF. Ces protéines sont trimériques et certaines d'entre elles, telle que FasL et TRAIL, existent également sous forme soluble. La forme soluble est obtenue par protéolyse induite par une famille de métalloprotéases membranaires. Les récepteurs de mort se trimérisent avant ou pendant la fixation à leur ligand et transmettent le signal apoptotique en aval.

18.2. Voies de signalisation

Deux types de signalisation basés sur le modèle du CD95 ont été établis pour initier l'apoptose (Barnhart et al. 2003) (voir figure 19) (la signalisation en aval des récepteurs TRAIL-R1/R2 est similaire à la signalisation de CD95).

L'une est induite exclusivement par les récepteurs de mort ou le granzyme à la surface cellulaire. Elle est aussi appelée voie de signalisation "extrinsèque" (Schmitz et al. 2000) et se produit dans les cellules de type I. Les cellules de type I sont caractérisées par de hauts niveaux de formation du *death-inducing signaling complex* (DISC) et des quantités importantes de caspase-8 active. La caspase-8 activée conduit directement à l'activation de caspases effectrices en aval.

L'autre est induite par la mitochondrie. Elle peut être nommée voie de signalisation "intrinsèque" (Schmitz et al. 2000) et se produit dans les cellules de type II. Dans ces cellules, il y a de plus faibles niveaux de formation du DISC de CD95 ou TRAIL-R1/R2 et donc de plus faibles niveaux de caspase-8 active. L'activation des caspases ainsi que l'apoptose sont bloquées par une surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-X_L. Dans ce cas, la signalisation nécessite une boucle d'amplification additionnelle qui implique le clivage par la caspase-8 de la

protéine Bid de la famille du Bcl-2 pour générer un Bid tronqué (t) et une libération consécutive de cytochrome *c* par la mitochondrie induite par tBid. Cette seconde voie peut donc être activée par les récepteurs de mort, mais également par les stimuli apoptotiques agissant directement sur la mitochondrie.

Dans les deux types de signalisation, lorsque l'apoptose est induite par les récepteurs de mort, la formation de complexes de signalisation est requise.

18.2.1. Complexes de signalisation:

Deux types de complexes de signalisation liés aux récepteurs de mort peuvent être distingués. Le premier groupe comprend les DISC qui sont recrutés par les récepteurs CD95, DR4 ou DR5 (Peter and Krammer 2003) dans des compositions semblables (voir figure 20). La formation du DISC entraîne l'activation de la caspase-8 (et/ou de la caspase-10), qui joue

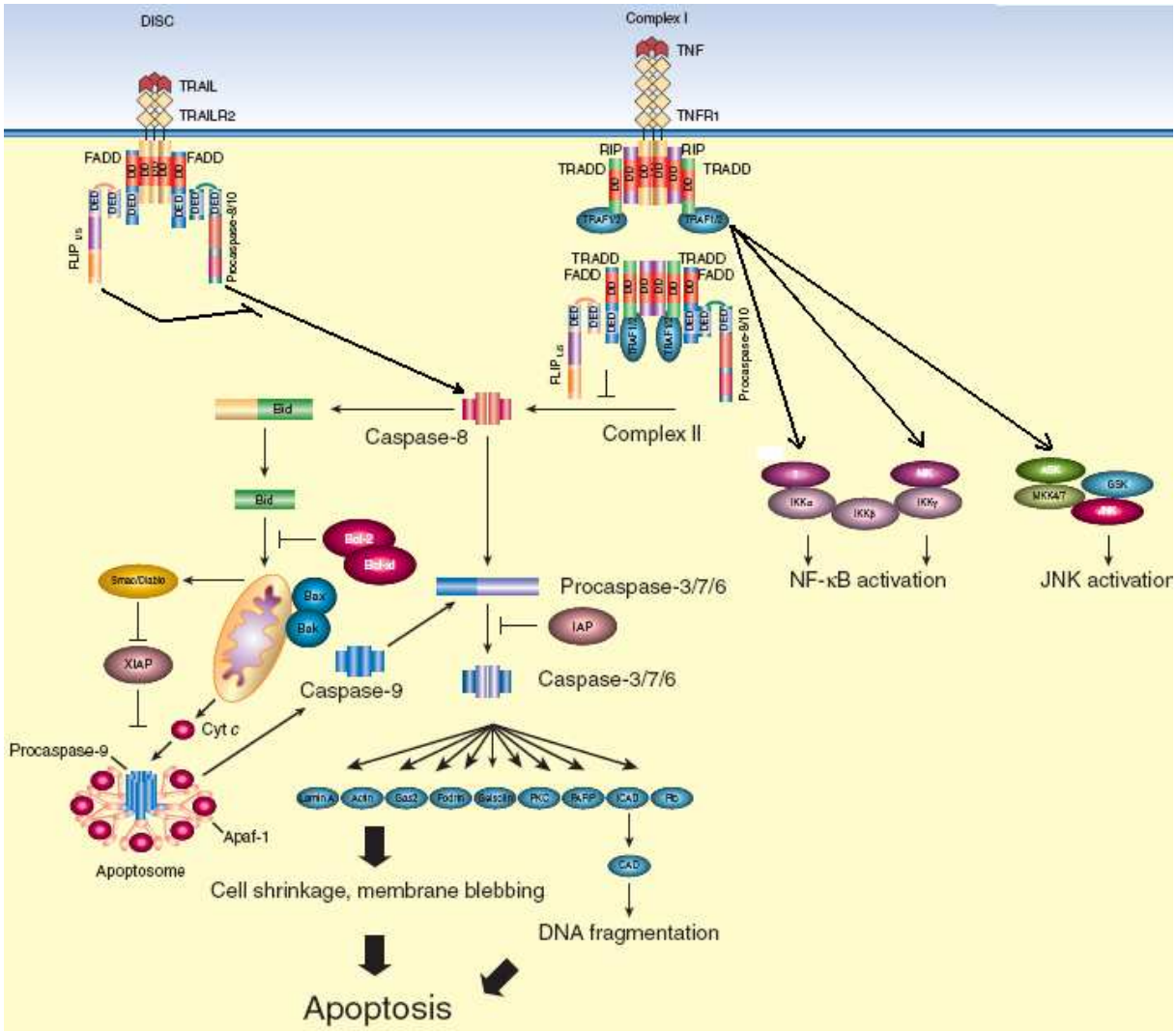


Figure 20. Les deux types de complexes de signalisation (le DISC et le Complex I), et les voies de signalisation intracytoplasmiques menant à l'apoptose (voie directe des caspases et voie mitochondriale) ou à la survie (activation du NF-κB). D'après (Lavrik et al. 2005).

un rôle central dans la transduction du signal apoptotique.

Le second groupe, qui ne sera pas détaillé, comprend les complexes de signalisation recrutés par les récepteurs TNFR1, DR3, DR6 et EDAR (Muppidi et al. 2004). Ceux-ci recrutent un lot différent de molécules (TRADD, RIP, TRAF-1/2), qui transmettent à la fois des signaux apoptotiques et de survie (en induisant l'activation de NF-κB, qui mène à l'expression de gènes de survie) (voir figure 20).

18.2.3. Voie de signalisation des caspases (ou voie "extrinsèque"):

Les DISC de CD95 et DR4/DR5 consistent en des récepteurs oligomérisés, probablement trimérisés, la molécule adaptatrice contenant un domaine de mort (DD) FADD (*Fas-Associated Death Domain* /MORT1), deux isoformes de la pro-caspase-8 (pro-caspase-8/a et pro-caspase-8/b), la pro-caspase-10 et la protéine cellulaire $FLIP_{L/S}$ (*FLICE inhibitory protein*) (Bodmer et al. 2000; Kischkel et al. 2000; Sprick et al. 2000; Peter and Krammer 2003) (voir figure 20). TRAIL peut déclencher l'apoptose *via* DR4, DR5 (Kischkel et al. 2000; Sprick et al. 2000) ou des hétérocomplexes de DR4 et DR5 (Kischkel et al. 2000).

Les interactions entre les molécules du DISC sont basées sur des contacts homotypiques. Le DD du récepteur interagit avec le DD de FADD tandis que le DED de FADD interagit avec les tandems N-terminaux de DED de la pro-caspase-8, la pro-caspase-10 et $FLIP_{L/S}$. L'activation de la pro-caspase-8 semble suivre un modèle dans lequel de hautes concentrations locales de la pro-caspase-8 dans le DISC mènent à son activation autoprotéolytique pour propager le signal apoptotique.

Les propriétés de la caspase-8 sont très bien caractérisées et son rôle primordial en tant que caspase apicale dans la signalisation des récepteurs de mort tels que CD95L et TRAIL a été bien établi (Juo et al. 1998; Bodmer et al. 2000; Sprick et al. 2000). En plus de son rôle de caspase apicale, la caspase-8 pourrait être activée par des caspases en aval, comme la caspase-6, dans une boucle de rétrocontrôle positive (Cowling and Downward 2002), aboutissant potentiellement au ciblage de la mitochondrie dépendant de Bid.

La caspase-10 est structurellement similaire à la caspase-8, cependant, sa capacité à remplacer fonctionnellement la caspase-8 est controversée. Plusieurs groupes furent incapables de retrouver la caspase-10 endogène dans le DISC natif de TRAIL ou FasL (Bodmer et al. 2000; Sprick et al. 2000) et certaines études tendent à suggérer qu'elle ne serait pas capable de remplacer fonctionnellement la caspase-8 sauf à de très hauts niveaux d'expression (Sprick et al. 2002). Pourtant, d'autres groupes démontrèrent que la caspase-10 endogène était recrutée et activée dans le DISC de TRAIL et FasL, et qu'elle était capable de

transmettre un signal apoptotique, bien qu'atténué, en absence de la caspase-8 (Kischkel et al. 2001; Wang et al. 2001). De plus, les lymphocytes des patients atteints de ALPS II (maladie autoimmune caractérisée par une homéostasie anormale des lymphocytes et cellules dendritiques) portant une mutation de la caspase-10 sont résistants à la mort par TRAIL (Wang et al. 1999; Zheng and Flavell 1999). En accord avec ces données, la perte de la caspase-10, souvent de façon post-transcriptionnelle, est beaucoup plus commune que la perte de la caspase-8 dans des tumeurs variées, suggérant que la caspase-10 pourrait avoir un rôle plus significatif dans la résistance à l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Kischkel et al. 2001; Park et al. 2002; Shin et al. 2002). La caspase-10 pourrait ainsi fonctionner comme suppresseur de tumeur.

Les caspases-8 et -10 activées clivent ensuite la caspase-3 exécutrice, laquelle conduit à son tour au clivage des substrats de mort (voir figure 20).

18.2.3.1. FLIP

L'activité des caspases initiatrices -8 et -10 peut être régulée par une famille de protéines appelées FLIP (*FADD-like interleukin-1 β-converting enzyme-like protease (FLICE/caspases-8)-inhibitory proteins*). Les FLIP virales (v-FLIP) ont été identifiées dans plusieurs virus *γ-herpes* (Thome et al. 1997). Elles possèdent des capacités anti-apoptotiques qui permettent aux virus d'échapper aux réponses apoptotiques antivirales de l'hôte. Une analyse de leur séquence a révélé que les v-FLIP contenaient deux DED dans leur partie N-terminale et avaient une homologie considérable avec la caspase-8 et la caspase-10. D'autres observations ont indiqué que les v-FLIP étaient capables de se lier à FADD et à la caspase-8 *via* des interactions homotypiques. Cette liaison bloque le recrutement de la caspase-8 dans le DISC et empêche donc son activation (Thome et al. 1997). Un homologue cellulaire des v-FLIP a ensuite été identifié et appelé c-FLIP. Deux variants d'épissage – une forme longue ($FLIP_L$) et une forme courte ($FLIP_S$) – ont été identifiés dans les cellules humaines. La forme courte est structuralement et fonctionnellement similaire à v-FLIP.

18.2.3.2. Les IAP

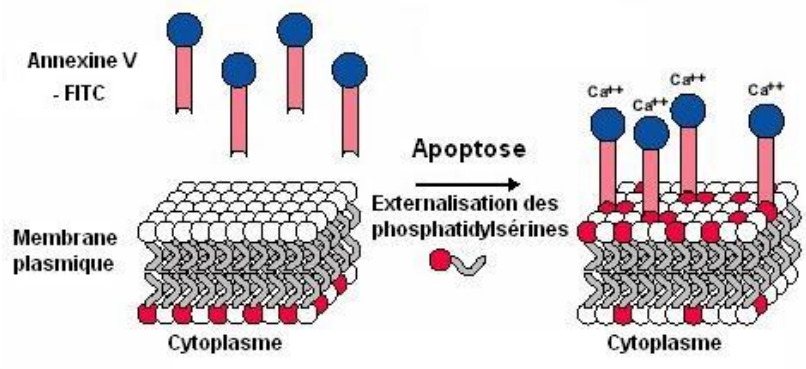
Les IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) sont une famille de protéines qui fonctionnent comme des régulateurs de la cascade des caspases. Elles pourraient aussi fonctionner comme ligases de l'ubiquitine, aidant à la dégradation des caspases qu'elles lient.

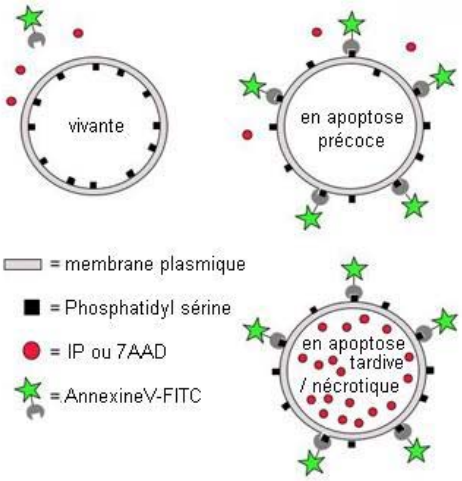
Des protéines cellulaires inhibant les caspases initiatrices spécifiques ont été identifiées, mais les IAP sont les seules protéines endogènes connues qui régulent à la fois

Encadré 15: Quelques méthodes de mesure de l'apoptose

Annexine V / IP (ou 7AAD):

La translocation de la phosphatidylsérine du feuillet interne de la membrane cellulaire à son feuillet externe (*flip-flop*) est un signe précoce de l'apoptose. La présence de ce phospholipide à la surface de la cellule favoriserait la phagocytose des cellules en apoptose, à cause de récepteurs présents sur la membrane plasmique des macrophages.

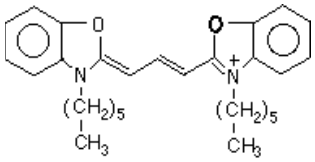




L'Annexine V est une protéine capable de se lier avec une haute affinité à ces molécules, de façon dépendante du calcium. Lorsqu'elle est couplée à un fluorochrome (comme le FITC), sa fluorescence peut être détectée en cytométrie de flux.

Les cellules en apoptose plus tardive et les cellules mortes sont identifiées par leur perte d'intégrité membranaire qui se traduit par une incorporation d'iodure de propidium (IP) ou de 7AAD, agents intercalants de l'ADN fluorescents (en FL-2 et FL-3).

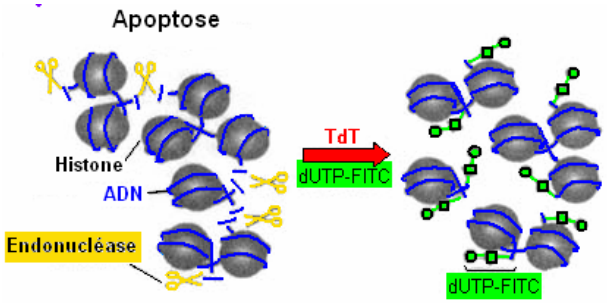
DioC6(3):



Le DioC6(3) (= 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) est un fluorochrome lipophilique qui possède une tête à domaine polycyclique chargée positivement et deux queues hydrocarbone. Il s'accumule dans les membranes intracellulaires en fonction du gradient de potentiel transmembranaire. A faible concentration, il marque juste la mitochondrie de par son potentiel de membrane très négatif. Or, un des évènements intracellulaires les plus précoces durant l'apoptose est une réduction du potentiel transmembranaire mitochondrial de la cellule. Le DioC6(3) ne peut donc plus s'accumuler dans les membranes intracellulaires mitochondriales des cellules apoptotiques. En cytométrie de flux, seules les cellules vivantes restent marquées par le DioC6(3) qui fluoresce.

TUNEL:

Un évènement apoptotique plus tardif correspond au clivage de la chromatine par une endonucléase au niveau de l'ADN de liaison, entre les nucléosomes, formant ainsi des fragments d'ADN nucléaire, tous multiples de 180 paires de bases (aspect en "échelle" sur gel d'électrophorèse), qui consistent en des multimères de nucléosomes.



Dans la méthode TUNEL **(**TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling method), les terminaisons d'ADN 3'-OH générées par la fragmentation de l'ADN sont marquées avec des dUTP-FITC, réaction catalysée par la terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT).

l'activité des caspases initiatrices et effectrices. Les IAP sont caractérisées par la présence de un à trois domaines BIR (*baculoviral IAP repeat*) de 70-80 acides aminés, et pour certaines, un motif *RING-finger* en C-terminal (Liston et al. 2003). La caractérisation des protéines IAP suggère qu'elles fonctionnent comme des inhibiteurs de caspases endogènes (caspases-3, -7 et -9), autant qu'elles participent à la régulation du cycle cellulaire et à la modulation du signal de transduction induit par le récepteur (Liston et al. 2003).

Huit membres de la famille des IAP ont été identifiés dans les cellules humaines: XIAP (*X-linked IAP*, hILP, MIHA, ILP-1), cIAP1 (MIHB, HIAP-2), cIAP2 (HIAP-1, MIHC, API2), NAIP (*neuronal apoptosis-inhibitory protein*), ML-IAP (*melanoma IAP*) / livine, ILP2 (*IAP-like protein-2*), Bruce/apollon et la survivine.

Les IAP sont inhibées par deux protéines nommées SMAC/DIABLO (Du et al. 2000) et HtrA2/Omi (Verhagen et al. 2002), qui sont libérées par la mitochondrie avec le cytochrome *c* pendant l'apoptose et permettent l'activation des caspases en se liant de façon compétitive et en inhibant les IAP (Du et al. 2000).

18.2.4. Voie de signalisation mitochondriale (ou voie "intrinsèque"):

Dans les cellules de type II, l'activation de la mitochondrie, qu'elle implique le clivage par la caspase-8 de la protéine Bid de la famille du Bcl-2 pour générer un Bid tronqué (t) ou bien d'autres inducteurs, entraîne la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération consécutive dans le cytosol de cytochrome *c*, d'AIF et d'autres facteurs apoptogènes de l'espace intermembranaire. Le cytochrome *c* cytosolique et l'ATP vont interagir avec la protéine Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) pour induire sa multimérisation (Zou et al. 1999). Les changements conformationnels de Apaf-1 associés à cette liaison exposent le CARD N-terminal, facilitant l'interaction CARD-CARD avec les molécules de pro-caspase-9. Ceci produit un complexe appelé "apoptosome" composé de sept molécules Apaf-1 liées au cytochrome *c* surmontant sept molécules de pro-caspase-9 au centre (Acehan et al. 2002) et entraîne, en présence d'ATP, l'auto-activation de la pro-caspase 9. Cette activation est elle-même responsable de l'activation de pro-caspases effectrices en aval, comme la pro-caspase 3, conduisant à l'apoptose (Zou et al. 1999) (voir figure 20). La cinétique d'activation de la caspase-8 dans ces cellules est lente.

Des études dans des lignées cellulaires et *in vivo* ont démontré l'existence de lignées cellulaires de type I et de type II en réponse à TRAIL (Ozoren et al. 2000; Burns and El-Deiry 2001).

La signalisation du CD95 et de TRAIL-R1/R2 de type II peut être bloquée par les membres de la famille du Bcl-2 anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-X_L (Willis et al. 2003).

18.2.4.1. Les membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille du Bcl-2 régulent l'apoptose au niveau mitochondrial (Martinou and Green 2001; Zamzami and Kroemer 2001). Les protéines de la famille Bcl-2 influencent la perméabilité de la membrane mitochondriale. Ainsi, en empêchant la libération du cytochrome *c* par la mitochondrie, Bcl-2 et Bcl-X_L par exemple, inhibent la formation du complexe Apaf-1/cytochrome *c*/caspase-9 qui est nécessaire à l'apoptose.

Cette famille peut être divisée en membres anti-apoptotiques, comme Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-$_W$, Mcl-1 et Boo, et en membres pro-apoptotiques, comme Bax, Bak, Bok, Bid, Bad et Bim (Huang and Strasser 2000).

Bien que l'impact des membres de la famille du Bcl-2 sur l'apoptose soit bien connu, le mécanisme biochimique de leur fonction n'est pas entièrement clair.

Selon un modèle, la perméabilisation de la membrane mitochondriale implique le PTPC (*permeability transition pore complex*), un complexe multiprotéique (Zamzami and Kroemer 2001). Les protéines Bcl-2 pourraient interagir avec le PTPC et réguler sa perméabilité.

Selon un autre modèle, certains membres de la famille Bcl-2 servent de "senseurs de mort" dans le cytosol ou le cytosquelette. Après un signal de mort, elles interagissent avec des membres de la sous-famille Bax. Après l'interaction, les protéines Bax subissent un changement conformationnel, s'insèrent dans la membrane mitochondriale, s'oligomérisent et forment des canaux perméables aux protéines. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 inhibent le changement conformationnel ou l'oligomérisation de Bax et Bak (Martinou and Green 2001).

19. Le ligand inducteur de mort TRAIL

TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) a été découvert par deux groupes indépendants, en se basant sur son homologie de séquence avec le TNF et Fas/CD95L (Wiley et al. 1995; Pitti et al. 1996). Il est exprimé sous forme d'une protéine membranaire de 281 acides aminés et environ 33-35 kDa. Il peut être clivé par des protéases à cystéine pour former un ligand extracellulaire. TRAIL soluble est présent à de relativement hauts niveaux dans le

surnageant de culture des cellules mononucléées du sang périphérique activées (Liabakk et al. 2002).

Une molécule TRAIL recombinante tronquée et active (acides aminés 114-281) a été obtenue et cristallisée (Cha et al. 1999) (voir figure 22). TRAIL présente une faible homologie de séquence avec les autres membres de la famille du TNF (38 acides aminés sur 168 sont conservés dans TRAIL et FasL qui partagent la plus haute homologie de séquence). Un monomère de TRAIL contient deux feuillets β anti-parallèles qui forment un sandwich β comme échafaudage central, et interagit avec les sous-unités adjacentes tête-bêche pour former un homotrimère en forme de cloche.

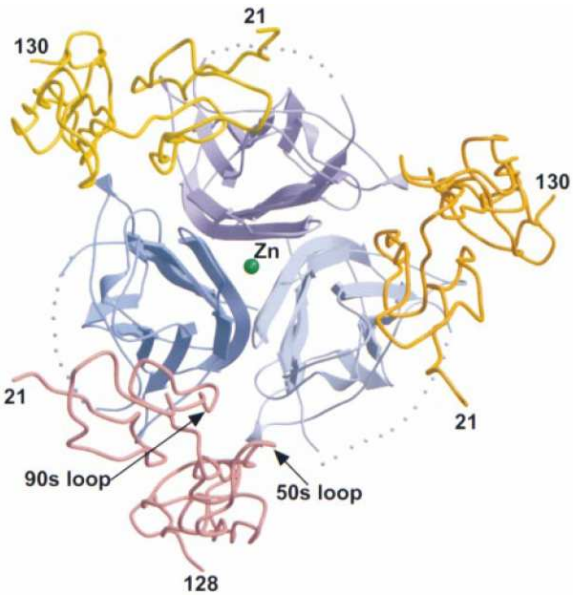


Figure 21. Vue de côté du complexe TRAIL-DR5. Le trimère TRAIL est représenté sous forme de rubans en dégradés de bleu. Les trois récepteurs sont représentés sous forme de tubes jaune-orange. D'après (Hymowitz et al. 1999).

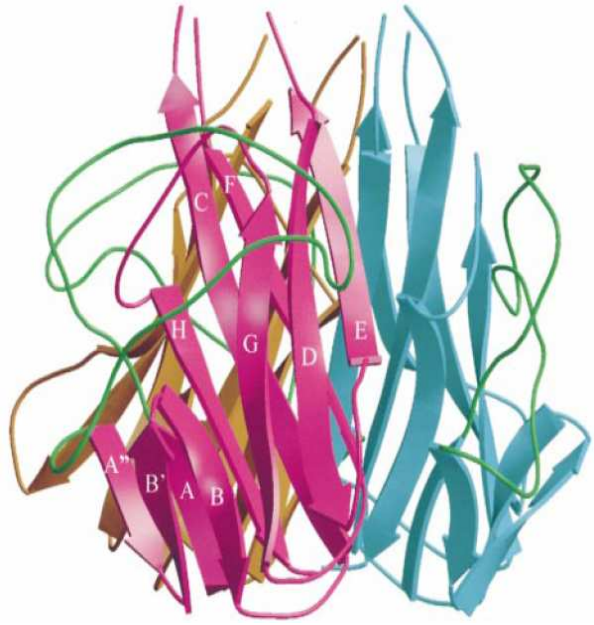


Figure 22. Diagramme en rubans du trimère TRAIL. Les trois monomères sont représentés en différentes couleurs. D'après (Cha et al. 1999).

La formation d'un homotrimère est partagée par la plupart des autres ligands de la famille du TNF (Baetu and Hiscott 2002). Cependant, TRAIL transporte un ion zinc à l'interface des trimères, liés par le résidu cystéine non-apparié (Cys230) de chaque monomère, à la différence des autres membres de la superfamille des ligands du TNF (Bodmer et al. 2000). L'ion zinc est essentiel pour l'intégrité structurale de TRAIL (Hymowitz et al. 1999), et la substitution du Cys 230 à l'alanine ou la sérine affecte fortement la capacité de TRAIL à induire l'apoptose.

Un trimère TRAIL se lie à trois récepteurs transmembranaires pour former un complexe hexamèrique (voir figure 21) (Mongkolsapaya et al. 1999). Les trois récepteurs se

lient le long des fissures aux interfaces entre les monomères de TRAIL (Hymowitz et al. 1999).

Des études sur Fas et TNFR1 ont défini un domaine d'oligomérisation dans la région extracellulaire du récepteur, appelé le PLAD (*pre-ligand assembly domain*) (Chan et al. 2000). Ce PLAD pourrait permettre la pré-association de trois molécules de récepteur, indépendamment du ligand, facilitant ainsi la fixation du ligand (Kimberley and Screaton 2004) (voir figure 23).

20. Les récepteurs de TRAIL

Cinq récepteurs à TRAIL ont été identifiés à ce jour chez l'homme: DR4, DR5, DcR1, DcR2 et l'osteoprotegerine (OPG) (voir figure 24).

Comme la plupart des récepteurs de la superfamille du TNF, DR4, DR5 et DcR2 sont des protéines transmembranaires de type I, tandis que DcR1 est une protéine transmembranaire de type III (à laquelle il manque un peptide signal) et que l'OPG est secrétée en tant que protéine soluble (Ashkenazi 2002).

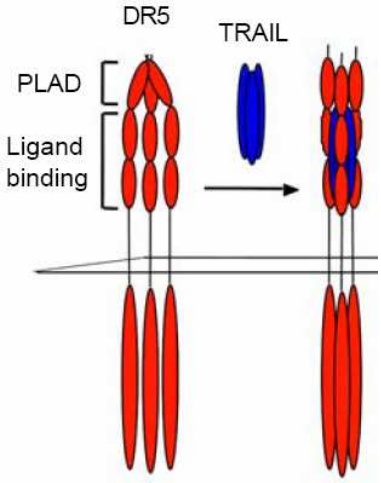


Figure 23. Modèle de liaison de TRAIL au DR5 grâce au PLAD. D'après (Kimberley and Screaton 2004).

DR4 a été le premier récepteur à TRAIL identifié (Pan et al. 1997). DR4 est une protéine de 468 acides aminés contenant dans son domaine cytoplasmique un domaine de mort, similaire à celui trouvé dans TNF-R1 et Fas. Immédiatement après la découverte de DR4, plusieurs groupes ont indépendamment identifié un second récepteur pour TRAIL, nommé DR5 (MacFarlane et al. 1997; Walczak et al. 1997). Comme DR4, DR5 contient un domaine de mort cytoplasmique. La fonction la mieux caractérisée des deux récepteurs contenant des domaines de mort, DR4 et DR5, est le fait de provoquer une réponse de mort apoptotique après liaison de TRAIL dans une variété de lignées cellulaires continues et de cellules tumorales primaires (Baetu and Hiscott 2002; Almasan and Ashkenazi 2003). En plus de leur activité bien caractérisée de transduction du signal apoptotique, DR4 et DR5, tout comme d'autres membres de la famille du récepteur du TNF présentant des domaines de mort intracytoplasmiques, pourraient également être impliqués dans des fonctions non apoptotiques (Park et al. 2005).

DcR1 a été le troisième récepteur à TRAIL identifié (MacFarlane et al. 1997). DcR1 est une protéine de 299 acides aminés, à laquelle il manque un segment cytoplasmique. DcR1 est ancré à la surface cellulaire par un glycosylphosphatidylinositol C-terminal (ancre GPI) lié de façon covalente. DcR2 a été le quatrième récepteur à TRAIL identifié (Degli-Esposti et al. 1997). Bien que DcR2 ait un domaine transmembranaire, il contient un domaine de mort tronqué, qui le rend incapable d'induire efficacement les signaux intracellulaires. Il a été originellement proposé que DcR1 et DcR2 agissent principalement comme récepteurs "leurre" (*decoy*) régulant négativement la cytotoxicité induite par TRAIL en entrant en compétition avec DR4 et DR5 pour la liaison du ligand.

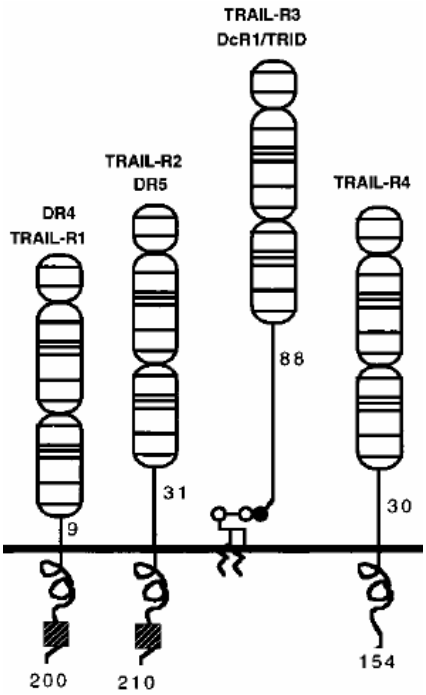


Figure 24. Les quatre récepteurs membranaires à TRAIL identifiés. Les bandes blanches représentent les domaines homologues, les lignes horizontales: résidus cystéine conservés, les carrés noirs: domaines de mort. L'ancre GPI maintenant DcR1 à la surface cellulaire est montrée. Les longueurs en acides aminés du lien extracellulaire et des régions cytoplasmiques sont indiquées également. D'après (Degli-Esposti et al. 1997).

Initialement, la sensibilité des cellules tumorales à TRAIL a été mise sur le compte de l'absence de DcR à leur surface. La surexpression de ces récepteurs protègerait les cellules normales de l'induction d'apoptose par TRAIL. Ils agiraient donc en séquestrant le ligand et en l'empêchant de se fixer aux récepteurs de mort capables de transmettre le signal apoptotique (Sheridan et al. 1997; Pan et al. 1998). Beaucoup de tissus normaux expriment au moins un des DcR (Marsters et al. 1997; Sheridan et al. 1997; Pan et al. 1998). Des études de lignées de cellules cancéreuses et de tumeurs primaires n'ont pourtant pas révélé de corrélation claire entre l'expression transmembranaire de récepteurs "de mort" et de récepteurs "leurres" et la résistance à TRAIL (Ashkenazi 2002; Almasan and Ashkenazi 2003). Cependant, presque toutes ces études reposent sur la détection de l'ARNm (Petak et al. 2000; Nimmanapalli et al. 2001) plutôt que sur l'analyse de l'expression membranaire de ces protéines (Lincz et al. 2001). Il est possible que même la détection des récepteurs par immunoblots (Wen et al. 2000) soit trompeuse au cas où les DcR seraient localisés dans la cellule plutôt qu'à sa surface (Zhang et al. 2000). L'étendue de l'expression de surface des récepteurs "leurres" sur les cellules tumorales ou normales n'est donc pas encore totalement claire, ni la façon dont ces récepteurs modulent la signalisation de TRAIL. Une progression

dans notre compréhension des mécanismes régulant les interactions entre TRAIL et ses récepteurs de surface vient d'une étude récente (Clancy et al. 2005). Les auteurs démontrent que l'inhibition par DcR2 de l'apoptose induite par TRAIL dépend de son association avec DR5 *via* l'assemblage des NH2-terminaux des pré-ligands des deux récepteurs. La liaison du ligand à DcR2 n'est pas nécessaire pour sa fonction inhibitrice d'apoptose, excluant donc la possibilité que DcR2 agisse comme un "leurre" pour inhiber l'apoptose en liant TRAIL. Alors que la plupart des récepteurs du TNF forment normalement seulement des complexes homotrimériques, l'assemblage des domaines du pré-ligand dans DR5 et DcR2 permet les formations de complexes mélangés comme un moyen de régulation de l'induction d'apoptose. Il a donc été proposé que le DcR2 agisse comme un récepteur "régulateur" plutôt que "leurre" qui inhibe la signalisation de l'apoptose par TRAIL à travers ce mécanisme indépendant du ligand (Clancy et al. 2005).

Le cinquième récepteur pour TRAIL est l'OPG, qui n'aurait pas de rôle dans l'apoptose (Emery et al. 1998). L'activité la mieux caractérisée pour l'OPG est l'inhibition de la formation d'ostéoclastes stimulée par RANKL (*receptor activator of NF-κB ligand*). L'OPG peut en effet lier RANKL et empêcher ainsi l'interaction avec son récepteur approprié, RANK (Boyle et al. 2003).

21. Cellules exprimant TRAIL et modes d'induction

21.1. Expression constitutive de TRAIL

A la différence des autres membres de la superfamille des ligands du TNF dont l'expression est étroitement régulée et qui sont seulement exprimés de façon transitoire sur les cellules activées, l'ARNm de TRAIL est détecté dans plusieurs tissus humains, dont le poumon, le foie et le rein fœtaux, et chez l'adulte, la rate, la prostate, le thymus, l'ovaire, le petit intestin, le côlon, les leucocytes du sang périphérique, le cœur, le placenta, le poumon, le muscle squelettique et le rein, mais pas dans le cerveau (Almasan and Ashkenazi 2003).

Les cellules T fraîchement isolées, tout comme les cellules NKT, B, les DC, les monocytes et les NK n'expriment pas de niveau détectable de TRAIL à leur surface (Fanger et al. 1999; Griffith et al. 1999; Kayagaki et al. 1999; Smyth et al. 2001; Takeda et al. 2001). Quelques exceptions, cependant, ont été trouvées. Une sous-population de cellules NK murines du foie semblent exprimer TRAIL constitutivement de manière dépendante de l'IFN de type II (Smyth et al. 2001; Takeda et al. 2001). L'ARNm de TRAIL est également exprimé dans des cellules NK humaines (Kashii et al. 1999) et des PDC humaines (Fanger et al. 1999)

et la protéine est retrouvée en marquage intracellulaire dans les NK. Des lymphocytes B murins expriment aussi TRAIL de façon constitutive (Mariani and Krammer 1998), ainsi que des clones de cellules T $CD4^+$ humaines, mais dans un milieu de culture supplémenté en IL-2, qui pourrait stimuler ces cellules en continu (Kayagaki et al. 1999). Quant aux neutrophiles humains, ils contiennent constitutivement l'ARNm codant pour TRAIL, expriment la molécule en surface et libèrent du TRAIL soluble dans le milieu (Koga et al. 2004; Cassatella 2006).

21.2. Induction d'expression de TRAIL

Les lymphocytes NK et $CD8^+$ au repos, n'expriment donc pas TRAIL membranaire mais l'expriment après activation (Mirandola et al. 2004). Certaines cytokines, virus, ou autres agents ont ainsi été utilisés avec succès pour induire l'expression de TRAIL sur plusieurs types de cellules hématopoïétiques.

Le gène de TRAIL compte environ 20 kb et contient cinq exons. La région promotrice de 1,2 kb en amont du codon d'initiation de traduction a été clonée et son site de départ de transcription a été défini. Une analyse de cette séquence promotrice pourrait révéler les facteurs de transcription permettant d'induire la production de TRAIL et les voies de signalisation empruntées en aval par les agents potentiellement capables d'agir sur l'expression de TRAIL (voir figure 25).

En effet, des séquences consensus pour plusieurs motifs de liaison de facteurs régulateurs de transcription ont été identifiés dans la région promotrice du gène TRAIL, dont le site ISRE (*IFN-stimulated responsive element*), sur lequel se fixent les facteurs de transcriptions des IFN de type I, mais également les sites GATA, C/EBP, SP-1, Oct-1, AP-1, AP-3, PEA3, GKLF, HNF3, CF-1, NFAT, GAS, NFκB (Gong and Almasan 2000; Wang et al. 2000; Modur et al. 2002; Kirshner et al. 2005; Rani and Ransohoff 2005) et FKHR (Modur et al. 2002). Plusieurs cytokines ou autres inducteurs pourraient donc agir sur les divers facteurs de transcription capables de se lier dans la région promotrice de *TRAIL* et seraient ainsi susceptibles d'induire l'expression de la molécule TRAIL à la surface des cellules. Les voies de signalisation impliquées se recoupent pour la plupart et semblent constituées en majorité de la voie PI3-K/Akt, des IKK, du NF-κB, des MAPK (p38), des STAT, des IRF et de la PKC, entre autres (Rani and Ransohoff 2005). Les agents les plus efficaces semblent être les IFN de type I et II, qui impliquent l'ISRE.

21.2.1. Induction de TRAIL par les IFN de type I et II:

Les IFN de type I et II peuvent agir en tant que cytokines induisant l'apoptose en activant l'expression de gènes codant pour des molécules pro-apoptotiques sur des lignées cancéreuses variées (Chawla-Sarkar et al. 2003), dont des myélomes multiples (Chen et al. 2001), des mélanomes (Chawla-Sarkar et al. 2003), des carcinomes ovariens (Morrison et al. 2002) et des cancers du sein (Ruiz-Ruiz and Lopez-Rivas 2002). Par ailleurs, le prétraitement à l'IFN-β sensibilise les cellules de mélanomes (Chawla-Sarkar et al. 2002; Leaman et al. 2002) et de lymphomes (Oehadian et al. 2005) humaines autrement résistantes à l'apoptose induite par TRAIL. Les IFN de type I et II possèdent ainsi des propriétés anti-tumorales et anti-virales bien connues, dans lesquelles TRAIL pourrait jouer un rôle. En effet, des constructions de rapporteurs luciférase, transfectées dans des cellules Jurkat, ont montré une régulation transcriptionnelle du gène de TRAIL par les IFN de type I. Une analyse de délétion a indiqué que la région promotrice de *TRAIL* contrôlait l'expression du gène après un traitement à l'IFN-β (Gong and Almasan 2000). Ainsi, après liaison de l'IFN de type I à son récepteur, les facteurs de transcription STAT1 et 2, couplés à l'IRF9 (formant ainsi le complexe ISGF3), se lieraient aux éléments de réponse ISRE dans le promoteur de TRAIL humain et stimuleraient son activité transcriptionnelle (voir figure 25). En ce qui concerne l'IFN de type II, après liaison à son récepteur, il s'agirait d'homodimères STAT1, cette fois-ci, qui se lieraient aux éléments de réponse GAS (*γ-interferon activated site*) dans le promoteur de TRAIL (voir figure 25).

Plusieurs types cellulaires semblent exprimer TRAIL en réponse aux IFN de type I et II. En effet, l'ARNm de TRAIL est induit par les IFN-α et -β dans des cellules Jurkat (Gong and Almasan 2000) ainsi que dans des cellules de mélanome (Chawla-Sarkar et al. 2001) et de sclérose en plaques (Wandinger et al. 2003). Par ailleurs, des radiations ionisantes et les IFN de type I induisent également l'ARNm et l'expression protéique de TRAIL dans des lymphomes, leucémies et myélomes multiples (Gong and Almasan 2000). L'ARNm de TRAIL peut être induit sur des monocytes humains après 1h de stimulation avec l'IFN-α ou l'IFN-γ, et l'expression de TRAIL à la surface de ces cellules est obtenue dès 2h de stimulation et conservée jusqu'à 12h. (Griffith et al. 1999). D'autre part, l'IFN-α2 induit l'expression de hauts niveaux de TRAIL membranaire sur des cellules T activées (Nguyen et al. 2000). L'ARNm et l'expression membranaire de TRAIL se retrouvent également dans des MDC humaines cultivées avec l'IFN-α ou l'IFN-γ (Fanger et al. 1999). L'IFN-β et l'IFN-α peuvent induire l'ARNm et la protéine TRAIL dans des lignées de myélomes multiples et des

plasmocytes fraîchement isolés de patients atteints de myélomes multiples (Chen et al. 2001). L'expression de l'ARNm de TRAIL est augmentée sur des neutrophiles et des PBMC après stimulation par IFN-α ou IFN-γ (Koga et al. 2004).

21.2.2. Induction de TRAIL par les TLR:

Mais ces IFN de type I et II eux-mêmes sont justement connus pour être induits par les infections virales. De nombreux virus seraient donc capables d'induire l'expression de TRAIL, *via* la production d'IFN de type I et II. Le virus de la rougeole, par exemple, induit l'expression d'ARNm et de protéine TRAIL sur des DC issues de monocytes (moDC). La protéine TRAIL est également exprimée en 24h après stimulation par ce virus sur des moDC, des monocytes et des lymphocytes T activés par le CD3 (Vidalain et al. 2000). Par ailleurs, des fibroblastes murins infectés *in vitro* par l'EMCV pendant 2h deviennent sensibles à l'apoptose induite par TRAIL (Sato et al. 2001). D'autre part, l'IFN-α intracellulaire produit par les PDC activées par le HIV-1 induirait une expression de TRAIL dans les amygdales de patients infectés, qui serait responsable de la déletion en cellules T $CD4^+$ (Herbeuval et al. 2006) (voir figure 25).

En plus des virus, l'acide polyinosinique: acide polycytidylique (poly (I :C) = ligand du TLR3, inducteur de l'IFN de type I, considéré comme agent mimant une infection virale et stimulateur des NK) induit TRAIL sur les cellules NK *via* l'activation de l'ISGF3. Ces inductions de TRAIL ne sont pas observées dans des souris mutantes déficientes pour IFNAR1 ou IRF-9 (Sato et al. 2001).

Comme cela a été montré pour le poly (I :C), qui induit de faibles quantités de TRAIL à la surface des lymphocytes T (Kayagaki et al. 1999), les ligands des TLR pourraient également être impliqués dans l'expression de TRAIL. Il est possible que l'effet de ces ligands passe par une activation de la signalisation des IFN de type I et II. En effet, de nombreux agonistes de TLR (LPS, CpG DNA, acide lipotéïchoïque) induisent la phosphorylation de STAT1 (S727), *via* l'activation des voies MAPK p38 (Takauji et al. 2002; Osawa et al. 2006) et augmentent donc l'effet de l'IFN-γ dont la signalisation implique également la phosphorylation de STAT1 mais n'implique pas l'activation des voies p38 MAPK. L'implication des ligands de TLR dans l'activation de cette voie de signalisation des IFN pourrait être vérifiée en inhibant les voies MAPK p38 (Schroder et al. 2006).

Lorsque des PBMC humains sont incubés 24h avec des CpG ODN (2006 ou 2041), l'expression de TRAIL est retrouvée sur les monocytes. Cette induction de TRAIL passerait par l'IFN-α sécrété par les PDC activées par les CpG ODN (Kemp et al. 2003).

Pour finir, le LPS induit aussi l'expression de TRAIL à la surface de monocytes et macrophages humains (Halaas et al. 2000).

21.2.3. Induction de TRAIL par les interleukines:

D'autres cytokines pourraient également jouer un rôle dans l'induction d'expression de TRAIL, comme les interleukines impliquées dans certaines voies de signalisation aboutissant sur les facteurs de transcription présents dans la région promotrice de *TRAIL*, dont l'IL-2, l'IL-15, l'IL-6 et l'IL-17. Les sites de Oct-1, ainsi que AP-1, C/EBP et NF-κB sont largement exprimés dans les promoteurs de gènes cibles de la cytokine inflammatoire IL-17. Les sites de C/EBP et NF-κB sont d'ailleurs indispensables à l'activation de ces gènes et leur régulation par l'IL-17 est essentielle dans le promoteur de l'IL-6 (Shen et al. 2006). De plus, AP-3 joue un rôle dans l'induction du gène de l'IL-2, en collaboration avec d'autres éléments de promoteur comme NF-κB, AP-1, Oct-1 et NF-AT.

L'IL-2 et l'IL-15 font partie de la même famille et partagent deux composants de récepteur, les chaînes IL-2Rβ/IL-15Rβ et IL-2Rγ/IL-15Rγ. La plupart de leurs activités biologiques se recoupent, dont l'augmentation de l'activité des cellules NK. Trois voies de signalisation sont connues pour être activées via la chaîne γc du récepteur à l'IL-2 : Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt et STAT5 (Smith 2006). TRAIL n'est pas retrouvé sur les cellules T, B ou NK murines ni à la surface de cellules T humaines fraîchement isolées. En revanche, il est retrouvé sur les cellules T humaines après activation par anti-CD3, surtout en présence d'IL-2 (Kayagaki et al. 1999), à la surface de cellules NK humaines activées par l'IL-2 (Johnsen et al. 1999) et sur les cellules NK $CD3^-NK1.1^+$ après stimulation en présence d'IL-2 ou d'IL-15. Par ailleurs, l'ARNm de TRAIL est détectable dans des cellules NK humaines phénotypiquement immatures $CD161^+/CD56^-$ (cultivées avec IL-15, IL-2 ou IL-12) (Zamai et al. 1998; Kashii et al. 1999).

21.2.4. Induction de TRAIL par activation des récepteurs T et B:

L'activation des récepteurs T et B semble également prendre une part dans l'induction d'expression de TRAIL dans ces cellules. Ainsi, une stimulation de 12h, 24h ou 48h avec anti-CD3 ou IFN-α seuls induit une faible quantité de TRAIL à la surface de lymphocytes T $CD4^+$

et $CD8^+$, alors que l'addition des deux augmente l'expression de TRAIL. L'expression de TRAIL induite par anti-CD3+IFN-α commence à 2h, atteint un pic à 6h et dure jusqu'à 48h.

Par ailleurs, le TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate*, de la même famille que la PMA = *phorbol 12-myristate 13-acetate*), un activateur spécifique de la Protéine Kinase C (PKC) et donc du NF-κB, induit aussi l'activité du promoteur de TRAIL dans plusieurs lignées cellulaires. Le site C/EBP, présent dans le promoteur de TRAIL, est impliqué dans la réponse du promoteur humain de l'involucrine stimulé par le TPA. De plus, le site SP1 est impliqué dans la réponse du promoteur de *FasL* humain stimulé par le TPA. C/EBP et SP1 pourraient donc aussi jouer un rôle dans l'activité du promoteur de TRAIL induite par TPA. (Agarwal et al. 1999; Chou et al. 2000; Gong and Almasan 2000).

D'autres cellules T humaines $CD4^+$ et $CD8^+$ activées par stimulation du TcR (OKT3 ou superantigène) ou PMA/ionomycine expriment l'ARNm de TRAIL (Jeremias et al. 1998). NF-κB et AP-3 peuvent être induits par un anticorps OKT3 anti-CD3 seul alors que NF-AT et AP-1 nécessitent l'addition de PMA. Ces facteurs de transcription nucléaires sont tous induits par un anticorps anti-CD28 + PMA (Granelli-Piperno and Nolan 1991).

La PHA (*phytohemagglutinin*) stimule également la libération de TRAIL par des Jurkat ou des PBMC humaines (Martinez-Lorenzo et al. 1998).

De nombreux inhibiteurs pharmacologiques peuvent bloquer l'induction de TRAIL par l'activation du récepteur de la cellule T, permettant d'identifier les protéines indispensables à la voie de signalisation menant à la transcription de *TRAIL* (Musgrave et al. 1999). Ainsi, parmi ces molécules, l'herbimycine A et la génistéine inhibent les protéines tyrosines kinases (PTK), la staurosporine et la calphostine C inhibent la PKC, tandis que la wortmannin et LY294002 inhibent la PI3K. La cyclosporine A inhibe la protéine phosphatase calcineurine, et la rapamycine inhibe la kinase p70 S6, impliquée dans la signalisation du CD28 et du récepteur de l'IL-2 (voir figure 25).

En ce qui concerne le récepteur de cellule B, son activation peut induire l'expression du TNFα, *via* la stimulation d'éléments de réponse NF-AT, Oct-1 ou NF-κB (Wang et al. 2001). Ces éléments de réponse étant également présents dans le promoteur de *TRAIL* et la protéine TRAIL pouvant être exprimée à la surface des lymphocytes B, le récepteur de cellule B pourrait peut-être jouer également un rôle dans l'induction d'expression de TRAIL.

21.2.5. Autres inducteurs de TRAIL:

D'autres molécules semblent capables d'induire l'expression de ce ligand de mort, telles que l'acide rétinoïque et les rétinoïdes se liant au récepteur à l'acide rétinoïque (RAR)α. Leur induction d'expression de TRAIL a été montrée sur des cellules leucémiques promyélocytaires (Altucci et al. 2001; Altucci and Gronemeyer 2004). L'acide rétinoïque pourrait même avoir un effet synergique avec l'IFN-γ pour induire l'activation du promoteur de TRAIL *via* l'IRF1 (Clarke et al. 2004). L'IRF2 serait également utilisé par l'acide rétinoïque pour induire TRAIL, et le récepteur RAR pourrait recruter CBP (*CREB-binding protein*), qui se lierait aux IRF, favorisant leur interaction (par formation éventuelle d'un *enhanceosome* similaire à celui retrouvé dans le promoteur de l'*IFNβ*) et la décompaction de la chromatine par acétylation des histones, permettant ainsi l'activation du gène *TRAIL* (voir figure 25). Des inhibiteurs d'histones déacétylases (HDAC) induisent également l'expression de TRAIL dans des leucémies myéloïdes en préservant l'acétylation des histones (Inoue et al. 2002; Clarke et al. 2004). Enfin, le récepteur de l'acide rétinoïque pourrait induire directement l'activation du facteur de transcription CF-1 (= USP = *ultraspiracle* = analogue chez la Drosophile de RXR, le récepteur de la Rétinoïde-X, chez l'Homme), qui est connu pour jouer, entre autres, un rôle dans la différenciation myéloïde et l'apoptose (Szanto et al. 2004).

D'autre part, des facteurs de croissance comme l'EGF ou l'IGF-1 pourraient également induire l'expression de TRAIL par activation de la PI3-K et de Akt ou bien des MAPK. En effet, le facteur de transcription AP1, présent dans le promoteur de *TRAIL*, constitué de c-Fos et c-Jun, est impliqué dans la régulation de l'apoptose et de la prolifération cellulaire. Il pourrait être stimulé par l'EGF, via les MAPK (Takeuchi et al. 2006). La voie Akt active ensuite le NF-κB et inhibe le FKHR (facteur de transcription *forkhead*). Des mutations PTEN inhibent l'activation de Akt (Wang et al. 2002), permettant la fixation du FKHR à son élément de réponse dans la région promotrice de *TRAIL* (Modur et al. 2002).

De plus, les cellules infectées par le HIV-1 produisent une oncoprotéine extracellulaire, Tat, responsable de l'augmentation d'expression de TRAIL dans les PBMC (Yang et al. 2003), dont les macrophages (Zhang et al. 2001; Miura et al. 2003). De la même manière, le virus HTLV (*human T-cell leukemia virus*) code pour une oncoprotéine, Tax, qui stimule l'expression d'ARNm de TRAIL dans des cellules T, de façon dépendante de IKKγ et NF-κB (Rivera-Walsh et al. 2001) (voir figure 25).

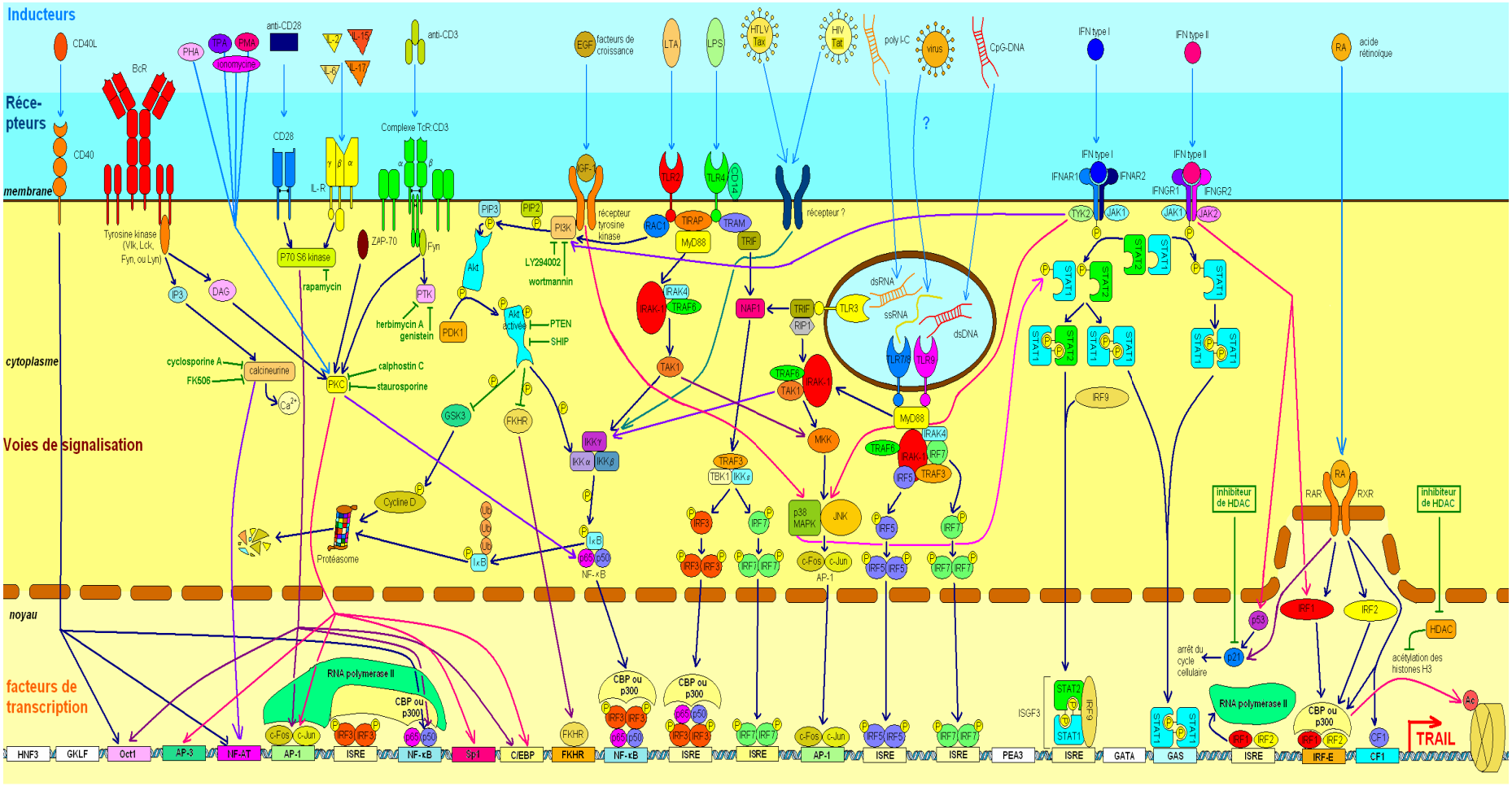


Figure 25. Différentes voies pouvant mener à la transcription du gène *TRAIL*, des inducteurs aux éléments de réponse présents dans la région promotrice du gène *TRAIL*, en passant par les voies de signalisation et les facteurs de transcription. Le schéma reprend les voies d'induction décrites pour plusieurs types cellulaires distincts.

22. Rôles physiologiques de TRAIL

22.1. Immunité anti-tumorale

Parmi ses activités physiologiques potentielles *in vivo*, TRAIL peut intervenir dans la surveillance immune contre les tumeurs (Cretney et al. 2002; Takeda et al. 2002), et en particulier contre les hémopathies malignes (Rubio-Moscardo et al. 2005; Zerafa et al. 2005).

De nombreuses études récentes utilisant des anticorps neutralisants contre TRAIL ou des souris TRAIL$^{-/-}$ ont montré que TRAIL pouvait limiter le développement de tumeurs expérimentales (Takeda et al. 2001; Takeda et al. 2002). Dans ces modèles murins de tumeurs, TRAIL était essentiellement exprimé par les cellules NK du foie, qui étaient responsables de la protection contre l'initiation de la tumeur et les métastases (Takeda et al. 2001; Cretney et al. 2002; Takeda et al. 2002; Seki et al. 2003; Smyth et al. 2003). D'autre part, les effets anti-métastatiques *in vivo* de l'IL-12 ou de l'α-galactosylcéramide (α-GalCer) pourraient être dus, au moins en partie, aux augmentations d'expression d'IFN-γ et TRAIL dans ces souris après thérapie (Smyth et al. 2001).

TRAIL pourrait également jouer un rôle dans l'immunosurveillance de l'hôte contre le développement de tumeurs primaires (Cretney et al. 2002; Takeda et al. 2002).

22.2. Immunité anti-virale

Les IFN de type I et II sont connus pour avoir des effets anti-viraux puissants, et TRAIL apparaît comme un effecteur important de ces activités.

Plusieurs virus induisent l'expression de TRAIL et de ses récepteurs dans les cellules infectées (Benedict et al. 2003), ce qui pourrait servir à éliminer ces cellules par apoptose autocrine. Cette induction d'expression de TRAIL et de ses récepteurs sur les cellules infectées passe très souvent par les IFN de type I et II.

Par exemple, des fibroblastes infectés par le CMV humain et traités avec de l'IFN-γ augmentent l'expression de TRAIL et de ses récepteurs de mort. L'IFN-γ potentialise la réponse apoptotique dans les cellules infectées en augmentant l'expression de TRAIL sur les cellules voisines non-infectées et en diminuant simultanément l'expression des récepteurs de mort, sensibilisant ainsi les cellules infectées par le CMV à l'apoptose (Sedger et al. 1999). L'IFN-α/β, activé typiquement par une infection virale, peut également induire l'expression de TRAIL dans des cellules variées (Fanger et al. 1999; Kayagaki et al. 1999; Sedger et al. 1999).

22.3. Homéostasie du système immunitaire

TRAIL n'est pas seulement un médiateur de la réponse anti-tumorale du système immunitaire, mais participe aussi à l'homéostasie du compartiment lymphoïde en suscitant l'apoptose dans les cellules immunitaires qui ont rempli leur fonction (Janssen et al. 2005). TRAIL régule également la survie des mastocytes *in vivo* (Berent-Maoz et al. 2006).

Dans la continuité d'un rôle régulateur dans l'homéostasie du système immunitaire, plusieurs études ont montré que TRAIL inhibait l'inflammation auto-immune dans les arthrites rhumatoïdes induites expérimentalement (Song et al. 2000), les encéphalomyélites autoimmunes expérimentales (Hilliard et al. 2001; Cretney et al. 2005), les diabètes de type I (Mi et al. 2003) et les thyroïdites autoimmunes expérimentales (Wang et al. 2005).

23. Thérapeutique

23.1. Pourquoi TRAIL est un bon candidat ?

Alors que des tissus normaux expriment Fas, comme les cellules épithéliales du côlon, par exemple (Strater and Moller 2000), et peuvent être détruits par l'apoptose induite par FasL, la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL semble restreinte aux cellules tumorales. Une évaluation approfondie de l'expression de DR4 et DR5 par plusieurs tissus tumoraux et normaux a montré une augmentation d'intensité de marquage dans plusieurs tumeurs en comparaison avec le tissu normal environnant (Halpern 2004). Par ailleurs, l'examen d'un panel de tumeurs a récemment montré que les mélanomes et les cancers du poumon, de l'intestin et du sein exprimaient DR4 et DR5 (Daniels et al. 2005). Une grande diversité de tumeurs pourrait donc être sensible à la thérapie *via* TRAIL.

En effet, la molécule TRAIL recombinante soluble induit l'apoptose dans un large spectre de lignées cancéreuses humaines, dont les carcinomes du côlon, du poumon, du sein, de la prostate, du pancréas, du rein, du système nerveux central et de la thyroïde, aussi bien que dans les myélomes multiples, les mélanomes, les neuroblastomes, les leucémies, les lymphomes et les ostéosarcomes (Baetu and Hiscott 2002; Wajant et al. 2002; LeBlanc and Ashkenazi 2003). De façon similaire, l'administration de TRAIL recombinant soluble à des souris SCID, qui portent des xénogreffes de tumeurs humaines dérivées de carcinomes du côlon et du sein, de myélomes multiples ou de gliomes malins, exerce une activité anti-tumorale marquée sans toxicité systémique (Almasan and Ashkenazi 2003). L'absence de toxicité a également été vérifiée sur des souris et des primates non humains (Ashkenazi et al.

1999). Le ligand recombinant TRAIL humain utilisé était capable d'induire l'apoptose dans certaines lignées cellulaires murines et exerçait une cytotoxicité contre des cellules de primates, indiquant qu'il peut croiser avec une variété d'espèces relativement large. De plus, des anticorps monoclonaux activant les récepteurs de TRAIL DR4 et DR5 ont également démontré leur activité antitumorale potentielle contre les lignées de cellules tumorales et les modèles de cancer précliniques (Wajant et al. 2002; LeBlanc and Ashkenazi 2003).

Les cellules tumorales présentent donc une grande sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL, tandis que les cellules normales y sont résistantes, faisant de ce ligand de mort un candidat intéressant pour l'établissement d'une thérapie anti-tumorale ciblée. Pourtant, certaines cellules tumorales restent également résistantes à cette apoptose. Les mécanismes de résistance des cellules normales et de certaines cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL ne sont pas encore tout à fait clairs mais il pourraient passer par l'expression des récepteurs "leurres" DcR1 et DcR2 (voir le chapitre "Les récepteurs de TRAIL"), et/ou par un ou plusieurs des inhibiteurs présents aux différents stades de la voie de signalisation apoptotique, tels que c-FLIP (Griffith et al. 1998), les membres anti-apoptotiques de la famille du Bcl-2 ou les IAP (Zhang et al. 2001).

Les ligands des récepteurs de mort sont potentiellement utiles pour la thérapie anti-cancéreuse car, à la différence de beaucoup d'agents thérapeutiques anti-cancéreux conventionnels, ils peuvent déclencher l'apoptose des cellules tumorales indépendamment du gène suppresseur de tumeur p53, qui est inactivé dans plus de la moitié des cancers humains. Les ligands des récepteurs de mort pourraient donc être efficaces contre les tumeurs qui ont acquis une résistance à la chimiothérapie ou la radiothérapie. De plus, ils pourraient être utiles en combinaison avec les thérapies conventionnelles contre les tumeurs qui conservent au moins une sensibilité partielle à la chimiothérapie ou l'irradiation.

Le potentiel que possède TRAIL dans cette perspective est particulièrement convaincant. Il a été utilisé en combinaison avec les thérapies communément utilisées comme la chimiothérapie ou l'irradiation. Les radiations ionisantes peuvent sensibiliser des cellules de cancer du sein, des leucémies, des carcinomes du côlon et des gliomes à l'apoptose induite par TRAIL *in vitro* chez l'homme et *in vivo* chez la souris (Chinnaiyan et al. 2000; Gong and Almasan 2000). Cet effet synergique semble impliquer une augmentation d'expression de DR5 induite par l'irradiation.

La combinaison de TRAIL avec des chimiothérapeutiques comme la doxorubicine, l'etoposide ou le cisplatine, entre autres, augmente également l'apoptose induite par TRAIL

de façon significative dans une variété de lignées cellulaires tumorales humaines (Kelley et al. 2001; Naka et al. 2002).

Les mécanismes sous-tendant cette sensibilisation à TRAIL varient selon l'agent mais pourraient impliquer tous les stades de la voie de signalisation menant à l'apoptose, de l'augmentation d'expression de DR4 et DR5 (Wang and El-Deiry 2003) ou l'augmentation d'expression des molécules pro-apoptotiques, dont Bak, les caspases ou FADD (Debatin and Krammer 2004), à la diminution des molécules anti-apoptotiques telles que FLIP (Kim et al. 2002; Sayers et al. 2003).

23.2. Les essais cliniques en cours

La capacité de TRAIL à induire une apoptose rapide dans une large variété de lignées cellulaires tumorales sans cytotoxicité envers la plupart des cellules normales donne l'espoir d'une application en tant que nouvel agent biologique anti-cancéreux (Almasan and Ashkenazi 2003).

Nombre d'études ont pourtant posé la question de la résistance des cellules normales à l'apoptose induite par TRAIL, à cause de la toxicité remarquée dans les hépatocytes humains (Jo et al. 2000). Une version recombinante du TRAIL humain a ainsi été préférée pour une application clinique. En effet, bien que de nombreuses cellules tumorales soient sensibles à cette version de TRAIL optimisée, les hépatocytes normaux y sont résistants. Des études initiales sur des primates non hominidés montrent que cette molécule est bien tolérée même à de hautes doses (Kelley et al. 2001). Des essais cliniques de phase 1 de cette préparation de TRAIL produit par Genentech et Amgen ont récemment commencé (voir tableau 05).

Pourtant, bien que TRAIL puisse induire l'apoptose dans une variété de cellules cancéreuses humaines, certaines tumeurs pourraient être protégées par l'expression de hauts niveaux de DcR. De plus, une étude récente a démontré que des anticorps anti-DR4 plutôt que le TRAIL recombinant devraient être utilisés pour une approche thérapeutique rationnelle dans le traitement des leucémies lymphocytiques B chroniques (MacFarlane et al. 2005), afin d'éviter toute toxicité inutile de cellules normales exprimant DR5.

Plusieurs groupes ont donc généré des anticorps monoclonaux agonistes contre DR4 et DR5 (Griffith et al. 1999; Chuntharapai et al. 2001; Ichikawa et al. 2001) et ont vérifié qu'ils ne croisaient pas avec les récepteurs murins. Ces anticorps ont déclenché avec succès l'apoptose de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* en utilisant des tumeurs humaines xénogéniques dans des souris immunodéficientes. L'efficacité thérapeutique de l'anticorps

monoclonal agoniste anti-DR5 humain (TRA-8) a également été examinée dans un modèle de xénogreffe murin d'arthrite induite par les cellules synoviales humaines d'arthrite rhumatoïde (Ichikawa et al. 2003). Dans ce modèle, l'induction d'apoptose par l'anticorps monoclonal anti-DR5 humain supprime la prolifération des cellules synoviales de l'arthrite rhumatoïde, la destruction du cartilage et l'érosion des os.

Plus récemment, des anticorps agonistes totalement humanisés contre DR4 et DR5 ont montré une induction d'apoptose dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines et des isolats primaires *in vitro*, tout comme dans une variété de tumeurs humaines injectées dans des souris immunodéficientes (Motoki et al. 2005; Pukac et al. 2005). Ces anticorps pourraient offrir un avantage clinique significatif par rapport au ligand car ils sont spécifiques des DR, ne se lient pas aux DcR et ont une demi-vie augmentée de façon significative *in vivo*. Comme c'est le cas pour TRAIL recombinant (rTRAIL), des doutes persistent sur leur toxicité potentielle.

Target	Company	Agent	Clinical stage
TRAIL receptors	Human Genome Sciences (Rockville, Maryland)	Agonist monoclonal antibodies for TRAIL receptors	Phase 1 and 2
	Sankyo (Tokyo)	Agonist monoclonal antibody for TRAIL receptor	Preclinical
	Novartis (Basel)	Agonist monoclonal antibody for TRAIL receptor	Undisclosed
	Genentech (S. San Francisco, California) and Amgen (Thousand Oaks, California)	Recombinant TRAIL ligand	Phase 1

Tableau 05. Sélection de compagnies ciblant les récepteurs de TRAIL dans le cancer. D'après (Garber 2005).

Malgré tout, Human Genome Sciences (voir tableau 05), en association avec Cambridge Antibody Technologies, a entamé des essais cliniques de phase 2 avec un anticorps anti-DR4 (HGS-ETR1) et des essais cliniques de phase 1 avec un anticorps monoclonal anti-DR5 (HGS-ETR2). Un deuxième anticorps anti-DR5 (HGS-TR2J) développé par Human Genome Sciences en collaboration avec la division pharmaceutique de la Kirin Brewery Company, est également en essai clinique de phase 1. Jusqu'à aujourd'hui, aucune toxicité importante n'a été observée, au moins en réponse aux doses données durant ces essais cliniques initiaux (Garber 2005).

Objectifs du travail

Les PDC ne représentent que 0,5% des cellules circulantes dans le sang humain. A cause de cette faible fréquence, de la difficulté à générer ce type de cellules à partir de cellules $CD34^+$, du temps et du coût qu'il faut compter pour les isoler, l'établissement d'une lignée facilite grandement l'étude de ces cellules. Au laboratoire, nous avons généré une lignée de PDC, établie à partir des LPDC. Cette lignée représentait la seule lignée de LPDC humaines au monde à l'époque où elle a été brevetée (Chaperot and Plumas 2002). Dans la mesure où les cellules malignes partagent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles (Chaperot et al. 2004) avec leur homologue normal, ces LPDC et la lignée cellulaire GEN2.2 (voir la présentation de la lignée et l'article 2) représentent une source alternative de PDC.

D'une part, les cellules de la lignée GEN2.2 sont leucémiques, et nous avons cherché à savoir si elles pouvaient constituer un modèle pour les leucémies à PDC, par analyse comparative avec les prélèvements (sang ou moelle osseuse envahis) de patients. Nous avons ainsi utilisé la lignée pour vérifier la sensibilité des LPDC à l'apoptose induite par TRAIL et avons analysé les molécules impliquées. Cette étude pourrait ouvrir la perspective de nouvelles thérapies pour les leucémies à PDC avec l'utilisation d'une molécule TRAIL soluble (Article 1).

D'autre part, les cellules de la lignée GEN2.2 possèdent des caractéristiques de PDC normales. Nous avons donc utilisé la lignée pour étudier les réponses des PDC aux ligands des TLR7 et 9, dont leur expression de TRAIL en surface et leur potentielle activité cytotoxique envers des cellules tumorales ou infectées, sensibles à TRAIL (Article 2).

Enfin, nous avons cherché à identifier les voies empruntées par les différents ligands de TLR7 et 9 utilisés pour induire l'expression de TRAIL à la surface des PDC. (Résultats 3).

Résultats

Présentation de la lignée GEN2.2 :

Les PDC leucémiques de notre lignée (Chaperot and Plumas 2002) sont cultivées en milieu RPMI complémenté de L-glutamine, acides aminés, pyruvate de sodium et gentamycine, sur une sous-couche de cellules stromales murines (MS-5) adhérentes qui les nourrissent. Les avantages de cette lignée cellulaire humaine résident dans le fait qu'elle fournit un nombre illimité de PDC fonctionnelles standardisées, que sa production coûte mille fois moins cher que des PDC normales, en se basant sur le prix du matériel à utiliser pour générer ou isoler ces dernières, qu'elle exprime l'allèle HLA-A0201, le plus répandu dans la population caucasienne.

Dans la mesure où les cellules malignes partagent des caractéristiques phénotypiques (voir article 2) et fonctionnelles (Chaperot et al. 2004) avec leur homologue normal, ces LPDC et la lignée cellulaire GEN2.2 que nous avons décrite ici présentent un intérêt particulier pour l'étude des fonctions des PDC.

Article 1 : Les LPDC expriment DR5 et sont sensibles à la lyse par TRAIL.

Introduction et objectifs : Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans la régulation des réponses immunes innée et adaptative. Les PDC représentent un nouveau type de DC identifié avec des fonctions spécialisées dans la lutte contre les infections virales. Récemment, nous avons montré que des hémopathies malignes $CD4^+CD56^+$ étaient des leucémies issues de PDC, avec une progression clinique particulièrement agressive. Nous nous sommes donc demandés si ces PDC malignes pouvaient être tuées par TRAIL, un ligand inducteur de mort qui appartient à une nouvelle classe de drogues anticancéreuses actuellement en développement.

Méthodes : Dans cette étude, nous avons utilisé comme modèle la lignée de PDC (GEN2.2) que nous avons récemment développée à partir de PDC leucémiques, ainsi que les cellules de huit patients atteints de leucémie à PDC.

Résultats : Nous montrons que, contrairement aux PDC GEN2.2, les PDC normales n'expriment ni DR4 ni DR5. Les PDC GEN2.2 sont sensibles à l'apoptose induite par TRAIL et peuvent être tuées *in vitro* par des cellules NK exprimant TRAIL. Nos résultats suggèrent que TRAIL se lie au récepteur DR5 exprimé par les GEN2.2 et induit l'apoptose principalement par les caspases 10, 8 et 3. De façon intéressante, durant l'infection avec l'*influenza*, DR5 diminue à la surface des cellules GEN2.2, qui deviennent ainsi résistantes à l'apoptose induite par TRAIL. De plus, nous avons confirmé l'expression de DR5 ou DR4 sur la moitié des LPDC testées, suggérant la possibilité de tuer ces cellules par TRAIL.

Conclusion : Ces résultats suggèrent que les agonistes de TRAIL représentent une alternative thérapeutique pour le traitement des LPDC.

ELSEVIER

EXPERIMENTAL HEMATOLOGY

Experimental Hematology 34 (2006) 1655–1662

Mechanisms of TRAIL-induced apoptosis in leukemic plasmacytoid dendritic cells

Ariane Blum[a], Laurence Chaperot[a], Jean-Paul Molens[a], Vincent Foissaud[b], Dominique Plantaz[c], and Joël Plumas[a]

[a]*Department of Research and Development, EFS Rhône-Alpes Grenoble, La Tronche, France;* [b]*Department of Medical Biology, Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Clamart, France;* [c]*Department of Paediatrics, CHU Michallon, La Tronche, France*

(Received 14 March 2006; revised 8 July 2006; accepted 7 August 2006)

Objective. **Dendritic cells play a central role in regulating the innate and adaptive immune responses. Plasmacytoid dendritic cells (PDC) represent a newly identified kind of DC with specialized functions aimed at fighting against viral infections. Recently, we have shown that $CD4^+CD56^+$ malignancies were leukemia arising from PDC, with a particularly aggressive clinical course. Hence, we asked whether these malignant PDC could be killed via TRAIL, a death-inducing ligand that belongs to a new class of anticancer drugs currently under development.**

Materials and Methods. **In this study we used a PDC line (GEN2.2) we recently developed from leukemic PDC as a model.**

Results. **We show that GEN2.2 PDC are sensitive to TRAIL-induced apoptosis and can be killed in vitro by TRAIL-expressing NK cells. Our results suggest that TRAIL binds to Death Receptor 5 (DR5) expressed by GEN2.2 and induces apoptosis mainly via caspases 10, 8, and 3. Interestingly, during infection with influenza, DR5 decreases on GEN2.2 cell surface, which consequently become resistant to TRAIL-induced apoptosis. Moreover, we confirmed the expression of DR5 or DR4 on half of LPDC tested, suggesting the possibility to kill these cells via TRAIL. Hopefully, normal PDC expressed neither DR4 nor DR5.**

Conclusion. **These results suggest that TRAIL agonists represent a therapeutic alternative for the treatment of LPDC.** © **2006 International Society for Experimental Hematology. Published by Elsevier Inc.**

Dendritic cells (DC) are key players in regulation of immune responses. These sentinel cells can capture antigens in periphery, then migrate to secondary lymphoid organs and differentiate into mature DC that possess the ability to stimulate naive T cells [1]. DC exist as distinct subsets that differ in their ontogeny, surface molecule expression, and biological function. Two kinds of DC have been described, both of them originating from $CD34^+$ hematopoietic stem cells. The functions of myeloid dendritic cells (MDC) have been extensively described, whereas uncertainty remains regarding the functions of the more recently identified plasmacytoid dendritic cells (PDC) [2]. PDC are characterized by their plasma cell–like morphology, and by their phenotype. Like MDC, PDC are negative for lineage markers (CD3, CD14, CD19, CD20, CD56), and positive for CD4, and HLA-DR, but contrary to MDC, they highly express CD123 (IL-3Rα), CD45RA, blood DC antigen-2 (BDCA-2), and BDCA-4 [3].

We have recently described a new leukemic entity derived from PDC [4] that share phenotypic and functional features with their normal counterparts [5,6]. Leukemic PDC (LPDC) are characterized by their phenotype: $CD4^+$, $CD56^+$, $CD123^+$, $CD3^-$, $CD13^-$, and $CD19^-$. Moreover, LPDC overexpress mRNA encoding the lymphoid B cell characteristic J chain and immunoglobulin λ and κ light chains [7]; they express blood DC antigen-2 (BDCA-2) and BDCA-4, and polarize naive T cells toward Th1 or Th2 pathways [5]. The clinical course of this rare pathology is always aggressive, leading to death within 3 years despite initial response to chemotherapy [8]. In a series of 23 patients reported in 2002, only 2 allo-transplanted

Offprint requests to: Joël Plumas, Ph.D., Department of Research and Development, EFS Rhône-Alpes Grenoble, BP35, 38701 La Tronche, France; E-mail: joel.plumas@efs.sante.fr

0301-472X/06 $–see front matter. Copyright © 2006 International Society for Experimental Hematology. Published by Elsevier Inc.
doi: 10.1016/j.exphem.2006.08.002

patients were long survivors [9]. Given this poor outcome, the need for therapeutic alternative in the treatment of PDC leukemias has become clear.

Competing companies are currently designing drugs targeting death receptors for treatment of cancer. Interestingly, these agonists or activating monoclonal antibodies are able to specifically trigger tumor cell apoptosis [10]. Several ligand/receptor pairs have been described, whose interaction can induce apoptosis including TRAIL (CD253), Fas-L (CD95L), and their receptors. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and FasL are transmembrane proteins expressed on activated effector cells like NK cells [11] or cytotoxic T lymphocytes (CTL) [12,13]. Whereas some normal tissues express Fas and can be destroyed by FasL-mediated apoptosis, the sensitivity to TRAIL-mediated apoptosis seems restricted to tumor cells. Five TRAIL receptors have been identified, including four transmembrane proteins. Two of them (TRAIL-R1 [DR4/CD261] and TRAIL-R2 [DR5/CD262]) contain a death domain, capable of inducing apoptosis. The other two (TRAIL-R3 [DcR1/CD263] and TRAIL-R4 [DcR2/CD264]) lack this death domain or contain a truncated nonfunctional death domain and are considered as "decoy" receptors. TRAIL has been demonstrated to kill a wide variety of tumor cells expressing Death Receptor (DR)4 and/or DR5 with minimal effects on normal cells that express mainly DcR1 and/or DcR2 [14,15]. This remarkable specificity for tumor cells of TRAIL-induced apoptosis makes it interesting for the development of new apoptosis drugs. Preclinical studies performed with HS-ETR1, a fully human monoclonal antibody agonistic to DR4, demonstrated antitumor activity in a variety of human tumor cells, in vitro and in xenograft models [16,17]. Based on these data, these and other apoptosis-inducing molecules targeting TRAIL receptors are now in clinical trials in various kinds of cancers [10]. These new drugs could turn out to be important for the treatment of leukemic PDC, provided these cells are susceptible to TRAIL-mediated apoptosis.

Here we show that whereas normal PDC purified from blood do not express DR5, four out of eight different leukemic PDC express it. Focusing then on the GEN2.2 plasmacytoid dendritic cell line we recently described [18], we find that cells are sensitive to TRAIL-induced apoptosis and can be killed in vitro by TRAIL-expressing NK cells. TRAIL binds to DR5 and induces apoptosis mainly via caspases 8, 10, and 3. These findings could be important on a clinical point of view, for the treatment of leukemic PDC with the on-going development of new drugs targeting TRAIL receptors.

Materials and methods

Cells

LPDC were obtained from invaded peripheral blood or bone marrow of eight patients with their informed consent [4,5]. Mononuclear cells were cryopreserved. Percentage of tumor cells was determined by flow cytometry; mononuclear cells from patients #6, #7, #8, #10, #15, #17, #20, and #21 contained 95%, 95%, 90%, 90%, 95%, 85%, 80%, and 95% tumor cells respectively.

Normal PDC were analyzed in the peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers, isolated by density-gradient centrifugation using Lymphocytes separation medium (Eurobio, Les Ulis, France). NK cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells using RosetteSep purification method (StemCell Technologies Inc, Vancouver, BC, Canada) and activated by a 2-day culture with IL-15 (10 ng/mL, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) and IFN-α (5000 U/mL, PeproTech, London, UK).

GEN2.2 PDC line [18] was developed from LPDC#7 and cultured on a monolayer of irradiated (60 Gy) MS-5 feeder cells. Cells were grown in RPMI 1640 Glutamax (Gibco, Glascow, UK) supplemented with sodium pyruvate, gentamycin, nonessential amino acids (referred to as complete medium), and 10% fetal calf serum (FCS, Gibco). Before experiments, cells were harvested and cultured at 10^6 cells/mL in complete 10% FCS medium, without MS-5 cells in the presence or absence of influenza virus (137 ng/mL hemagglutinating formaldehyde-inactivated influenza virus strain A/New Caledonia/20/99 IVR116 (Aventis Pasteur, Val de Reuil, France)). After 24 hours, phenotypic and functional analyses were performed.

Antibodies

Surface expression was determined by flow cytometry on a FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA), using specific antibodies, by direct or indirect labeling. The following mAbs were from Immunotech (Beckman Coulter, Marseille, France): PE-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) and irrelevant mouse monoclonal Ig. Anti-BDCA2 (AC144) was purchased from Miltenyi Biotec (Paris, France) and CD123 (9F5) from Pharmingen (San Diego, CA, USA). Unconjugated anti-DR4 (HS101), DR5 (HS201), DcR1 (HS301), and DcR2 (HS402) were from Alexis (Lausen, Switzerland).

Normal PDC phenotype was analyzed in peripheral blood mononuclear cells using a double labeling with an indirect immunofluorescence procedure (as described in [19]). Anti-DR5 mAb was revealed by PE-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L), further saturated with irrelevant mouse monoclonal Ig; hence, PDC were identified with FITC-conjugated BDCA-2 labeling.

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of activated NK cells was tested against fresh GEN2.2 cells. Cytotoxicity was evaluated by a standard 4-hour (^{51}Cr) chromium-release assay, as previously described [20]. The percentage of specific cell lysis was calculated according to the following formula: % lysis = 100 × (ER-SR)/(MR-SR) where ER, SR, and MR represent experimental, spontaneous, and maximum ^{51}Cr release respectively. For inhibition experiments, azide-free anti-TRAIL (2E5, Alexis, 5 μg/mL) [18,21] or isotypic control IgG1 (679.1Mc7, Immunotech, 5 μg/mL) were added to effector cells 1 hour before addition of target cells. As control, TRAIL-induced lysis was measured in the same assay by addition of recombinant human soluble (rhs)*Killer* TRAIL (1 to 100 ng/mL, rhsAPO-2L, Alexis).

Apoptosis measurement

GEN2.2 cell (10^6/mL) lysis was induced by addition of rhs*Killer*-TRAIL (100 ng/mL) for 4 hours, unless specified. The percentage

of specific apoptosis was calculated according to the following formula: ((control viability − assay viability) / (control viability)) × 100. This calculation allows the elimination of the spontaneous apoptosis of cells in medium and takes into account early apoptosis ($AnnV^+/PI^-$ cells) as well as late apoptosis ($AnnV^+/PI^+$ cells).

The viability of cells in medium alone (control) was always higher than 80%.

For the inhibition experiments, GEN2.2 cells were incubated at 37°C with blocking antibodies anti-DR4 (HS101) and DR5 (HS201) (5 μg/mL, Alexis) or caspase inhibitors Z-FA-FMK (negative control), Z-VAD-FMK (caspase family inhibitor), Z-DEVD-FMK (caspase-3 inhibitor), Z-IETD-FMK (caspase-8 and granzyme B inhibitor), Z-LEHD-FMK (caspase-9 inhibitor), and Z-AEVD-FMK (caspase-10 inhibitor) (10 μM, Alexis) 30 minutes prior to induction of apoptosis.

Four techniques were used for measuring apoptosis. 1) Cells were stained with May-Grünwald Giemsa (Kit Ral 555, Ral, Bordeaux, France) after cytocentrifugation and their morphology was analyzed by microscopic examination. 2) Apoptosis was quantified by double-staining with FITC-conjugated annexin V (Ann-V) and propidium iodide (PI) (Apoptest, Immunotech) as indicated by the supplier. Dead cells appear as PI and/or Ann-V positives. 3) Apoptosis was determined by 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide (DioC6(3)) labeling and analyzed by flow cytometry; only live cells retained DioC6(3). 4) Staining of nuclease-degraded DNA was performed with TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL) kit solutions (Mebstain Apoptosis Kit Direct Part, Immunotech) according to the manufacturer's instructions and cells were analyzed by flow cytometry. Controls were the following: fresh cells and apoptosis-induced cells treated without terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme (negative controls), and fresh cells treated with DNAse I followed by TdT treatment (positive control).

Western blot analysis

GEN2.2 cells (10^6/mL) were incubated for different periods of time with or without rhs*Killer*TRAIL; cells were then washed in phosphate-buffered saline (PBS), lysed in 100 μL of sample buffer, and heated at 100°C for 5 minutes. Twenty microliters of the whole-cell extract was loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane (BIORAD, Marne la Coquette, France). Nonspecific binding sites were blocked with 5% nonfat milk in PBS-Tween 20 0.1%. Membranes were then incubated with primary antibodies: anti-caspase 9, anti-caspase 8 (Immunotech), anti-caspase 10, anti-actin (Sigma), or anti-caspase 3 (Pharmingen). Antibody labeling was revealed using goat anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Dako, Glostrup, Denmark) and was visualized using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Life Science, Les Ulis, France).

Results

DR5 is expressed on leukemic but not normal PDC

We focused on the sensitivity to TRAIL-mediated apoptosis, in order to evaluate whether patients with LPDC could benefit from a therapy based on TRAIL agonists. We first asked whether leukemic PDC, normal PDC, and the recently described PDC line GEN2.2 expressed death receptors for TRAIL. We found that normal PDC from blood did not express the TRAIL receptor 1 (DR4), TRAIL receptor 2 (DR5), TRAIL receptor 3 (DcR1), or TRAIL receptor 4 (DcR2). Conversely, 50% (4/8) of LPDC did express high levels of DR5 and only few expressed DR4, DcR1, or DcR2. The GEN2.2 cells that expressed highly DR5, and to a lesser extent DR4, but neither DcR1 nor DcR2 (Table 1 and Fig. 1) are in this regard representative of LPDC. From our previous studies we knew that LPDC were particularly unable to survive in culture in the absence of cytokines [4], rendering impossible the analysis of their sensitivity to death-inducing signals. Because they share the same phenotype as primary LPDC regarding the expression of TRAIL receptors, the GEN2.2 cells were used as a model of DR5-positive leukemic PDC.

GEN2.2 cell line is sensitive to TRAIL-induced cell death

We then evaluated whether GEN2.2 cells underwent apoptosis upon exposure to soluble recombinant TRAIL molecule. By using PI incorporation to measure cell death, we found that a 250-ng/mL dose of rhs*Killer*TRAIL induced the death of about 85% of the cells after a 24-hour incubation, with about 30 to 50% of cell death after 4 to 6 hours of incubation with rhs*Killer*TRAIL respectively (Fig. 2A). In the same way, we found that an 18-hour treatment of GEN2.2 cells with rhs*Killer*TRAIL induced the death of about 55 to 85% of the cells, with 25 ng/mL to 500 ng/mL, respectively (Fig. 2B). With an intermediate dose of 250 ng/mL, 83% of GEN2.2 cells were PI-positive compared to 25% without death inducers (Fig. 2C).

TRAIL-induced GEN2.2 cell death is apoptosis

In order to further characterize the mechanism of TRAIL-induced GEN2.2 cell death, we examined cell features

Table 1. Leukemic but not normal PDC express DR5

	DR4	DR5	DcR1	DcR2
LPDC#6	0	53	0	0
LPDC#7	21	97	1	0
LPDC#8	8	11	2	22
LPDC#10	9	1	0	0
LPDC#15	4	73	1	5
LPDC#17	1	6	0	3
LPDC#20	49	40	12	8
LPDC#21	2	12	6	41
PDC#1	0	0	0	0
PDC#2	0	0	0	0
GEN2.2	14	96	0	0

Expression of DR4, DR5, DcR1, and DcR2 (TRAIL receptors) was analyzed by flow cytometry on normal PDC from six different donors (only two are shown) by directly labeling PDC in whole blood, on frozen leukemic PDC (LPDC) from eight different patients, and on fresh GEN2.2 cells. Percentages of positive cells are indicated in the table. The results are representative of two experiments for LPDC and of five experiments for GEN2.2 cells.

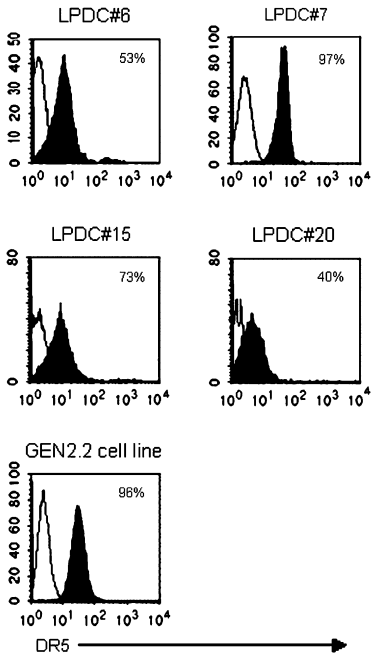


Figure 1. LPDC and GEN2.2 cells express DR5. Expression of DR5 was analyzed by flow cytometry on leukemic PDC from eight different patients and on fresh GEN2.2 cells. Histograms are shown only for the four DR5-positive samples. Open curves show isotype control, black curves show specific staining. Percentages of positive cells are indicated in upper right corner. The results are representative of two experiments for leukemic PDC and of five experiments for GEN2.2 cells.

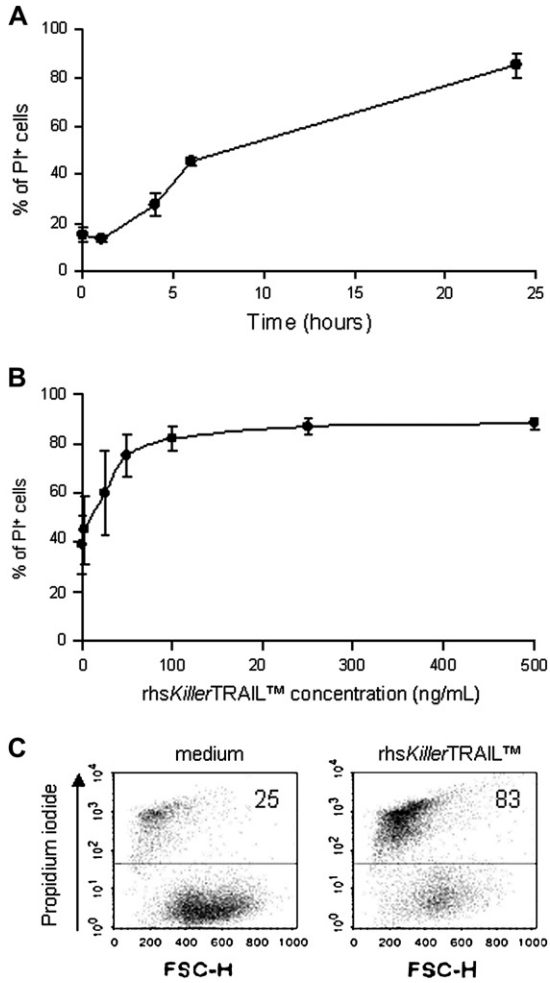


Figure 2. GEN2.2 PDC line is TRAIL sensitive. **(A)** GEN2.2 cell death was analyzed by flow cytometry, measured with PI staining, after a 0- to 24-hour incubation with 250 ng/mL rhs*Killer*TRAIL. The results are expressed as mean ± SD from two experiments. **(B)** GEN2.2 cell death was analyzed by flow cytometry, measured with PI staining, after an 18-hour incubation with 0 to 500 ng/mL rhs*Killer*TRAIL. The results are expressed as mean ± SD from three experiments. **(C)** An 18-hour incubation with 250 ng/mL rhs*Killer*TRAIL induces GEN2.2 cells death, measured with PI staining by flow cytometry. Percentages of dead cells are indicated in upper right corner. The results are representative of three experiments.

that are indicative of apoptosis. The death induced by rhs*Killer*TRAIL was characterized by four methods: direct microscopic observation after MGG coloration, and flow cytometric analysis after staining with Ann-V/PI, DioC6, or TUNEL.

Microscopic observation of GEN2.2 cells after a 4-hour incubation with rhs*Killer*TRAIL enabled visualization of the characteristic features of apoptotic cells with condensation of cytoplasm, and condensation and fragmentation of nuclei (Fig. 3A). Moreover, 76% of the cells became Ann-V positives and PI negatives, characteristics of early apoptosis, while in the absence of rhs*Killer*TRAIL, 85% of GEN2.2 cells remained alive (Fig. 3B). Another early intracellular event occurring during apoptosis is the reduction of the mitochondria transmembrane potential. This can be assessed with DioC6 labeling, which accumulates in intracellular membranes according to the transmembrane potential gradient and is lost in apoptotic cells. Upon incubation with rhs*Killer*TRAIL, 52% of GEN2.2 cells lost DioC6 labeling, compared to 20% of untreated cells (Fig. 3C).

The extensive degradation of chromosomal DNA is a later event in apoptosis and can be revealed by using the TUNEL method. In this method, 3′-OH DNA ends generated by fragmentation are nick end-labeled with FITC-dUTP, catalyzed by terminal deoxynucleotidyl transferase. After an 18-hour incubation with rhs*Killer*TRAIL, 71% of TUNEL-positive GEN2.2 cells were detected (Fig. 3D), compared to 17% in untreated cells. A 4-hour incubation with rhs*Killer*TRAIL was not sufficient to detect these later apoptotic events (data not shown). Taken together, these results show that TRAIL induces apoptosis in GEN2.2 cells.

TRAIL-induced apoptosis of GEN2.2 cells can be triggered by effector cells

We then wondered whether effector cells could kill GEN2.2 cells. Natural killer cells were chosen as model as they are known to express functional TRAIL after activation [22,23]. Indeed, incubation of NK cells for 2 days in culture with IFN-α and IL-15 induced their expression of TRAIL

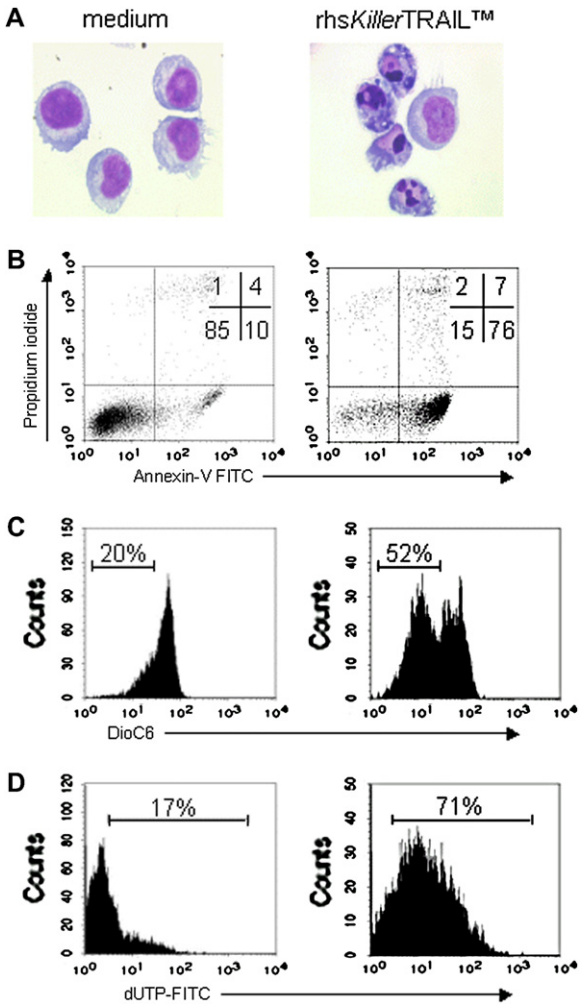


Figure 3. Cell death of PDC line induced by TRAIL is apoptosis. Cells were incubated or not with rhs*Killer*TRAIL for 4 or 18 hours. Apoptosis was then measured by four different methods. **(A)** Direct microscopic observation of PDC after MGG coloration (magnification ×40). Dying cells displayed apoptosis characteristic nuclei condensation and fragmentation. **(B)** Flow cytometry analysis of Ann-V/PI staining on GEN2.2 cells incubated with or without rhs*Killer*TRAIL (250 ng/mL). Percentages of cells in each quadrant are indicated in upper right corner. In presence of TRAIL, most of the cells became Ann-V positives. The results are representative of three experiments. **(C)** DioC6 staining measured by flow cytometry decreased on PDC incubated with rhs*Killer*TRAIL. **(D)** TUNEL staining measured by flow cytometry increased on GEN2.2 cells incubated 18 hours with rhs*Killer*TRAIL. The results for **(C)** and **(D)** are representative of two experiments.

(data not shown). Cytotoxicity of these activated NK cells was then evaluated by a (^{51}Cr) chromium-release assay. GEN2.2 cell lysis induced by activated NK cells was ratio dependent, reaching 60% at the 25/1 ratio and 30% at the 5/1 ratio, equivalent to the lysis triggered with 50 or 100 ng/mL of soluble TRAIL. Moreover, a major inhibition of this cytotoxicity was observed with 2E5 anti-TRAIL mAb, confirming the involvement of TRAIL in the induction of GEN2.2 cell death (Fig. 4).

TRAIL-induced apoptosis pathway involves caspases

Next, we studied the role of caspases in TRAIL-induced GEN2.2 apoptosis. Ligation of TRAIL receptors is known to lead to activation of initiator caspases-8 and -10 [24]. Following their activation are two main apoptosis pathways, which are dependent on the kind of cell and/or death inducer. The first one is a direct pathway, where initiator caspases directly activate downstream effector caspases (like caspase-3). The second one is amplified by caspase-9 in the mitochondria, before terminal activation of caspase-3 [24]. The involvement of these caspases was addressed by Western blot analysis. Pro-caspases-10, 8, 3, and 9 were initially detected in fresh cells (Fig. 5A). Cleavage of caspase-10 and caspase-8 was detected as early as 30 minutes after induction of apoptosis, whereas activated caspase-3 was detected after one hour. Lastly, 1.5 hours after TRAIL-induced apoptosis, caspase-9 was cleaved.

Specific inhibitors of caspases were used to further confirm the involvement of these caspases in TRAIL-induced apoptosis. Whereas rhs*Killer*TRAIL was able to induce nearly 80% of specific apoptosis in the control experiment with FMK, only 30% of specific apoptosis was observed in the presence of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK. Similarly, in the presence of Z-DEVD, Z-AEVD-FMK, and Z-IETD-FMK, rhs*Killer*TRAIL induced only 40 to 50% of specific apoptosis (Fig. 5B), confirming the main involvement of caspases-10, -8, and -3. Conversely, this apoptosis was less inhibited by Z-LEHD-FMK (65%), suggesting that caspase-9 played an accessory role in TRAIL-induced apoptosis of GEN2.2 cells.

Taken together, these results implied that TRAIL-induced apoptosis of GEN2.2 cells followed a caspase-dependent nonmitochondrial pathway with a predominant role of caspase-10 and -8 as initiator caspases, and caspase-3 as effector caspase. Further feedback cleavage could occur, leading to later caspase-9 involvement.

GEN2.2 cells undergo TRAIL-induced apoptosis via DR5

To complete the study of TRAIL-induced apoptosis pathway in GEN2.2 cells, we examined which of the two functional TRAIL receptors, expressed in GEN2.2 cells, was involved. Treatment of GEN2.2 cells with an inhibitory anti-DR5 mAb abolished more than 45% of this apoptosis, compared to the IgG1 control, whereas anti-DR4 mAb led to a 10% inhibition, suggesting that rhs*Killer*TRAIL activity was mainly mediated by DR5. The two inhibitors were shown to have an additive effect as a 56% inhibition was reached when both of them were used (Fig. 6A).

Because TRAIL is a death-inducing molecule upregulated upon activation on innate effector cells [11], we asked whether in certain conditions GEN2.2 cells could modify their DR5 expression to escape TRAIL-mediated cell death. Indeed, during their activation, effector cells may express TRAIL, and hence could be deleterious for nearby cells expressing DR5. We evaluated the modulation of DR5

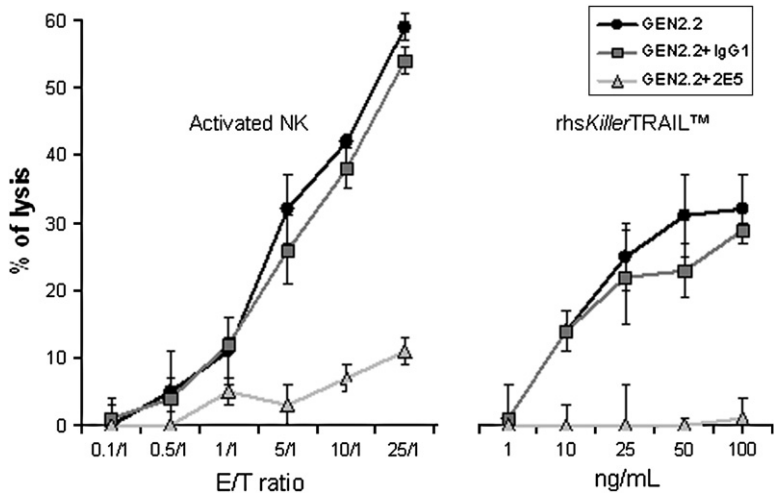


Figure 4. PDC line is sensitive to cytotoxic cells. Activated NK were used as effector cells in a 4-hour (^{51}Cr)-release assay against GEN2.2 fresh cells. As a control, rhs*Killer*TRAIL was used at concentrations of 1 to 100 ng/mL. A blocking anti-TRAIL mAb (2E5) and an isotypic control IgG1 mAb were also added for each ratio and concentration. The results show mean ± SD from three experiments.

expression on activated GEN2.2 cells. A clear reduction of DR5 expression was observed after a 24-hour coculture with inactivated influenza virus (47% of positive cells), in comparison with medium alone (97% of positive cells) (Fig. 6B). As survival is sustained by incubation with virus we decided to experiment the same coculture with LPDC that expressed DR5. As it was observed on GEN2.2 cells, these LPDC lost DR5 expression upon contact with influenza virus (Fig. 6C). Returning then to GEN2.2 cells, we found that this loss of DR5 induced their resistance to TRAIL-induced apoptosis (Fig. 6D).

Discussion

DC are potent antigen-presenting cells that initiate T cell–dependent immune responses [1,25–27]. Two distinct subtypes of DC have been described, MDC and PDC, and compelling evidence suggests that they complement each other in the recognition of pathogens and initiation of immune responses [1,28,29]. Both subtypes of DC are able to activate specific $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes [30,31]. Whereas neoplasms of phagocytes and myeloid dendritic cells are quite well defined in term of phenotype and biology [32], tumors arising from plasmacytoid dendritic cells have only recently been identified. The clinical course of these rare leukemias is particularly aggressive, leading to death within 3 years, despite an initial response to chemotherapy [8,9]. With the aim to propose therapeutic alternative for these PDC leukemias, we asked whether malignant PDC were sensitive to TRAIL-mediated apoptosis. Indeed, it is currently admitted that DR4 and DR5, two death-inducing receptors for TRAIL, are upregulated on tumor cells during oncogenic process, whereas they are not found on normal cells [33,34]. We first described the expression of DR5 on 50% of the LPDC analyzed, as well as on the PDC line GEN2.2, which we recently developed from leukemic PDC, but not on normal PDC. Interestingly, in most of the cases, LPDC expressed neither DcR1 nor DcR2, contrary to acute myeloid leukemia cells, which were reported to frequently express these decoy receptors [35]. We further went on describing the features of

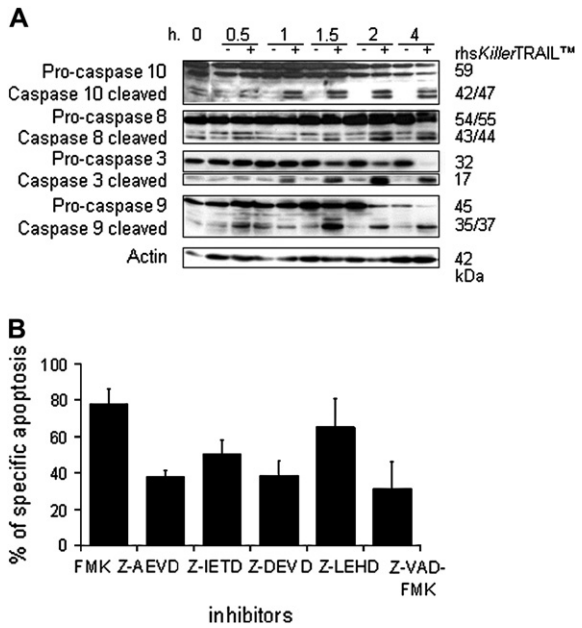


Figure 5. TRAIL-induced apoptosis involves caspases. **(A)** A 0- to 4-hour induction of cell death was carried out with rhs*Killer*TRAIL on fresh GEN2.2 cells. Constitutive expression and induced cleavage of pro-caspases and caspases were detected by Western blot. The membrane was then submitted to anti-caspase-10, anti-caspase-8, anti-caspase-3, anti-caspase-9, and anti-actin mAbs. **(B)** Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by caspases inhibitors. Cells were preincubated with inhibitors (10 μM) for 30 minutes and then apoptosis was induced by addition of rhs*Killer*-TRAIL for 4 hours and analyzed by Ann-V/PI staining. The results are mean ± SD from three experiments.

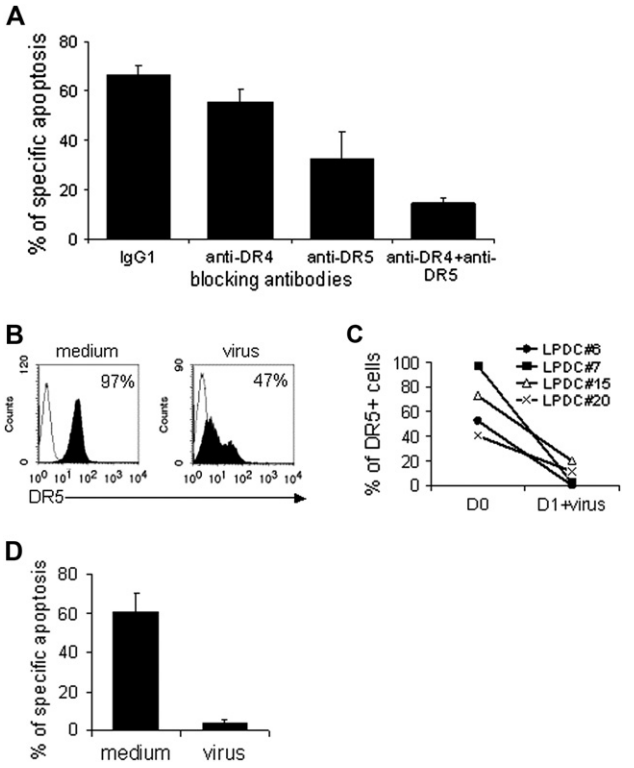


Figure 6. GEN2.2 cells undergo TRAIL-induced apoptosis via DR5. **(A)** Cells were preincubated with inhibitors (5 μg/mL) for 30 minutes and then apoptosis was induced by adding rhs*Killer*TRAIL for 4 hours and analyzed by Ann-V/PI staining. The results show mean ± SD from two experiments. **(B)** After a 24-hour coculture with or without influenza virus, DR5 expression was analyzed by flow cytometry on GEN2.2 cells. Open curves show isotype control, black curves show specific staining. Percentages of positive cells are indicated in upper right corner. The results are representative of three experiments. **(C)** After a 24-hour coculture with or without influenza virus, DR5 expression was analyzed by flow cytometry on the LPDC that were initially DR5$^+$. **(D)** After a 24-hour coculture with or without influenza virus, TRAIL-induced apoptosis were analyzed by flow cytometry on GEN2.2 cells. The results show mean ± SD from three experiments.

TRAIL-mediated apoptosis of LPDC on this cell line, because of the poor survival of LPDC in vitro in the absence of cytokines [4].

We found that immature GEN2.2 cells were especially sensitive to TRAIL-mediated cell death. The apoptosis induced was very rapid and efficient, since a 4-hour incubation with soluble TRAIL leads to apoptosis of more than 80% of the cells, as evidenced by Ann-V staining. As a matter of comparison, to obtain such an apoptosis of the TRAIL-sensitive Jurkat cell line, a 18-hour incubation with higher doses of TRAIL was necessary (personal results and [36]). This cell death was clearly apoptotic, since besides Ann-V staining revealing the exposure of phosphatidylserine, we also detected the loss of transmembrane mitochondrial potential (with DiOC6), the cleavage of DNA (with TUNEL), and the morphological features of apoptotic nuclei.

During TRAIL-mediated apoptosis, the earlier biochemical event detected is the formation of the death-inducing signaling complex (DISC) [37]. Cross-linking of death receptors results in the recruitment of FADD and caspases. Regarding TRAIL, two caspases can be recruited to the DISC: caspase-8 and -10. Whereas caspase-8 is clearly involved in the initiation of apoptotic cascade, the role of caspase-10 is less clear [36,38–40]. Our results show that caspase-10 and caspase-8 are early cleaved in GEN2.2 cells during TRAIL-induced apoptosis. Moreover, the caspase inhibition results also underline the predominant role of these two caspases, suggesting the recruitment of both caspase-10 and -8 to the DISC. Regarding downstream events, our results show a lower inhibition of TRAIL-mediated apoptosis with caspase-9 as compared to caspase-3 inhibitor, suggesting the direct activation of effector caspase-3 by proximal caspases rather than by the apoptotic mitochondrial cascade involving caspase-9. Hence, TRAIL-mediated apoptosis of GEN2.2 cell line seems to involve a direct caspase pathway, identifying these cells as type I cells in the model of CD95-induced apoptosis [41].

GEN2.2 cells express high levels of DR5 and moderate levels of DR4, and inhibition experiments show that mainly DR5 is involved in TRAIL-mediated apoptosis of these cells. Moreover, we observed a downregulation of DR5 on GEN2.2 cells upon contact with influenza virus, that led to their resistance to TRAIL-mediated apoptosis. Interestingly, we showed that the DR5$^+$ leukemic PDC studied lost DR5 expression in the same way after contact with influenza virus, suggesting that DR5 expression shares the same regulatory pathway on LPDC and GEN2.2 cells. Conversely, normal PDC expressed neither DR5 nor DR4 even after activation with influenza virus or with IL3+sCD40L (data not shown). The selective expression of death receptors on LPDC suggested that these cells could represent targets for TRAIL-expressing effector cells. Interestingly, we show that activated natural killer cells killed GEN2.2 cells, and this apoptosis was partly due to TRAIL, as evidenced by the inhibition experiment. Because it was necessary to activate effector cells in order that this cytotoxicity might occur, such a killing should not take place spontaneously in vivo. However, it could be appropriate to envisage the use of TRAIL agonists as a therapeutic alternative for the treatment of leukemic PDC. Indeed, the apoptosis-inducing new drugs targeting DR4 or DR5 that are currently under development for treatment of various kind of cancers should be able to kill DR5$^+$ leukemic PDC. Interestingly, the absence of death receptors to TRAIL on normal PDC should guarantee the safety of such a treatment for these cells.

Acknowledgments

This work was supported by grant no. 4498 and no. 4798 from ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), grant

no. 2003.26 from EFS (Etablissement Français du Sang), and grant 2004-05 and 2005-PL116 from Institut National du Cancer. AB is a recipient of a grant from EFS. We thank Bernard Drenou (CHU Rennes), Emilienne Kuhlein (CHU Toulouse), Marc Maynadié (CHU Dijon), Hubert Orfeuvre (CHR Bourg en Bresse), Véronique Salaün (CHU Caen), and the GEIL (Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies) for providing us with tumor cells, and Marie-Christine Jacob (EFS Grenoble) for advice and helpful discussions.

References

1. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998;392:245–252.
2. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. J Exp Med. 1997;185:1101–1111.
3. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. J Immunol. 2000;165:6037–6046.
4. Chaperot L, Bendriss N, Manches O, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. Blood. 2001;97:3210–3217.
5. Chaperot L, Perrot I, Jacob MC, et al. Leukemic plasmacytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts. Eur J Immunol. 2004;34:418–426.
6. Bendriss-Vermare N, Chaperot L, Peoc'h M, et al. In situ leukemic plasmacytoid dendritic cells pattern of chemokine receptors expression and in vitro migratory response. Leukemia. 2004;18:1491–1498.
7. Briere F, Bendriss-Vermare N, Delale T, et al. Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. Hum Immunol. 2002;63:1081–1093.
8. Jacob MC, Chaperot L, Mossuz P, et al. $CD4^+$ $CD56^+$ lineage negative malignancies: a new entity developed from malignant early plasmacytoid dendritic cells. Haematologica. 2003;88:941–955.
9. Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, et al. Clinical and biologic features of $CD4^+CD56^+$ malignancies. Blood. 2002;99:1556–1563.
10. Garber K. New apoptosis drugs face critical test. Nat Biotechnol. 2005;23:409–411.
11. Jeremias I, Debatin KM. TRAIL induces apoptosis and activation of NFκB. Eur Cytokine Netw. 1998;9:687–688.
12. Screaton G, Xu XN. T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. Curr Opin Immunol. 2000;12:316–322.
13. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell. 1997;88:355–365.
14. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain–containing receptor for TRAIL. Science. 1997;277:815–818.
15. LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. Cell Death Differ. 2003;10:66–75.
16. Pukac L, Kanakaraj P, Humphreys R, et al. HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. Br J Cancer. 2005;92:1430–1441.
17. Georgakis GV, Li Y, Humphreys R, et al. Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. Br J Haematol. 2005;130:501–510.
18. Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. J Immunol. 2006;176:248–255.
19. Jacob MC, Agrawal S, Chaperot L, et al. Quantification of cellular adhesion molecules on malignant B cells from non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia. 1999;13:1428–1433.
20. Plumas J, Chaperot L, Jacob MC, et al. Malignant B lymphocytes from non-Hodgkin's lymphoma induce allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses in primary mixed lymphocyte cultures: an important role of co-stimulatory molecules CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) in stimulation by tumor cells. Eur J Immunol. 1995;25:3332–3341.
21. Plasilova M, Zivny J, Jelinek J, et al. TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. Leukemia. 2002;16:67–73.
22. Sato K, Hida S, Takayanagi H, et al. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-α/β. Eur J Immunol. 2001;31:3138–3146.
23. Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, et al. Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells—involvement in NK cell–mediated cytotoxicity. Cytokine. 1999;11:664–672.
24. Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. Cytokine Growth Factor Rev. 2003;14:337–348.
25. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18:767–811.
26. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2002;20:621–667.
27. 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.
28. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. J Exp Med. 2001;194:863–869.
29. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol. 2004;5:1219–1226.
30. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, et al. Activation of influenza virus–specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. Blood. 2003;101:3520–3526.
31. Inaba K, Young JW, Steinman RM. Direct activation of $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. J Exp Med. 1987;166:182–194.
32. Pileri SA, Grogan TM, Harris NL, et al. Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. Histopathology. 2002;41:1–29.
33. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science. 1998;281:1305–1308.
34. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity. 1995;3:673–682.
35. Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, et al. TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. Haematologica. 2005;90:612–624.
36. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. Immunity. 2000;12:599–609.
37. MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. Toxicol Lett. 2003;139:89–97.
38. 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.
39. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. Nat Cell Biol. 2000;2:241–243.
40. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. Oncogene. 2001;20:2122–2133.
41. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. Semin Immunol. 2003;15:185–193.

Résultats complémentaires et discussion

1. Les PDC normales n'expriment pas DR5 à leur surface malgré leur stimulation par plusieurs conditions d'activations physiologiques

Deux récepteurs de TRAIL sont connus pour induire l'apoptose après fixation du ligand : DR4 et DR5. L'article 1 montre que DR5 est le récepteur le plus abondamment exprimé à la surface des cellules de la lignée GEN2.2 tout comme à la surface de la plupart des autres PDC leucémiques testées. Ce récepteur n'est pas exprimé à la surface des PDC normales du sang périphérique, qui restent donc insensibles à l'apoptose induite par TRAIL.

Nous nous sommes préoccupés de cette absence d'expression de DR5 par les PDC normales et nous sommes demandés si ces cellules étaient capables d'exprimer DR5 après stimulation par certains signaux, lorsqu'elles se trouvent dans différents organes ou bien au cours de leur circulation dans le sang. Nous avons donc testé différents cocktails de cytokines reproduisant les grands types d'activations physiologiques : T_H1 (IFN-γ + IL-2), T_H2 (IL-1 + IL-5 + IL-10), inflammation (TNF-α + IL-6 + IL-1), médullaire (SCF + Flt3-L + IL-7 + IL-15), DC (IL-3 + GM-CSF + SDF-1α) et IFN-α. Aucun des cocktails utilisés n'a permis d'observer une expression de DR5 à la surface des PDC normales du sang périphérique (en cytométrie de flux). On pourrait donc raisonnablement conclure que ces PDC normales ne seraient pas tuées de la même manière que les PDC leucémiques lors d'un traitement anti-tumoral à l'aide d'un TRAIL soluble. Il n'est cependant pas exclu que, dans certaines conditions qui restent à déterminer, ces PDC normales puissent exprimer DR5.

2. L'expression de DR5 sur les cellules GEN2.2 pourrait représenter une caractéristique de cellule effectrice plutôt que tumorale

L'absence de DR5 à la surface des PDC normales pourrait nous faire penser que les PDC de la lignée GEN2.2 l'expriment simplement du fait de leur caractère tumoral. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons comparé l'expression de DR5 à la surface des GEN2.2 et sa diminution après incubation avec le virus de l'*influenza* avec un autre type de cellules dendritiques normales, des moDC, et avec un autre type de cellules tumorales, la lignée de carcinome pulmonaire A549. Nous avons ainsi trouvé que DR5 était présent au repos à la surface des cellules A549, mais également à la surface des moDC normales (voir figure R1). Par ailleurs, contrairement aux cellules de la lignée A549, les moDC normales perdent l'expression de DR5 après incubation avec le virus, tout comme les PDC GEN2.2 (voir figure

R1). Ces résultats montrent que les cellules de la lignée GEN2.2 se comportent comme des cellules normales, les moDC, et non comme des cellules tumorales, du point de vue de DR5. Comme évoqué précédemment, l'expression de DR5 pourrait s'envisager sur des PDC normales dans des conditions particulières.

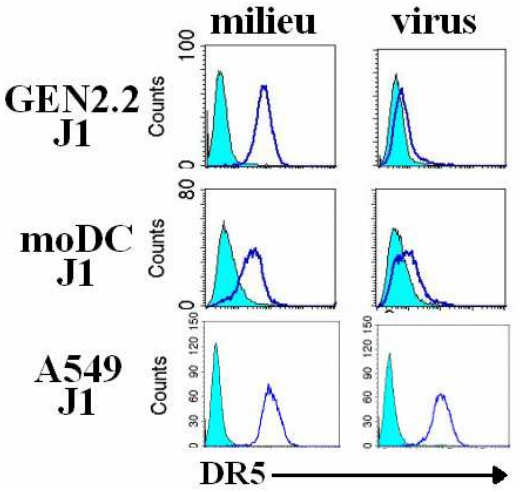


Figure R1. Expression de DR5 (auquel est ajouté un anticorps secondaire *Goat anti Mouse* couplé au PE) sur les cellules de la lignée GEN2.2, les moDC et les cellules de la lignée A549 après 24h d'incubation avec ou sans virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine).

3. Malgré leur expression de DR5, les moDC au repos sont résistantes à l'apoptose induite par TRAIL

En accord avec son profil d'expression de DR5, la lignée GEN2.2 est sensible à l'apoptose induite par TRAIL dès 4h d'incubation alors que les moDC restent résistantes, même après 18h d'incubation (voir tableau R1). L'expression de DR5 ne suffit pas forcément à rendre ces cellules sensibles à l'apoptose induite par TRAIL. En effet, la compétition pour la liaison de TRAIL engendrée par la présence de *decoy* récepteurs en surface ou bien des mécanismes de résistance tels que FLIP intervenant en aval de la liaison peuvent expliquer le fait que les cellules normales ne sont généralement pas sensibles à l'apoptose induite par TRAIL, malgré l'expression de récepteurs fonctionnels en surface, ce qui n'est pas le cas des cellules de la lignée GEN2.2.

% d'apoptose spécifique induite par TRAIL

	4h	18h
moDC	0	1
GEN2.2	71	100

Tableau R1. Sensibilité des moDC et des cellules de la lignée GEN2.2 au repos à l'apoptose induite par rhs*Killer*TRAIL™ 100 ng/mL en 4h et 18h. L'apoptose a été mesurée par marquage Annexine-V / IP au cytomètre et les résultats sont exprimés en pourcentage d'apoptose spécifique.

4. L'IFN-α, tout comme le virus de l'*influenza*, induit une diminution d'expression de DR5 à la surface des GEN2.2 et moDC normales

Nous avons montré que l'expression de DR5 par les cellules de la lignée GEN2.2 et les moDC normales était diminuée après incubation avec le virus de l'*influenza*. L'IFN-α étant considéré comme un agent intervenant dans la lutte anti-virale, nous avons également testé son action sur les cellules GEN2.2 et les moDC et montré qu'une incubation de 24h avec l'IFN-α avait le même effet que le virus (voir tableau R2). Ces résultats pourraient suggérer l'implication de l'IFN-α dans la diminution d'expression de DR5 par les GEN2.2 induite après contact avec le virus de l'*influenza*. Le virus pourrait induire la sécrétion d'IFN-α par les GEN2.2, cette cytokine ayant ensuite une action autocrine en induisant la diminution d'expression de DR5 par les cellules. Ainsi, l'IFN-α pourrait jouer un rôle dans la protection des cellules contre l'apoptose au cours des infections virales.

Expression de DR5 sur les :	moDC	GEN2.2
J0	+	+
milieu 24h	+	+
virus 24h	-	-
IFN-alpha 24h	-	-

Tableau R2. Expression de DR5 sur des moDC et les cellules GEN2.2 avant ou après activation de 24h par le virus *influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine) ou l'IFN-α (5000 U/mL), mesurée en cytométrie de flux.

5. Des ligands des TLR7 et 9 induisent aussi la diminution d'expression de DR5 et la résistance des GEN2.2 à l'apoptose induite par TRAIL

Outre le virus de l'*influenza* et l'IFN-α, plusieurs ligands des TLR7 (comme le R848) et 9 (comme les CpG ODN) induisent la diminution d'expression de DR5 à la surface des cellules de la lignée GEN2.2 (voir figure R2). La sensibilité de ces cellules à l'apoptose induite par TRAIL est également diminuée en conséquence (voir figure R2).

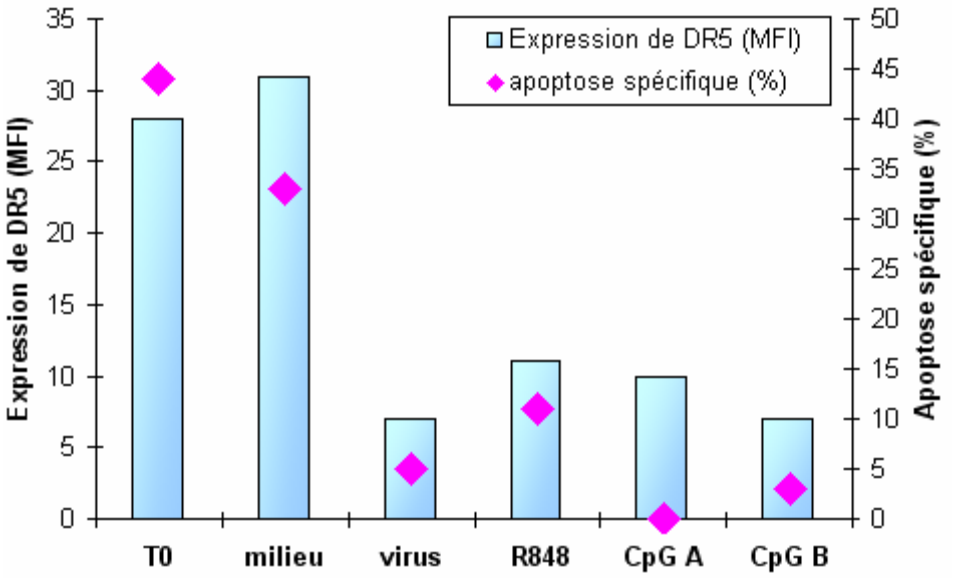


Figure R2. Expression de DR5 et apoptose spécifique des GEN2.2 au repos ou exposées pendant 24h à divers agents : virus *influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine), R848 (1µg/mL), CpG A (CpG 2336 ; 12,5µg/mL) ou CpG B (CpG 2006 ; 12,5µg/mL). L'expression de DR5 est représentée par les moyennes de fluorescence (MFI) mesurées au cytomètre en flux. La sensibilité des cellules GEN2.2 à l'apoptose induite par rhs*Killer*TRAIL™ (100ng/mL) pendant 4h après incubation avec les agents a été mesurée par marquage Annexine-V / IP au cytomètre et les résultats sont exprimés en pourcentage d'apoptose spécifique.

Conclusion

Nous avons donc montré que les PDC leucémiques GEN2.2 étaient sensibles à l'apoptose induite par TRAIL et que ce mécanisme passait par le récepteur DR5 et les caspases 8, 10 et 3. Les GEN2.2 pouvant être considérées comme un modèle de LPDC dans ce cadre, l'utilisation d'agonistes de TRAIL capables de se lier au DR5 pourrait être envisagée comme étant une thérapie efficace contre les leucémies à PDC ; d'autant plus que les PDC normales ne seraient pas tuées, ne possédant pas le récepteur DR5 à leur surface et ne semblant pas augmenter son expression, quelles que soient les conditions. Par ailleurs, nous avons montré que l'expression de DR5 diminuait à la surface des GEN2.2 en présence d'IFN-α, tout comme avec le virus *influenza*. Le virus étant connu pour induire la production de grandes quantités d'IFN de type I par les PDC, on pourrait envisager une action du virus sur la diminution d'expression de DR5 par les cellules par l'intermédiaire de l'IFN de type I.

Article 2 : Les PDC activées expriment TRAIL et deviennent tueuses.

Introduction et objectifs : Parmi les cellules dendritiques, les PDC représentent une lignée fonctionnellement distincte. En ce qui concerne l'immunité innée, les PDC sécrètent de grandes quantités d'IFN de type I après exposition virale ou stimulation par des produits microbiens comme les ODN CpG grâce à leur expression sélective de TLR7 et TLR9. Nous nous sommes demandés si elles pouvaient acquérir des fonctions cytotoxiques durant les phases précoces de l'infection ou après activation avec les agonistes des TLR7 ou TLR9.

Méthodes : Dans cette étude, nous utilisons une lignée de PDC appelée GEN2.2 dérivée de PDC leucémiques, qui partage la plupart des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec les PDC normales. Nous utilisons également des PDC primaires, isolées du sang périphérique.

Résultats et Discussion : Nous montrons que après contact avec le virus de l'*influenza*, les GEN2.2, tout comme les PDC normales, acquièrent TRAIL et une activité tueuse contre des cellules cibles sensibles à TRAIL. De plus, nous montrons que l'activation des cellules GEN2.2 par des ODN CpG ou R848 induit également TRAIL et donne à ces PDC la capacité de tuer des cellules de mélanome. Les PDC pourraient donc représenter une composante majeure de l'immunité innée qui pourrait participer à l'élimination des cellules infectées et tumorales. Ce phénomène pourrait être important pour l'efficacité des agonistes de TLR7 ou TLR9 dans la thérapie des maladies infectieuses et du cancer.

Par ailleurs, nous avons commencé à explorer les mécanismes permettant l'induction d'expression de TRAIL à la surface des PDC par les ligands des TLR7 et 9. Nous avons ainsi découvert que le virus de l'*influenza* utilisait certainement une boucle de rétroaction positive impliquant l'IFN-α pour induire l'expression de TRAIL à la surface des PDC. Le CpG de type A pourrait agir de la même manière, mais la question reste posée en ce qui concerne le CpG de type B et R848, qui, bien qu'inducteurs d'expression de TRAIL, sont incapables de provoquer une sécrétion d'IFN-α par les PDC.

Virus or TLR Agonists Induce TRAIL-Mediated Cytotoxic Activity of Plasmacytoid Dendritic Cells[1]

Laurence Chaperot,[2,3] Ariane Blum,[2] Olivier Manches, Gabrielle Lui, Juliette Angel, Jean-Paul Molens, and Joël Plumas

Among dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells (PDC) represent a functionally distinct lineage. Regarding innate immunity, PDC secrete large amounts of type I IFN upon viral exposure or stimulation by microbial products such as unmethylated CpG-motif containing oligo-DNA due to their selective expression of TLR7 and TLR9. We asked whether they could acquire cytotoxic functions during the early phases of infection or after activation with TLR7 or TLR9 agonists. In the present study, we describe a human PDC cell line called GEN2.2, derived from leukemic PDC, that shares most of the phenotypic and functional features of normal PDC. We show that after contact with the influenza virus, GEN2.2, as well as normal PDC, acquires TRAIL and killer activity against TRAIL-sensitive target cells. Moreover, we show that activation of GEN2.2 cells by CpG-motif containing oligo-DNA or R848 also induces TRAIL and endows them with the ability to kill melanoma cells. Therefore, PDC may represent a major component of innate immunity that could participate to the clearance of infected cells and tumor cells. This phenomenon could be relevant for the efficacy of TLR7 or TLR9 agonists in the therapy of infectious disease and cancer. ***The Journal of Immunology,*** **2006, 176: 248–255.**

Plasmacytoid dendritic cells (PDC)[4] are thought to link innate and adaptive immunity during microbial infection (1). PDC found as precursors in blood are the natural IFN-producing cells; they are also located in the T cell zone of lymphoid tissue, in tonsils, and in the thymus. Under pathological conditions, they infiltrate cutaneous lesions of lupus erythematosus (2) or mucosa during allergy (3) or infection (4). Regarding human cancers, PDC have been found associated with melanoma (5, 6), head and neck carcinoma (7), ovarian carcinoma (8), and breast cancer (9), but little is known about their role in tumor biology. In response to the virus, PDC secrete inflammatory cytokines and high levels of type I IFN (IFN-$\alpha\beta$) (10, 11), which regulates a diverse set of cytokines and their receptors, and directly inhibits the intracellular-viral life cycle. Regarding adaptive immune responses, type I IFN activates dendritic cell (DC) maturation (12), allows their licensing for cross-priming (13), and favors the priming of $CD4^+$ T cells toward the Th1 pathway (14).

PDC express TLR7 and TLR9 (15, 16), both triggering type I IFN production (17, 18). Antitumor activity of CpG-motif containing oligo-DNA (CpG ODN) (19–22) (TLR9 agonist) and of imiquimod (23, 24) (TLR7 agonist) has been demonstrated in different murine tumor models. In man, topical treatment with imiquimod is used for enhancing immune response to treat external genital warts, diseases caused by papillomavirus, as well as basal cell carcinoma (25). It may also induce the regression of melanoma lesions (26, 27). The mechanisms responsible for antitumor or antiviral effects of these immune modifiers are poorly understood but might involve the recruitment and activation of PDC. Indeed, in a murine model of melanoma, the antitumor effect of imiquimod could be mediated in part by the recruitment of PDC to the treated skin (28).

By producing large amounts of type I IFN, PDC could also be important in stimulating the host innate immune response. Indeed, IFN-$\alpha\beta$ has been described in particular to orchestrate the elimination of infected cells and tumor cells by inducing TRAIL expression on NK cells (29) and T lymphocytes (30). In the present study, we asked whether activated PDC could play a direct role in the clearance of infected cells or tumor cells by acquiring killer functions via TRAIL expression, hence becoming cytotoxic effector cells.

Because of the low frequency of PDC in human blood, we tried and succeeded to generate a PDC line established from the new leukemic entity derived from PDC that we described recently (31). Leukemic PDC (LPDC) are characterized by their phenotype: $CD4^+$, $CD56^+$, $CD123^+$, $CD3^-$, $CD13^-$, and $CD19^-$. Clinically, this aggressive pathology presents extranodal and skin lesions and frequently progresses to leukemia (32). Moreover, LPDC overexpress mRNA encoding the lymphoid B cell characteristic J chain and Ig λ and κ light chains (33); they express BDCA-2 and BDCA-4 and polarize naive T cells toward Th1 or Th2 pathways (34). Because malignant cells share phenotypic and functional features with their normal counterpart, these LPDC and the GEN2.2 cell line we describe here are of particular interest to study PDC functions.

In the present study, we show that activation by microbial products turns GEN2.2 and normal PDC into powerful killer cells against TRAIL-sensitive target cells. After contact with the influenza virus, CpG ODN, or R848, PDC express TRAIL and become

Department of Research and Development, Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes Grenoble, La Tronche, France

Received for publication June 24, 2005. Accepted for publication October 17, 2005.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[1] This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer Grants 4498 and 4798, Etablissement Français du Sang (EFS) Grant 2003.26, and by Canceropole Nationale 2004–5 from Institut National du Cancer. A.B. is a recipient of a grant from EFS.

[2] L.C. and A.B. contributed equally to the work.

[3] Address correspondence and reprint requests to Dr. Laurence Chaperot, Department of Research and Development, Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes Grenoble, BP35, 38701 La Tronche France. E-mail address: laurence.chaperot@efs.sante.fr

[4] Abbreviations used in this paper: PDC, plasmacytoid DC; DC, dendritic cell; LPDC, leukemic PDC; CpG ODN, CpG-motif containing oligo-DNA; MoDC, myeloid DC; h, human; s, soluble.

Copyright © 2005 by The American Association of Immunologists, Inc.

0022-1767/05/$02.00

able to kill infected and tumor target cells. Induction of TRAIL on GEN2.2 by the virus is regulated by an autocrine IFN-$\alpha\beta$ loop. Therefore, PDC may represent in vivo a major component of innate immunity participating in the early clearance of TRAIL-sensitive infected cells and tumor cells.

Materials and Methods

Cells

Malignant LPDC were obtained from invaded peripheral blood of one patient, previously described as GEN, LPDC#7 (31, 34). Mononuclear cells were cryopreserved and they contained >98% tumor cells, as determined by flow cytometry.

Normal PDC were isolated from PBMC with a BDCA-4 cell isolation kit (Miltenyi Biotec). Their purity, checked with anti BDCA-2 and CD123 mAbs, was >90%.

The murine stromal cell line MS-5 (provided by R. Berthier, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, France), A549 lung carcinoma (a gift from J.-L. Coll, INSERM U578, Grenoble, France), and Mel (a gift from M.-J. Richard, Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, Grenoble, France) were grown in RPMI 1640 Glutamax (Invitrogen Life Technologies) supplemented with sodium pyruvate, gentamicin, nonessential amino acids (referred to as complete medium), and 10% FCS (Invitrogen Life Technologies) and passaged weekly.

Myeloid DC (MoDC) were generated from blood monocytes and purified from fresh blood by the Rosette Sep isolation kit (StemCell Technologies) by a 6-day culture in complete medium and 10% of decomplemented FCS added to 500 U/ml GM-CSF (Leucomax) and 10 ng/ml IL-4 (PeproTech). At the end of the culture, these DC (MoDC) were 100% $CD1a^+$, $CD14^-$, and $CD83^-$.

Establishment of long-term LPDC culture

The MS-5 cell line was chosen as feeder for its ability to allow the proliferation of human progenitor cells (35). Five million LPDC from patient GEN were seeded in a flask (25 cm^2) precoated with confluent irradiated (60 Gy) MS-5. During the first 5 wk of the culture, Flt3-L (50 ng/ml) and stem cell factor (10 ng/ml) were added to complete 10% FCS medium, and the cells were counted and diluted weekly. At this stage of the culture, a sustained proliferation was observed, and then, over 4 wk, 0.6 million tumor cells were transferred with 1 million irradiated MS-5 every week to a new flask (25 cm^2) in 6 ml of fresh medium with cytokines. The cell line established was called GEN2. We then stopped stem cell factor and Flt3-L, and the cell line went on proliferating on the MS-5 feeder cell line. This cell line was called GEN2.2 and was maintained in culture during >5 mo.

Abs, flow cytometry, and microscopy

Immunophenotype was analyzed by flow cytometry on a FACScan (BD Biosciences), using direct or indirect labeling. The following mAbs were obtained from Immunotech: CD1a (BL6), CD1c (L161), CD3 (UCHT-1), CD4 (13B8.2), CD7 (M-T701), CD8 (B9.11), CD11c (BU15), CD14 (RMO52), CD16 (3G8), CD19 (J1.119), CD40 (mAb89), CD45RA (J33), CD56 (N901), CD62L (DREG56), CD64 (22), CD80 (MAB104), CD83 (HB15a), CD86 (HA5–2B7), anti-HLA ABC (B9.12.1), and HLA DR (B8.12.2). Anti-BDCA2 (AC144) and BDCA4 (AD5-17F6) were purchased from Miltenyi Biotec, CD123 (9F5) and CLA (HECA-452) were purchased from BD Pharmingen, and CD13 (WM-47) and CD33 (WM-54) were purchased from DakoCytomation. Unconjugated anti-TRAIL (2E5) was obtained from Alexis, and PE-conjugated anti-TRAIL (RIK-2) was obtained from eBioscience. Anti-IFN-γR was purchased from Genzyme, and anti-IFN-$\alpha\beta$R (MMHAR-2) and blocking polyclonal anti-IFN-α and anti-IFN-β were purchased from PBL Laboratories. Cytospins of cell suspensions were stained with May-Grünwald Giemsa (Kit Ral 555; Ral) for microscopic examination.

RT-PCR

Total RNAs isolated from GEN, GEN2.2, MoDC, and MS-5 cells using RNeasy kit (Qiagen) were converted to cDNA by standard methods using reverse transcriptase (Roche) and dNTP (Roche). These cDNA were amplified with specific primers (pre-Tα, λ like, SpiB, and actine) as described previously (36). Primers used for TLR were as follows: human (h)TLR6, forward, 5′-CCC TCA ACC ACA TAG AAA CG-3′, and reverse, 5′-GAG ATA TTC CAC AGG TTT GG-3′; hTLR7, forward, 5′-TTA CCT GGA TGG AAA CCA GCT ACT-3′, and reverse, 5′-TCA AGG CTG AGA AGC TGT AAG CTA-3′; hTLR8, forward, 5′-AAC TTT CTA TGA TGC TTA CAT TTC TTA TGA C-3′, and reverse, 5′-GGT GGT AGC GCA GCT CAT TT-3′; hTLR9, forward, 5′-TGA AGA CTT CAG GCC CAA CTG-3′, and reverse, 5′-TGC ACG GTC ACC AGG TTG T-3′; and hTLR10, forward, 5′-TTT GAT CTG CCC TGG TAT CTC A-3′, and reverse, 5′-AGT TGT TCT TGG GTT GTT TTC CTA AC-3′. After amplification, PCR products were separated by electrophoresis on agarose gel containing ethidium bromide and visualized by UV light illumination.

Activation/differentiation of GEN2.2 cells

Cells were cultured at 10^6 cells/ml in complete 10% FCS medium, without MS-5 cells. Initially, two culture conditions were analyzed: 1) "virus" by stimulation with 137 ng/ml hemagglutinating formaldehyde-inactivated influenza virus strain A/New Caledonia/20/99 IVR116 (Aventis Pasteur); and 2) "IL-3+CD40L" by addition of IL-3 (10 ng/ml; PeproTech), in the presence of soluble human rCD40L (soluble (s)CD40L; Alexis). After 24 or 48 h, phenotypic and functional analyses were performed. Culture supernatants were cryopreserved for cytokine measurements. These supernatants were tested for IFN-α2 content by ELISA (Immunotech) and for IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, and TNF-α by Cytometric Bead Array kit (BD Biosciences).

Naive T lymphocyte activation and polarization

Proliferation of naive T lymphocytes was evaluated in response to GEN2.2 cells precultured 24 h in medium, virus, or IL-3+sCD40L. $CD4^+CD45RA^+$ lymphocytes were isolated from cord blood by negative immunomagnetic depletion (StemCell Technologies), resulting in >97% purity. Mixed lymphocyte cultures were conducted in quadruplicate in 200-μl 96-well flat-bottom plates (Falcon) by mixing 25×10^3 responding purified $CD4^+CD45RA^+$ cells and 5–25×10^3 irradiated (30 Gy) GEN2.2 cells. Six-day cultures were performed in complete medium supplemented with 15% heat inactivated human AB serum. A total of 37×10^3 Bq of [^{3}H]thymidine was added to each well and harvested 18 h later.

To evaluate T lymphocyte polarization, 1×10^4 irradiated GEN2.2 cells were cocultured with 5×10^4 $CD4^+CD45RA^+$ cord blood T cells during 6 days. The supernatant were then tested for their IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN-γ, and TNF-α contents by flow cytometry (CBA kit; BD Biosciences).

TRAIL detection

GEN2.2 cells were cultured for 4–24 h in the presence of inactivated influenza virus (as previously described), then cells were harvested and analyzed for TRAIL expression either by flow cytometry (2E5 anti-TRAIL mAb detected with PE-conjugated goat anti-mouse mAb) or by Western blot on protein extract. Briefly, cells (10^6), infected or not, were washed in PBS, lysed in 100 μl of sample buffer and heated at 100°C for 5 min. Twenty microliters of the whole extract was loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad). After blocking nonspecific binding sites with 5% nonfat milk in PBS-Tween 20 0.1%, the membranes were incubated with primary Abs: anti-TRAIL (2E5) and anti-actin (Sigma-Aldrich). Ab labeling was revealed using goat anti-mouse or anti-rabbit HRP conjugated secondary Abs (DakoCytomation) and was visualized using ECL (Amersham Biosciences).

TRAIL expression was also analyzed after activation of GEN2.2 by TLR ligands. Cells were cultured for 24 h (10^6/ml) in the presence of the virus, CpG ODN 2336 (12.5 μg/ml TLR9 ligand; Coley Pharmaceuticals), or R848 (1 μg/ml TLR7/8 ligand; InvivoGen) and were analyzed for TRAIL expression. These concentrations were set up in preliminary dose-response experiments (data not shown). To evaluate TRAIL expression on purified normal PDC, the PE-conjugated anti-TRAIL mAb (RIK-2) was used.

In some experiments, IFN-α (50,000 U/ml; PeproTech), IFN-β (200,000 U/ml), IFN-γ (10 ng/ml; Boehringer Ingelheim), or blocking anti-IFN-α (50,000 U/ml) and anti-IFN-β (25,000 U/ml) were added.

Cytotoxicity assays

Cytotoxicity was evaluated by a ^{51}Cr release assay, as described previously (37–39). Because loss of membrane integrity is a late event during apoptosis, a 20-h incubation was necessary to detect this kind of cell death; death induced by soluble TRAIL was used to design this assay. The cytotoxicity of GEN2.2 cells or isolated normal PDC, either fresh or virus-activated (18 h before the test), was tested against either fresh or virus-activated (48 h before the test) human lung epithelial carcinoma A549 cells in triplicates. The percentage of specific lysis was calculated according to the following formula: percentage of lysis = $100 \times (ES - SR)/(MR - SR)$, where ER, SR, and MR represent experimental, spontaneous, and maximum ^{51}Cr release, respectively. The ratio SR:MR was always <30%. For inhibition experiments, azide-free anti-TRAIL (5 μg/ml 2E5; Alexis)

Table I. *GEN2.2 phenotype*[a]

Specific Markers						
T/B cells						
CD3	CD4	CD7	CD8	CD19	CD20	
0	100	95	2	0	0	
Myeloid/monocyte						
CD13	CD33	CD11b	CD11c	CD14	CD64	CD116
2	66	2	10	0	1	25
NK cells						
CD16	CD56	CD57	CD25			
0	51	0	0			
DC						
CD1a	CD1c	CD83	BDCA2	BDCA4	CD123	ILT-3
4	5	2	70	88	100	100
APC						
CD40	CD80	CD86	HLA ABC	HLA DR		
27	2	100	100	100		
Miscellaneous						
CD34	CD36	CD38	CD45RA	CD45RO	CD65	CD117
0	89	74	90	21	17	0
Chemokine receptors/homing						
CCR1	CCR2	CCR3	CCR4	CCR5	CCR6	CCR7
0	1	5	2	6	8	16
CXCR1	CXCR2	CXCR3	CXCR4	CXCR5	CLA	CD62L
0	6	44	73	1	0	94

[a] Percentages of positive cells were determined by flow cytometry. These values are representative of two (CD7, CD19, CD20, CD8, CD16, CD57, CD34, CD36, CD38, CD65, and CD11) to several experiments (for other markers).

was added to effector cells 30 min before addition of target cells. As a control, TRAIL-induced lysis was measured in the same assay by addition of killer TRAIL (10–100 ng/ml).

The cytotoxicity of GEN2.2 cells against melanoma cell line Mel was analyzed slightly differently, with TRAIL-inducers kept during the test. Briefly, GEN2.2 cells were preincubated 4 h with virus, CpG2336, or R848, before addition of ^{51}Cr-labeled Mel-1 either fresh or presensitized 24 h with IFN-β (2000 U/ml; Tebu) in triplicates. After 20 h, supernatants were harvested and counted for their ^{51}Cr content. Neither SR nor sensibility to TRAIL were modified in the presence of the virus, R848, or CpG2336 (data not shown). Percentages of lysis were calculated as described previously. TRAIL expression on GEN2.2 cells cultured in the same conditions was verified.

Results

GEN2.2 cell line

We generated a human PDC cell line GEN2.2 from tumor blood cells from LPDC of patient GEN or LPDC#7 (31, 34). Cells proliferated rapidly, as a single cell suspension, with both nonadherent and weakly adherent cells. This proliferation was strictly dependent on the presence of the MS-5 feeder cell line (data not shown). The HLA typing of GEN2.2 was the following: A*0201, B*07, *44; C*05, *07; DRB1*0103, *08; DQB1*0501, *0402; and DPB1*0201, *0401. GEN2.2 cells, such as normal PDC, were

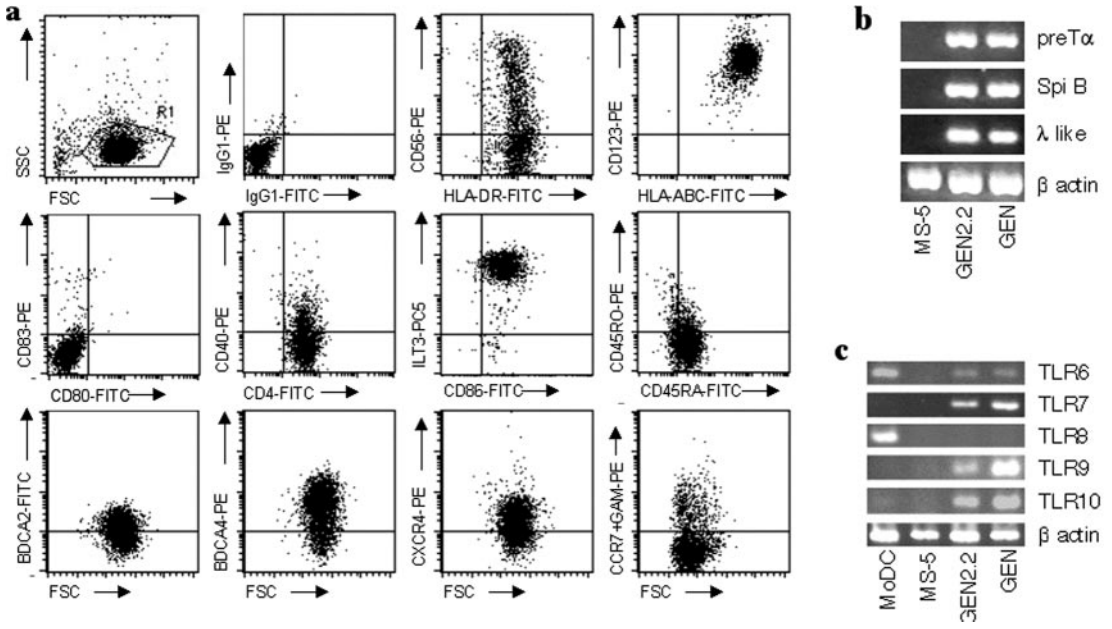


FIGURE 1. Description of the GEN2.2 plasmacytoid dendritic cell line under resting conditions. *a*, Phenotypic characteristics of fresh GEN2.2 cells analyzed by flow cytometry. Dot plot in *upper left panel* shows the forward light scatter/SSC profile of the cells that were further analyzed on the gate R1. These data are representative of at least three independent experiments. *b*, RT-PCR analysis of pre-Tα, SpiB, and λlike in GEN2.2, GEN, and MS-5 cells. *c*, RT-PCR analysis of TLR6, 7, 8, 9, and 10 in GEN2.2, GEN, and MS-5 cells and MoDC.

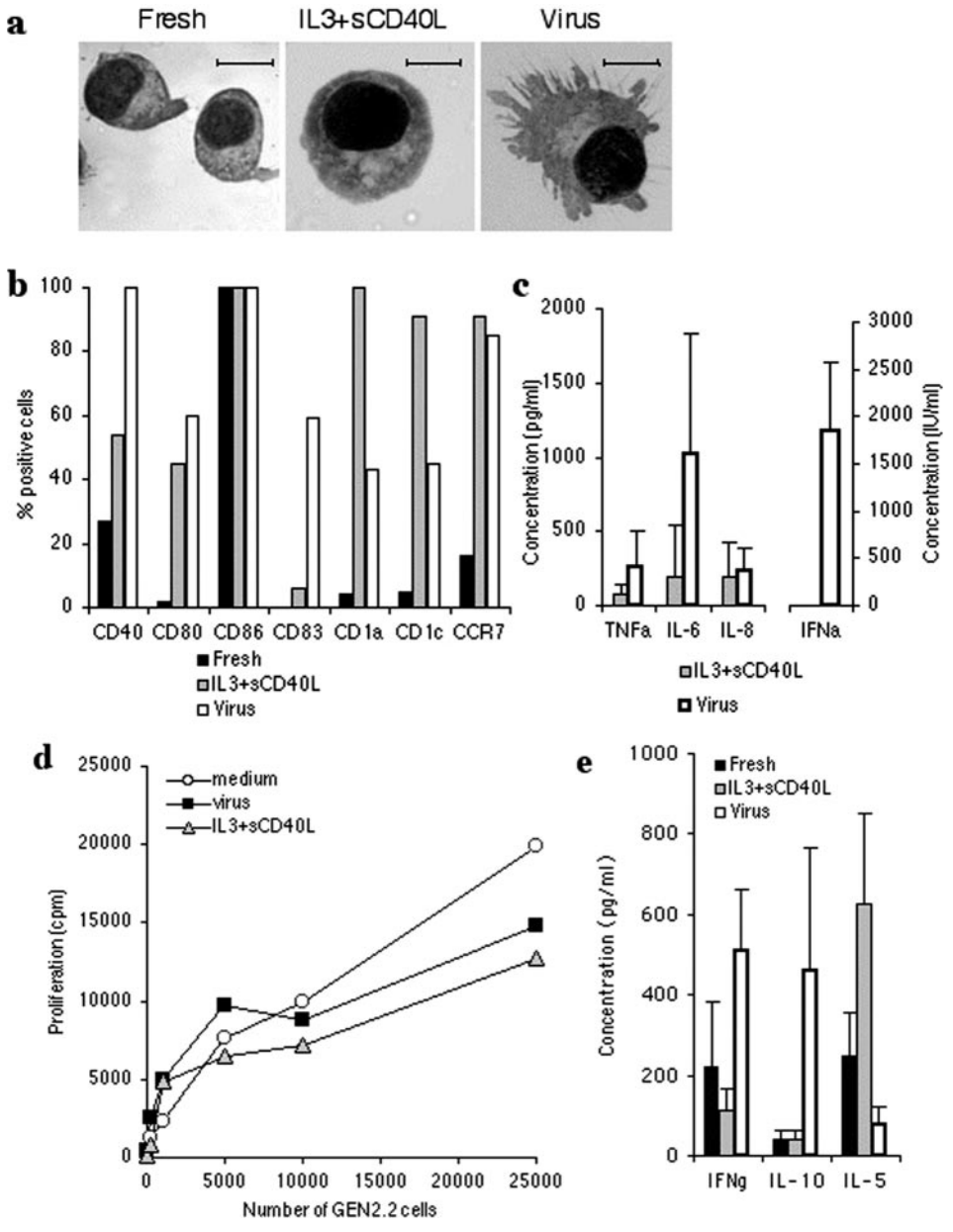


FIGURE 2. Activation and stimulatory functions of GEN2.2 cells. *a*, Morphology of fresh and 2-day activated GEN2.2 cells (scale bar: 10 μm). *b*, Expression of molecules associated with DC maturation on control and activated GEN2.2 cells. After 2 days in the presence of inactivated influenza virus or IL-3+sCD40L, the phenotype of GEN2.2 cells was analyzed by flow cytometry. These values are representative of at least two independent experiments. *c*, Inflammatory cytokines and type I IFN levels in the supernatants of activated GEN2.2 (mean of six independent experiments). *d*, Proliferation of naive T cells after 6-day coculture with fresh, virus-, and IL-3+sCD40L-activated GEN2.2 (representative of three experiments). *e*, IFN-γ, IL-10, and IL-5 levels in the supernatants of naive $CD4^+$ T cells primed by GEN2.2 cells after a 6-day mixed lymphocyte culture (mean of three independent experiments).

characterized by their expression of CD4, HLA ABC, HLA DR, CD45RA, and CD123 (Table I and Fig. 1*a*).

Thirty-five percent of the cells highly expressed CD56, whereas other T, B, and NK cell-associated surface markers (CD3, CD8, CD19, CD20, CD16, and CD57) were negative, as we described for fresh tumor cells (31). Besides CD33, they are negative for myeloid markers (CD13, CD11b, CD11c, CD14, and CD64). They expressed BDCA-2 and BDCA-4, high levels of CD86, and moderate levels of CD40, whereas CD80 was undetectable. CD1a, CD1c, and CD83 were negative at the surface of GEN2.2 cells. Chemokine and homing receptors such as CCR5, CCR6, CCR7, and CXCR2 were weakly expressed, and CXCR3, CXCR4, and CD62L were positive, whereas CCR1, CCR2, CCR4, and CXCR1 were negative. The presence of mRNA coding for spiB, pre-Tα, and λlike chain was detected in the GEN2.2 cell line, as with leukemic cells from GEN patient, but not in MS-5 (Fig. 1*b*). The presence of mRNA coding for TLR6, 7, 9, and 10 was also detected in the GEN2.2 cell line such as in leukemic cells from GEN patient but neither in MoDC nor in MS-5, except for TLR6 in MoDC, whereas mRNA coding for TLR8 was only detected in MoDC (Fig. 1*c*). When GEN2.2 cells were cultured without MS-5 cells for 24 h in the presence of IL-3 and CD40L, or of the influenza virus, they rapidly formed large clusters while they remained isolated without stimulation (data not shown). MGG staining of cytospins showed enlargement of the cells and the acquisition of a dendritic morphology in the presence of the virus (Fig. 2*a*). GEN2.2 cells cultured with the virus or with IL-3+CD40L upregulated their expression of surface molecules associated with APC functions, HLA ABC, HLA DR (data not shown), and CD40, CD80, and CD86, and acquired a mature DC phenotype (Fig. 2*b*) characterized by the expression of CD83 and CCR7. Whereas GEN2.2 cells activated by IL-3+sCD40L secrete only TNF-α, IL-6, and IL-1, GEN2.2 cultured with an influenza virus produced high levels of IFN-α (Fig. 2*c*). Resting and mature GEN2.2 cells activated the proliferation of naive $CD4^+$ T lymphocytes (Fig. 2*d*). T cells primed with virus-activated GEN2.2 cells secrete IFN-γ and IL-10, whereas T cells primed with IL-3+sCD40L-activated GEN2.2 cells secreted IL-5 (Fig. 2*e*).

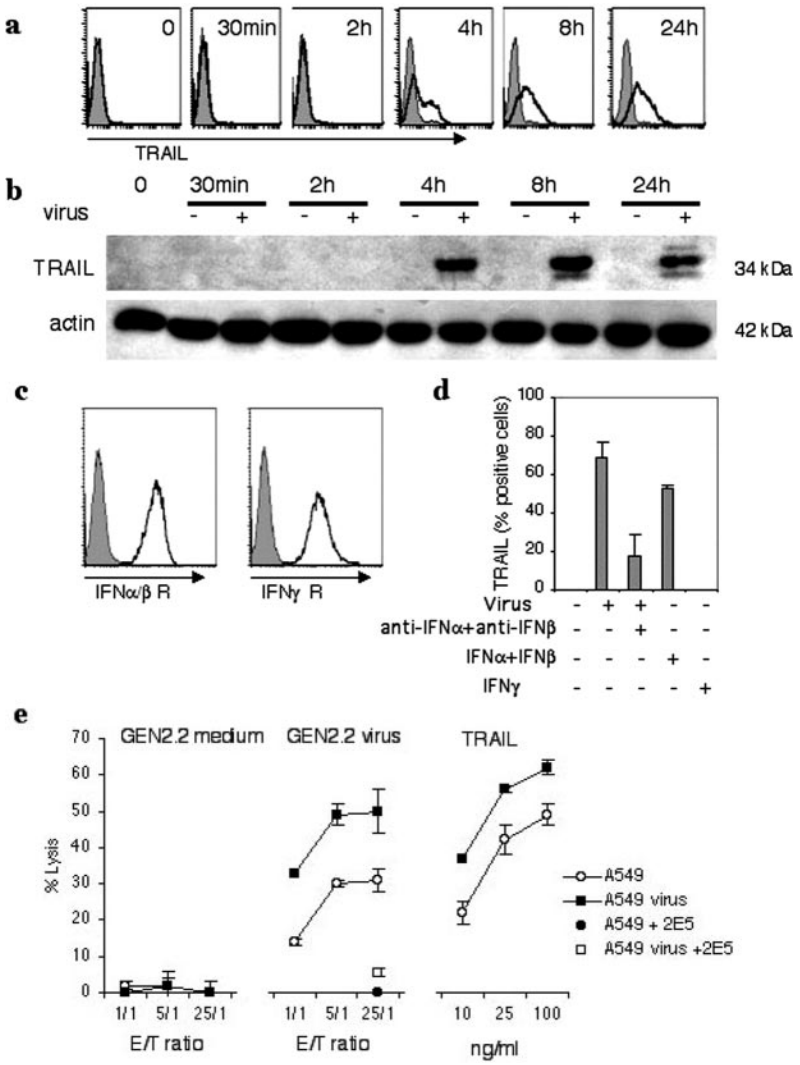


FIGURE 3. Virus-activated GEN2.2 cells up-regulate TRAIL and become killer cells. *a*, Flow cytometric detection of TRAIL expression on GEN2.2 cells activated by inactivated influenza virus. *b*, Western blot detection of TRAIL on GEN2.2 cells with or without activation with inactivated influenza virus. *c*, Expression of IFN-$\alpha\beta$ and IFN-γ receptors by GEN2.2 cells. *d*, Expression of TRAIL on GEN2.2 cells with or without activation with influenza virus, IFN-α, and IFN-β or IFN-γ, in the presence or absence of neutralizing anti-IFN-α and anti-IFN-β Abs (mean of three independent experiments). *e*, Cytotoxicity of GEN2.2 preactivated or not 24 h with influenza virus against A549 lung epithelial carcinoma cells. Killing A549-infected cells was also measured. As a control, cytotoxicity induced by soluble TRAIL was determined in the same experiment. Cytotoxicity was measured by a 20-h ^{51}Cr release assay, in the presence or absence of anti-TRAIL 2E5 mAb. Data show mean ± SD of one experiment performed in triplicates and are representative of three independent experiments.

Activated PDC become killer cells

PDC, by their ability to secrete high levels of type I IFN, are involved in the early response to viral infection. Because TRAIL is a death-inducing molecule implicated in antiviral responses, and often regulated by type I IFN, we asked whether PDC could express TRAIL and become killer cells upon viral infection. We exposed GEN2.2 cells to inactivated influenza virus (30 min to 24 h) and looked for TRAIL expression. A clear expression of TRAIL was detected by flow cytometry and Western blot analysis from 4 h of coculture with virus but remained undetectable in medium alone (Fig. 3, *a* and *b*). Because both IFN-$\alpha\beta$ and IFN-γ can induce TRAIL expression on various cells, we wondered whether they could control TRAIL expression on GEN2.2. GEN2.2 cells highly expressed both IFN-$\alpha\beta$ and IFN-γ receptors (Fig. 3*c*). We evaluated whether IFN produced by GEN2.2 after activation could up-regulate TRAIL expression in an autocrine manner. Virus-induced TRAIL expression was partially inhibited by either anti-IFN-α or anti-IFN-β mAb (data not shown) and dramatically reduced by neutralizing IFN-α and IFN-β together (Fig. 3*d*). Moreover, type I IFN, but not IFN-γ, induced TRAIL expression on GEN2.2 as did the viral infection (Fig. 3*d*).

Thereafter, we wondered whether GEN2.2 activated by the influenza virus could exert TRAIL-mediated cytotoxicity. Because the virus enters the organism following endocytosis by epithelial cells from the respiratory system, we used the TRAIL-sensitive A549 lung epithelial carcinoma cells as a target cell model. A549 cells were lysed by virus-activated GEN2.2 (30% lysis at E:T ratio = 25:1) (Fig. 3*e*), and this cytotoxic activity was induced by the virus because resting GEN2.2 did not lyse A549. Moreover, as described with respiratory syncytial virus (40), we found that the influenza virus enhanced A549 cell sensitivity to TRAIL (Fig. 3*e*), without modifying their level of expression of DR4 or DR5 (data not shown). Furthermore, A549 became more sensitive to GEN2.2-mediated lysis after contact with the virus (50% at E:T ratio = 25:1). Treatment of virus-activated GEN2.2 cells with an inhibitory anti-TRAIL mAb completely abolished this cytotoxicity, confirming that PDC-killer activity was mediated by TRAIL (Fig. 3*e*).

We asked whether infection could also turn normal PDC into killer cells. We purified normal PDC from healthy human blood and showed that normal PDC also expressed TRAIL after an 18-h exposure to the influenza virus but not after activation with IL-3 (Fig. 4*a*). Accordingly, they became able to lyse A549 cells (50% lysis at 15:1 E:T ratio) via TRAIL because blocking TRAIL inhibited this cytotoxicity (Fig. 4*b*). This cytotoxicity was not found with nonactivated PDC or IL-3-activated PDC.

TRAIL-mediated antitumor cytotoxicity of GEN2.2 cells

Thanks to the expression of TLR9 and TLR7, PDC can be activated by CpG ODN and resiquimod (R848), respectively. These immune modifiers are under development to treat cancers, and we

wondered whether PDC could also become killer cells following activation with such TLR agonists and hence play a role in the elimination of tumors treated with TLR ligands. Both CpG 2336 and R848 are able to activate GEN2.2 cell line, as evidenced by the up-regulation of CD80 and CD40 (Fig. 5*a*). GEN2.2 cells activated with CpG 2336 produced type I IFN in the same range as with the influenza virus, whereas they did not after activation with R848 (data not shown). TRAIL was detected on GEN2.2 cells after activation with CpG ODN 2336, or R848 (Fig. 5*b*). Thereafter, we wondered whether virus- or TLR-activated GEN2.2 could exert TRAIL-mediated antitumor cytotoxicity. In melanoma, tumor regressions have described after treatment with the TLR7 agonist imiquimod, both in man and mice, and in the latter PDC were found recruited. We used a TRAIL-sensitive melanoma cell line (Mel) as a target cell model. Resting Mel cells were slightly sensitive to TRAIL and slightly lysed by GEN2.2 either activated by CpG2336, R848, or influenza virus (10–20% lysis at E:T ratio = 25:1) (Fig. 5*c*). However, when Mel cells were preincubated with IFN-β, their sensitivity to soluble TRAIL increased, and hence, they were lysed by activated GEN2.2 cells (40–50% lysis at E:T ratio = 25:1) (Fig. 5*c*). Treatment of activated GEN2.2 cells with an inhibitory anti-TRAIL mAb diminished this cytotoxicity, confirming that their killer activity was partly mediated by TRAIL (Fig. 5*c*).

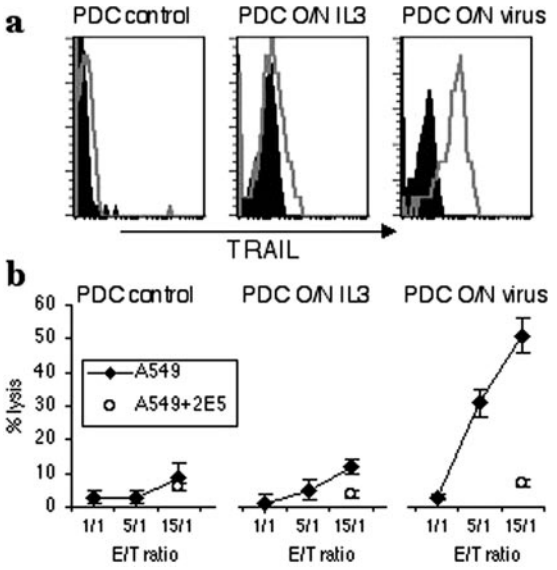


FIGURE 4. Virus-activated normal PDC up-regulate TRAIL and become killer cells. *a*, The expression of TRAIL was measured by flow cytometry after an overnight incubation of purified normal PDC with medium alone, influenza virus, or IL-3. *b*, Cytotoxicity of virus-activated normal PDC. Normal PDC were preactivated 16 h with influenza virus, and their cytotoxicity was measured by a 20-h ^{51}Cr release assay, in the presence or absence of anti TRAIL 2E5 mAb. Data show mean ± SD of one experiment performed in triplicates and are representative of two independent experiments.

Discussion

DC, described as professional APC, are capable of initiating immune responses. MoDC can be easily generated in vitro, so their functions can be described extensively. PDC, which represent a distinct DC subset, are able to secrete high levels of type I IFN in response to viral infections and to recruit immune effectors (41, 42), so they might play a central role in innate immunity. We focused here on the functions of PDC during the early phases of their activation and see whether they could behave as effector cells in the innate phases of immune responses. The methodology for differentiating PDC from CD34$^+$ hemopoietic progenitor cells (43, 44), or their purification from blood, is rather expensive and time-consuming, so poor availability of cells usually limits functional studies of PDC. For this reason, we tried to derive a cell line from leukemic PDC (31). In the present study, we describe the generation of a cell line called GEN2.2. This cell line has been grown in coculture with the murine marrow-derived stromal MS-5 cells. As we demonstrated for LPDC (31, 34), such as normal PDC, GEN2.2 cells mature upon activation with IL-3+sCD40L or influenza virus and then induce naive CD4$^+$ T cell proliferation and polarization toward Th2 or Th1 pathways. In the presence of the influenza virus, GEN2.2 cells secrete IFN-α; they are also activated by R-848 and CpG ODN, which is not surprising, because mRNA coding for TLR7 and TLR9 were detected in the cell line, as described for normal PDC (15, 16). GEN2.2 cells were also found to express low levels of mRNA coding for TLR6 and 10, but mRNA coding for TLR8 was not observed. Altogether, these initial results demonstrate the validity of the GEN2.2 cell line to study PDC functions.

Besides its direct antiviral effects, type I IFN can activate cytotoxic functions for various kinds of effector cells, mainly by inducing TRAIL expression (29, 30, 39, 45, 46). So, because PDC are the natural IFN-producing cells, they may induce cytotoxic functions of other locally recruited effector cells. Indeed, in favor of this hypothesis, it has been shown that after stimulation by CpG ODN, PDC via their secretion of IFN-α, induced TRAIL on monocytes (47). In the present study, we examined whether PDC could share such innate cytotoxic functions. We explored the initial phases of PDC activation upon encounter with the influenza virus, and up-regulation of TRAIL expression on both GEN2.2 cells and normal PDC was observed. The activation triggered by the influenza virus might involve the recognition of viral ssRNA by TLR-7 (48, 49), which does not depend on the replication of the virus, and hence, it may occur very early upon infection of the cells. Regarding MoDC, monocytes, or epithelial cells, it has been described that TRAIL expression can be induced by viral infection (50, 51), but the mechanism of inducing TRAIL in these experiments performed with replicating virus remained to be explored. Our results also showed that IFN-$\alpha\beta$ produced by GEN2.2, upon viral challenge, by an autocrine loop, was mostly responsible for this up-regulation of TRAIL. Because blockade of type I IFN receptor only partially blocked TRAIL up-regulation, there could also be a direct type I IFN independent up-regulation of TRAIL further enhanced by the IFN autocrine loop. This also suggested that PDC may express TRAIL very rapidly upon infection, independently of other cell subsets.

We then confirmed that expression of TRAIL by PDC endowed them with a cytotoxic activity. We found that both GEN2.2 cells and normal PDC, after contact with the influenza virus, were able to lyse sensitive target cells via TRAIL. This PDC killer activity may be important for early elimination of infected cells. Indeed, up-regulation of DR4 or DR5 death receptors for TRAIL has been reported after certain viral infections (on lung epithelial cells by respiratory syncytial virus (40), on fibroblasts by human CMV (52), and on hepatocytes during hepatitis C virus infection (53)) and can also be induced by IFN-α (54), sensitizing cells to TRAIL-mediated lysis. Because normal cells are thought to be resistant to TRAIL, they should not be concerned by this apoptosis. The acquisition of TRAIL happened as early as 4 h after contact with the virus, suggesting that PDC may constitute the first weapon against infected cells, and this newly described function of PDC reinforces their position as a crucial component of innate immunity. TRAIL was up-regulated earlier than CD40 or CD80 (data not shown), suggesting that first PDC act as killer cells. In a second step, they might capture the cellular debris generated by apoptosis, and migrate to lymph nodes to further activate T cells.

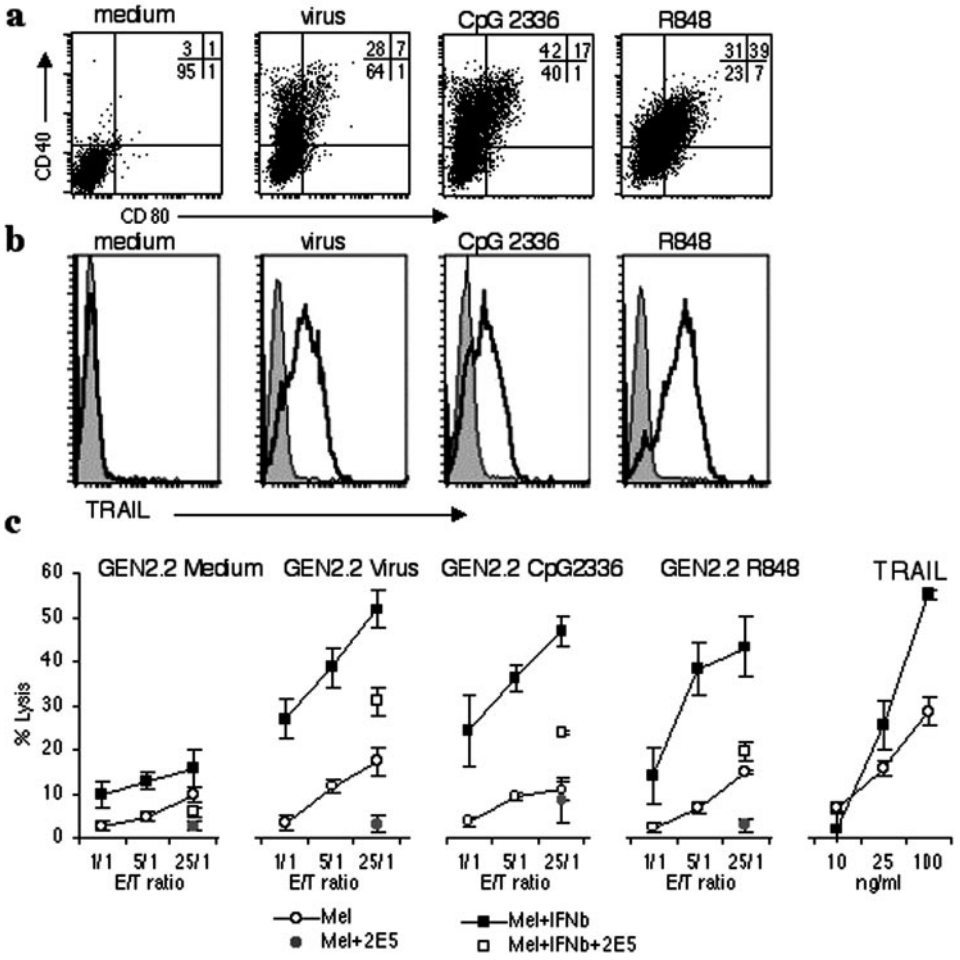


FIGURE 5. GEN2.2 activated by virus, TLR7, or TLR9 agonists acquire TRAIL and antitumor cytotoxicity. *a*, Expression of CD40 and CD80 after a 2-day activation of GEN2.2 cells with or without virus, CpG 2336, or R848. *b*, Expression of TRAIL on GEN2.2 activated 4-h culture with or without virus, TLR9, or TLR7 agonist; closed histograms represent staining with isotype control. *c*, Cytotoxicity of GEN2.2 cells activated or not by influenza virus, CPG2336, or R848. Melanoma cells were presensitized or not by a 24-h incubation with IFN-β. Cytotoxicity was measured by a 20-h ^{51}Cr release assay, in the presence or in the absence of anti-TRAIL blocking 2E5 mAb. Data show mean $\pm$ SD of one experiment performed in triplicates and are representative of at least three independent experiments.

In addition to the effects of virus, we also found up-regulation of TRAIL on GEN2.2 after activation with TLR7 or TLR9 agonists. These molecules represent new ways of modulating the immune response and efforts are being directed toward their use as adjuvants for vaccines or in cancer therapy, with very promising results in the case of basal cell carcinomas treated with imiquimod (25). The local activation of PDC with TLR7 or 9 agonists might favor antitumor immunity by secretion of cytokines, such as IFN-$\alpha\beta$, and by direct killing of tumor cells often sensitive to TRAIL, as our results obtained with a melanoma cell line suggest. In favor of this hypothesis, a recent study showed the association between regression of murine melanoma upon treatment with imiquimod and the recruitment of PDC to the tumor (28). Although rare, PDC can be found in human tumors, but their function may be impaired in the tumor environment (7). However, by the local use of appropriate TLR ligands, their function could be restored, or new fully functional PDC could be recruited to promote antitumor responses.

Altogether, our data reinforce the idea that PDC orchestrate early innate phases of immunity against infectious diseases, and they could also be used to fight against cancer. We showed that a challenge with virus, TLR7 or TLR9 agonists can turn PDC into powerful killer cells against TRAIL-sensitive targets. This phenomenon may be important for the early clearance of TRAIL-sensitive target cells, both in immunity against pathogens and during treatment of cancer or infection by CpG ODN or imidazoquinolines.

Acknowledgments

We thank Hubert Orfeuvre (CHR Bourg en Bresse) for providing us with tumor cells and Marie-Christine Jacob (Etablissement Français du Sang (EFS) Grenoble) for advice and helpful discussions. We are grateful to Agnès Moine and Cosima Semoun (EFS Grenoble) for RT-PCR, and HLA typing and to Jean-Luc Coll (INSERM U578, Grenoble) and Marie-Jeanne Richard (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, Grenoble) for providing us with the A549 and Mel cell line, respectively. We thank J. Y. Cesbron for welcoming A. Blum. We thank L. Zitvogel (Institut Gustave Roussy, Villejuif) and J.-C. Gluckman (Hospital St. Antoine, Paris) for helpful discussions.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

1. Liu, Y. J. 2004. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 275–305.
2. Farkas, L., K. Beiske, F. Lund-Johansen, P. Brandtzaeg, and F. L. Jahnsen. 2001. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon α/β-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am. J. Pathol.* 159: 237–243.
3. Jahnsen, F. L., F. Lund-Johansen, J. F. Dunne, L. Farkas, R. Haye, and P. Brandtzaeg. 2000. Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123^{high}) dendritic cells in human nasal allergy. *J. Immunol.* 165: 4062–408.
4. Gill, M. A., A. K. Palucka, T. Barton, F. Ghaffar, H. Jafri, J. Banchereau, and O. Ramilo. 2005. Mobilization of plasmacytoid and myeloid dendritic cells to mucosal sites in children with respiratory syncytial virus and other viral respiratory infections. *J. Infect. Dis.* 191: 1105–1115.
5. Vermi, W., R. Bonecchi, F. Facchetti, D. Bianchi, S. Sozzani, S. Festa, A. Berenzi, M. Cella, and M. Colonna. 2003. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J. Pathol.* 200: 255–268.
6. Salio, M., M. Cella, W. Vermi, F. Facchetti, M. J. Palmowski, C. L. Smith, D. Shepherd, M. Colonna, and V. Cerundolo. 2003. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-γ-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur. J. Immunol.* 33: 1052–1062.
7. Hartmann, E., B. Wollenberg, S. Rothenfusser, M. Wagner, D. Wellisch, B. Mack, T. Giese, O. Gires, S. Endres, and G. Hartmann. 2003. Identification

and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* 63: 6478–6487.
8. Zou, W., V. Machelon, A. Coulomb-L'Hermin, J. Borvak, F. Nome, T. Isaeva, S. Wei, R. Krzysiek, I. Durand-Gasselin, A. Gordon, et al. 2001. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* 7: 1339–1346.
9. Treilleux, I., J. Y. Blay, N. Bendriss-Vermare, I. Ray-Coquard, T. Bachelot, J. P. Guastalla, A. Bremond, S. Goddard, J. J. Pin, C. Barthelemy-Dubois, and S. Lebecque. 2004. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 10: 7466–7474.
10. Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y. J. Liu. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835–1837.
11. Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5: 919–923.
12. Ito, T., R. Amakawa, M. Inaba, S. Ikehara, K. Inaba, and S. Fukuhara. 2001. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J. Immunol.* 166: 2961–299.
13. Le Bon, A., N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, P. Borrow, and D. F. Tough. 2003. Cross-priming of $CD8^+$ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* 4: 1009–1015.
14. Ito, T., R. Amakawa, and S. Fukuhara. 2002. Roles of Toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance. *Hum. Immunol.* 63: 1120–115.
15. Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31: 3388–3393.
16. Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194: 863–869.
17. Bauer, M., V. Redecke, J. W. Ellwart, B. Scherer, J. P. Kremer, H. Wagner, and G. B. Lipford. 2001. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human $CD11c^-$,$CD123^+$ dendritic cells. *J. Immunol.* 166: 5000–5007.
18. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526–1529.
19. Ballas, Z. K., A. M. Krieg, T. Warren, W. Rasmussen, H. L. Davis, M. Waldschmidt, and G. J. Weiner. 2001. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J. Immunol.* 167: 4878–4886.
20. Carpentier, A. F., L. Chen, F. Maltonti, and J. Y. Delattre. 1999. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res.* 59: 5429–5432.
21. Kawarada, Y., R. Ganss, N. Garbi, T. Sacher, B. Arnold, and G. J. Hammerling. 2001. NK- and $CD8^+$ T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 167: 5247–5253.
22. Heckelsmiller, K., K. Rall, S. Beck, A. Schlamp, J. Seiderer, B. Jahrsdorfer, A. Krug, S. Rothenfusser, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J. Immunol.* 169: 3892–3899.
23. Sidbury, R., N. Neuschler, E. Neuschler, P. Sun, X. Q. Wang, R. Miller, M. Tomai, E. Puscasiu, S. Gugneja, and A. S. Paller. 2003. Topically applied imiquimod inhibits vascular tumor growth in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 121: 1205–1209.
24. Sidky, Y. A., E. C. Borden, C. E. Weeks, M. J. Reiter, J. F. Hatcher, and G. T. Bryan. 1992. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine. *Cancer Res.* 52: 3528–3533.
25. Geisse, J., I. Caro, J. Lindholm, L. Golitz, P. Stampone, and M. Owens. 2004. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J. Am. Acad. Dermatol.* 50: 722–733.
26. Bong, A. B., B. Bonnekoh, I. Franke, M. P. Schon, J. Ulrich, and H. Gollnick. 2002. Imiquimod, a topical immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma. *Dermatology* 205: 135–138.
27. Fleming, C. J., A. M. Bryden, A. Evans, R. S. Dawe, and S. H. Ibbotson. 2004. A pilot study of treatment of lentigo maligna with 5% imiquimod cream. *Br. J. Dermatol.* 151: 485–488.
28. Palamara, F., S. Meindl, M. Holcmann, P. Luhrs, G. Stingl, and M. Sibilia. 2004. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J. Immunol.* 173: 3051–3061.
29. Sato, K., S. Hida, H. Takayanagi, T. Yokochi, N. Kayagaki, K. Takeda, H. Yagita, K. Okumura, N. Tanaka, T. Taniguchi, and K. Ogasawara. 2001. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-α/β. *Eur. J. Immunol.* 31: 3138–3146.
30. Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, H. Eto, K. Okumura, and H. Yagita. 1999. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J. Exp. Med.* 189: 1451–1460.
31. Chaperot, L., N. Bendriss, O. Manches, R. Gressin, M. Maynadie, F. Trimoreau, H. Orfeuvre, B. Corront, J. Feuillard, J. J. Sotto, et al. 2001. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 97: 3210–3217.
32. Feuillard, J., M.-C. Jacob, F. Valensi, M. Maynadie, R. Gressin, L. Chaperot, C. Arnoulet, F. Brignole-Baudoin, B. Drenou, E. Duchayne, et al. 2002. Clinical and biologic features of $CD4^+CD56^+$ malignancies. *Blood* 99: 1556–1563.
33. Briere, F., N. Bendriss-Vermare, T. Delale, S. Burg, C. Corbet, M. C. Rissoan, L. Chaperot, J. Plumas, M. C. Jacob, G. Trinchieri, and E. E. Bates. 2002. Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum. Immunol.* 63: 1081–1093.
34. Chaperot, L., I. Perrot, M.-C. Jacob, D. Blanchard, V. Salaun, V. Deneys, S. Lebecque, F. Briere, J.-C. Bensa, and J. Plumas. 2004. Leukemic plasmacytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts. *Eur. J. Immunol.* 34: 418–426.
35. Bennaceur-Griscelli, A., C. Tourino, B. Izac, W. Vainchenker, and L. Coulombel. 1999. Murine stromal cells counteract the loss of long-term culture-initiating cell potential induced by cytokines in $CD34^+CD38^{low/neg}$ human bone marrow cells. *Blood* 94: 529–538.
36. Bendriss-Vermare, N., C. Barthelemy, I. Durand, C. Bruand, C. Dezutter-Dambuyant, N. Moulian, S. Berrih-Aknin, C. Caux, G. Trinchieri, and F. Briere. 2001. Human thymus contains IFN-α-producing $CD11c^-$, myeloid $CD11c^+$, and mature interdigitating dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 107: 835–844.
37. Plumas, J., L. Chaperot, M. C. Jacob, J. P. Molens, C. Giroux, J. J. Sotto, and J. C. Bensa. 1995. Malignant B lymphocytes from non-Hodgkin's lymphoma induce allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses in primary mixed lymphocyte cultures: an important role of co-stimulatory molecules CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) in stimulation by tumor cells. *Eur. J. Immunol.* 25: 3332–3341.
38. Chaperot, L., M. C. Jacob, F. LeVacon, C. Giroux, J. P. Molens, J. J. Sotto, J. C. Bensa, and J. L. Plumas. 1997. Relationships between susceptibility to LAK cell-mediated lysis, conjugate formation and expression of adhesion molecules in B cell derived non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk. Lymphoma* 28: 133–143.
39. Fanger, N. A., C. R. Maliszewski, K. Schooley, and T. S. Griffith. 1999. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Exp. Med.* 190: 1155–1164.
40. Kotelkin, A., E. A. Prikhod'ko, J. I. Cohen, P. L. Collins, and A. Bukreyev. 2003. Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Virol.* 77: 9156–9172.
41. Megjugorac, N. J., H. A. Young, S. B. Amrute, S. L. Olshalsky, and P. Fitzgerald-Bocarsly. 2004. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J. Leukocyte Biol.* 75: 504–514.
42. Bendriss-Vermare, N., S. Burg, H. Kanzler, L. Chaperot, T. Duhen, O. de Bouteiller, M. D'Agostini, J. M. Bridon, I. Durand, J. M. Sederstrom, et al. 2005. Virus overrides the Th2 propensity of human CD40L-activated plasmacytoid dendritic cells through synergistic induction of IFN-γ and Th1 chemokines production. *J. Leukocyte Biol.* 78: 954–966.
43. Chen, W., S. Antonenko, J. M. Sederstrom, X. Liang, A. S. Chan, H. Kanzler, B. Blom, B. R. Blazar, and Y. J. Liu. 2004. Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 103: 2547–2553.
44. Blom, B., S. Ho, S. Antonenko, and Y. J. Liu. 2000. Generation of interferon α-producing predendritic cell (pre-DC)2 from human $CD34^+$ hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192: 1785–1796.
45. Griffith, T. S., S. R. Wiley, M. Z. Kubin, L. M. Sedger, C. R. Maliszewski, and N. A. Fanger. 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.* 189: 1343–1354.
46. Liu, S., Y. Yu, M. Zhang, W. Wang, and X. Cao. 2001. The involvement of TNF-α-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-β-stimulated human dendritic cells to tumor cells. *J. Immunol.* 166: 5407–5415.
47. Kemp, T. J., B. D. Elzey, and T. S. Griffith. 2003. Plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-α induces TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2L-mediated antitumor activity by human monocytes following CpG oligodeoxynucleotide stimulation. *J. Immunol.* 171: 212–218.
48. Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and E. S. C. Reis. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529–1531.
49. Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, and R. A. Flavell. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 5598–5603.
50. Vidalain, P. O., O. Azocar, B. Lamouille, A. Astier, C. Rabourdin-Combe, and C. Servet-Delprat. 2000. Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J. Virol.* 74: 556–559.
51. Wurzer, W. J., C. Ehrhardt, S. Pleschka, F. Berberich-Siebelt, T. Wolff, H. Walczak, O. Planz, and S. Ludwig. 2004. NF-κB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J. Biol. Chem.* 279: 30931–30937.
52. Sedger, L. M., D. M. Shows, R. A. Blanton, J. J. Peschon, R. G. Goodwin, D. Cosman, and S. R. Wiley. 1999. IFN-γ mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J. Immunol.* 163: 920–926.
53. Mundt, B., F. Kuhnel, L. Zender, Y. Paul, H. Tillmann, C. Trautwein, M. P. Manns, and S. Kubicka. 2003. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J.* 17: 94–96.
54. Shigeno, M., K. Nakao, T. Ichikawa, K. Suzuki, A. Kawakami, S. Abiru, S. Miyazoe, Y. Nakagawa, H. Ishikawa, K. Hamasaki, et al. 2003. Interferon α sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 up-regulation and NF-κB inactivation. *Oncogene* 22: 1653–1662.

3ème partie : Voies de signalisation utilisées par les différents ligands de TLR dans les PDC GEN2.2 pour induire l'expression de TRAIL

Introduction et objectifs

L'activation des cellules de la lignée GEN2.2 par le virus de l'*influenza*, R848, les CpG A ou B, induit l'expression de TRAIL à leur surface. Cette induction d'expression est obtenue sur les GEN2.2 non seulement après incubation avec le virus de l'*influenza* ou le CpG A, qui induisent une sécrétion d'IFN-α par les cellules (cet IFN-α pouvant induire une boucle d'amplification du signal), mais également après incubation avec R848 ou le CpG B, qui n'induisent pas cette sécrétion. Il semblerait donc que deux voies de signalisation distinctes soient empruntées par ces différents ligands de TLR pour mener à l'expression de la même protéine.

Dans notre étude, l'expression de TRAIL sera utilisée comme un révélateur permettant de mettre à jour l'existence de voies de signalisation différentes dans la PDC, selon le ligand de TLR employé, et d'identifier les molécules impliquées dans ces voies.

Méthodes

En plus des techniques classiques décrites dans les articles 1 et 2, nous avons utilisé de nouvelles méthodes d'approche pour étudier les voies de signalisation mises en jeu par les ligands de TLR dans la lignée.

RT-PCR quantitative

Ainsi, nous avons analysé la transcription des gènes d'intérêt après différents types d'activation des GEN2.2 en utilisant la technique de RT-PCR quantitative, qui nous permet de définir les conditions où on peut considérer que l'ARNm est présent ou bien s'il s'agit d'un bruit de fond. La technique de RT-PCR quantitative est réalisée selon la technologie TaqMan sur l'appareil LightCycler (Roche Diagnostic).

La réaction TaqMan est basée sur l'activité 5' exonucléase de la Taq polymérase capable de cliver une sonde fluorogénique, doublement marquée et hybridée sur la séquence cible, durant la phase d'extension de la réaction de PCR. L'un des deux marqueurs fluorescents sert de rapporteur (la 6-carboxyfluoresceine ou FAM). Son spectre d'émission est éteint par le second marqueur fluorescent (la 6-carboxy-tetraméthyle-rhodamine ou TAMRA)

lorsque ce dernier est situé à proximité, à cause du recouvrement partiel du spectre d'excitation de TAMRA sur le spectre d'émission de FAM. Durant la phase d'extension du cycle PCR, l'activité exonucléase de l'ADN-polymérase clive la sonde et libère le marqueur rapporteur FAM (qui s'éloigne alors du *quencher* TAMRA), augmentant ainsi le signal de fluorescence émis par FAM (640 nm). Ce signal est détectable et quantifiable par le LightCycler à chaque fin de cycle d'amplification par la mesure de la fluorescence à l'extrémité des microcapillaires. Pour chaque échantillon amplifié, un courbe d'amplification est obtenue qui prend en compte la valeur de l'intensité du signal de fluorescence (F1/F2) en fonction du nombre de cycles PCR. Cette valeur F1/F2 correspondant à la variation de l'intensité de fluorescence du rapporteur à chaque cycle PCR, normalisée par la fluorescence d'une référence interne passive, permet l'élimination du bruit de fond. Un *crossing point* (Cp) spécifique est déterminé pour chaque PCR. Le Cp étant défini comme le premier cycle au cours duquel une augmentation significative de la fluorescence FAM est détectée. Il est obtenu lors de la phase exponentielle de l'amplification PCR. Plus le nombre de copies à l'origine est élevé, plus la valeur Cp sera faible.

Le logiciel effectue une droite de régression sur les valeurs Cp rapportées en fonction des log de concentrations des ADN cibles. Cette droite correspond à la droite standard d'amplification obtenue par le calcul de la dérivée seconde maximale de la phase exponentielle d'amplification.

Les séquences des amorces et de la sonde pour chaque gène sont trouvées grâce au site de Roche, Universal ProbeLibrary (https://www.roche-applied-science.com/) puis commandées chez Roche (Eurogentec). Pour gommer des différences quantitatives dues à des variations de rendement de la réaction PCR, un système de référence, composé d'un couple d'amorces et d'une sonde spécifique d'un gène monomorphique ubiquitaire, le gène de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est utilisé pour caliber la quantité d'ADN présente dans l'échantillon.

Pour calculer les valeurs d'amplification de nos ARNm, nous utilisons la formule $2^{(-dCp)}$, où dCp = Cp(gène d'intérêt) – Cp (G6PDH).

Kits FACE et TransAM (Active Motif)

Par ailleurs, nous avons utilisé les kits FACE et TransAM de Active Motif, qui nous permettent respectivement de doser la présence de facteurs de transcription totaux ou phosphorylés dans des cellules entières ou bien dans des extraits nucléaires.

Résultats

1. Des ligands des TLR7 et 9 induisent une expression de TRAIL par les cellules GEN2.2, avec une cinétique différente selon le ligand

Comme nous l'avons montré dans l'article 2, le virus de *l'influenza* et différents ligands des TLR7 et 9 sont capables d'induire une expression de TRAIL à la surface des cellules de la lignée GEN2.2. Nous nous sommes intéressés à la cinétique de cette activation, en suivant l'apparition de TRAIL à la surface des cellules, au cytomètre en flux. L'incubation des

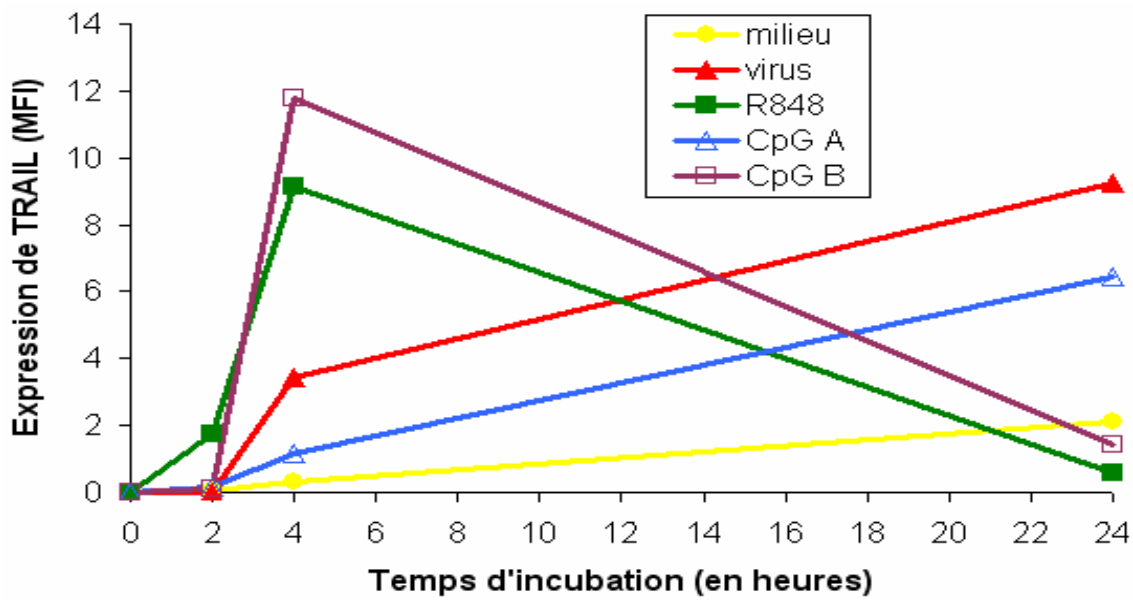


Figure R3. Cinétiques d'expression de TRAIL à la surface des GEN2.2 après incubation avec le virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine), R848 (1µg/mL), CpG A (2336 ; 12,5 µg/mL) ou CpG B (2006 ; 12,5 µg/mL). Les résultats sont exprimés en Intensité Moyenne de Fluorescence (MFI) et obtenus par analyse au cytomètre en flux, à l'aide d'un anticorps secondaire Goat anti Mouse couplé au PE.

GEN2.2 avec le virus de l'*influenza*, R848 et les CpG A (2336) et B (2006) (voir figure R3) induit dans tous les cas une expression de TRAIL en surface dès 4h. Cependant, nous avons observé que l'expression de TRAIL était maintenue et maximale au bout de 24h d'incubation avec le virus et le CpG de type A, alors qu'elle atteignait son maximum au bout de 4h d'incubation avec R848 et le CpG de type B et diminuait par la suite (voir figure R3).

2. Ces ligands de TLR7 et 9 n'induisent pas tous une sécrétion d'IFN de type I par les cellules GEN2.2

Plusieurs ligands des TLR7 et 9 sont ainsi capables d'induire l'expression de TRAIL à la surface des cellules de la lignée GEN2.2. Or, nous avons montré dans l'article 2 que l'induction d'expression de TRAIL à la surface des GEN2.2 par le virus de l'*influenza* passait par une boucle de rétroaction positive médiée par l'IFN de type I. Nous avons donc voulu savoir si l'IFN de type I était également impliqué dans les voies d'induction d'expression de

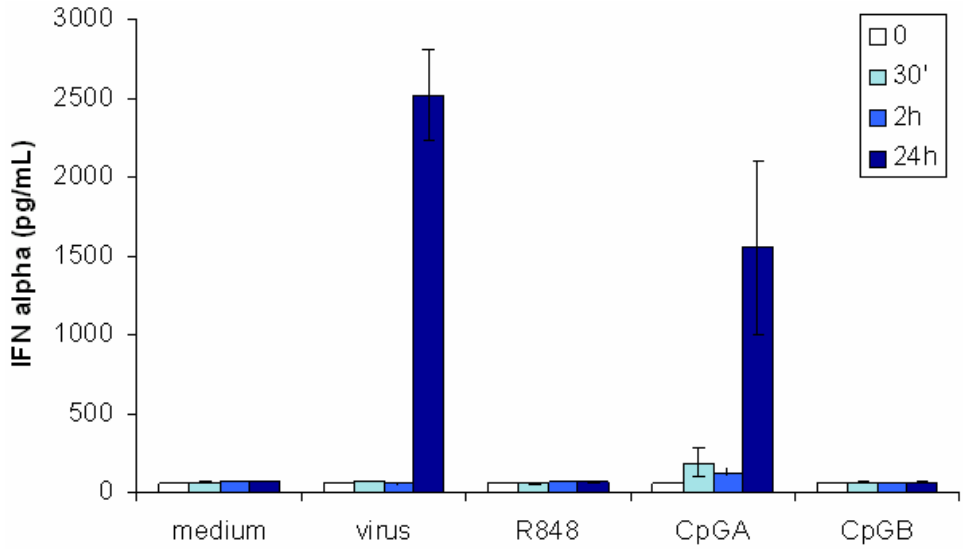


Figure R4. Cinétique de sécrétion d'IFN-α par les GEN2.2 induite par le virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine), R848 (1µg/mL), le CpG de type A (2336 ; 12,5µg/mL) ou le CpG de type B (2006 ; 12,5µg/mL). Résultats obtenus par ELISA (PBL).

TRAIL des autres ligands de TLR. Pour cela, nous avons tout d'abord analysé la sécrétion d'IFN-α par les GEN2.2 en réponse à ces différents ligands de TLR. La cinétique de sécrétion d'IFN-α nous montre qu'il n'y a pas d'IFN-α sécrété, ni pour R848, ni pour le CpG de type B (voir figure R4). Cependant, de l'IFN-α pourrait tout de même être sécrété à un moment donné et pourrait être consommé immédiatement par la cellule, empêchant ainsi toute détection par une méthode telle que le dosage ELISA.

3. Des anticorps anti-IFNαβ n'inhibent pas l'expression de TRAIL induite sur les cellules GEN2.2 par le R848

Pour vérifier si l'induction d'expression de TRAIL sur les GEN2.2 par le R848 ne pourrait pas passer tout de même par une sécrétion d'IFN de type I reconsommé immédiatement, nous avons utilisé des anticorps bloquants anti-IFN-α et anti-IFN-β. Sans

anticorps, nous obtenons bien une induction d'expression de TRAIL à la surface des cellules quel que soit l'activateur (voir figure R5). L'ajout des anticorps bloquants empêche cette

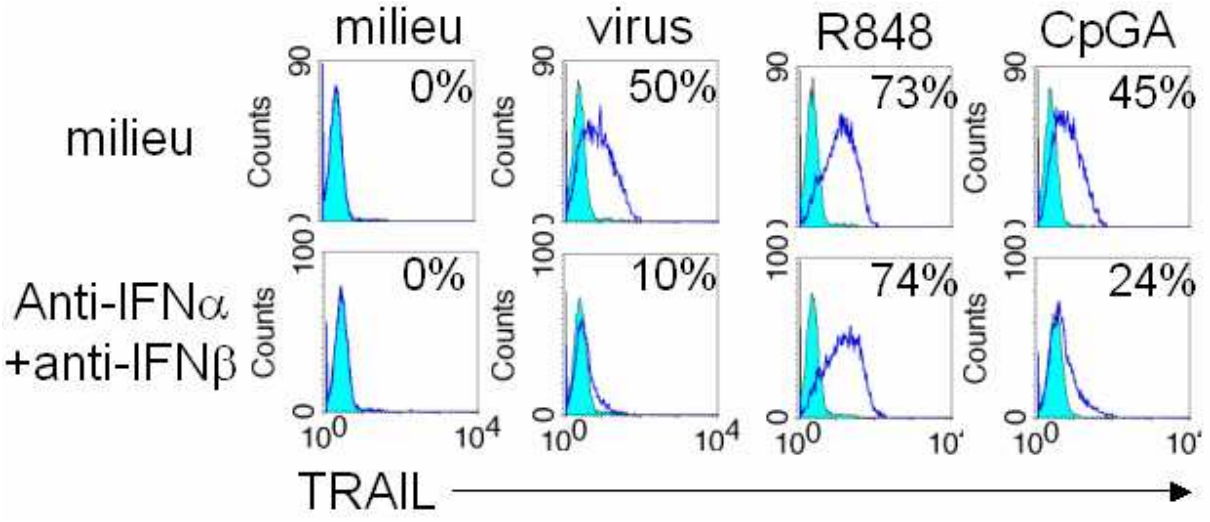


Figure R5. Inhibition de TRAIL induit 24h avec IFN-α (500 U/mL) + IFN-β (2000 U/mL), le virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine), R848 (1 µg/mL) et CpG A (2336 ; 12,5 µg/mL) par les anticorps anti-IFN-α (50 000 U/mL) + anti-IFN-β (25 000 U/mL). L'expression de TRAIL est mesurée en cytométrie de flux avec un anticorps secondaire Goat anti Mouse couplé au PE. Les histogrammes pleins correspondent au témoin isotypique et les histogrammes vides à contour épais correspondent au marquage de TRAIL.

induction d'expression de TRAIL par le virus de l'*influenza*, comme il a été précédemment montré dans l'article 2, mais également par le CpG de type A. Au contraire, l'expression de TRAIL induite par le R848 n'est pas affectée par les anticorps bloquants (voir figure R5). Ces résultats indiquent que l'induction d'expression de TRAIL par le R848 n'est due ni à une sécrétion d'IFN-α, ni à une sécrétion d'IFN-β et pourrait donc impliquer d'autres molécules.

4. Le R848 n'induit pas la transcription des gènes de l'IFN de type I, ni ceux de l'IFN-λ et de l'IP-10 par les GEN2.2

Une autre hypothèse pourrait être la sécrétion d'IFN de type I interne, avec une activation immédiate de la cellule par cette cytokine endogène, ou bien l'implication d'autres types d'IFN que les IFN-α et -β. Nous montrons par RT-PCR quantitative que l'ARNm des IFN de type I comme l'IFN-α1, l'IFN-α2, l'IFN-β1, mais également l'IFN-ω1 (IFN de type I) apparaissent après 18h d'activation des cellules de la lignée GEN2.2 par le virus de l'*influenza* mais pas après activation avec R848 (voir figure R6A). Une cinétique a montré que l'ARNm de ces cytokines n'atteignait pas son maximum de production avant 18h d'activation des GEN2.2 par le virus ou le CpG 2336 (résultats non montrés). L'ARNm de l'IL28A (ou IFN-λ1) n'est, quant à lui, détecté dans aucune condition (résultats non montrés), et l'ARNm de la chimiokine IP10 apparaît à 18h d'activation avec le virus et le CpG A, tout comme les ARNm

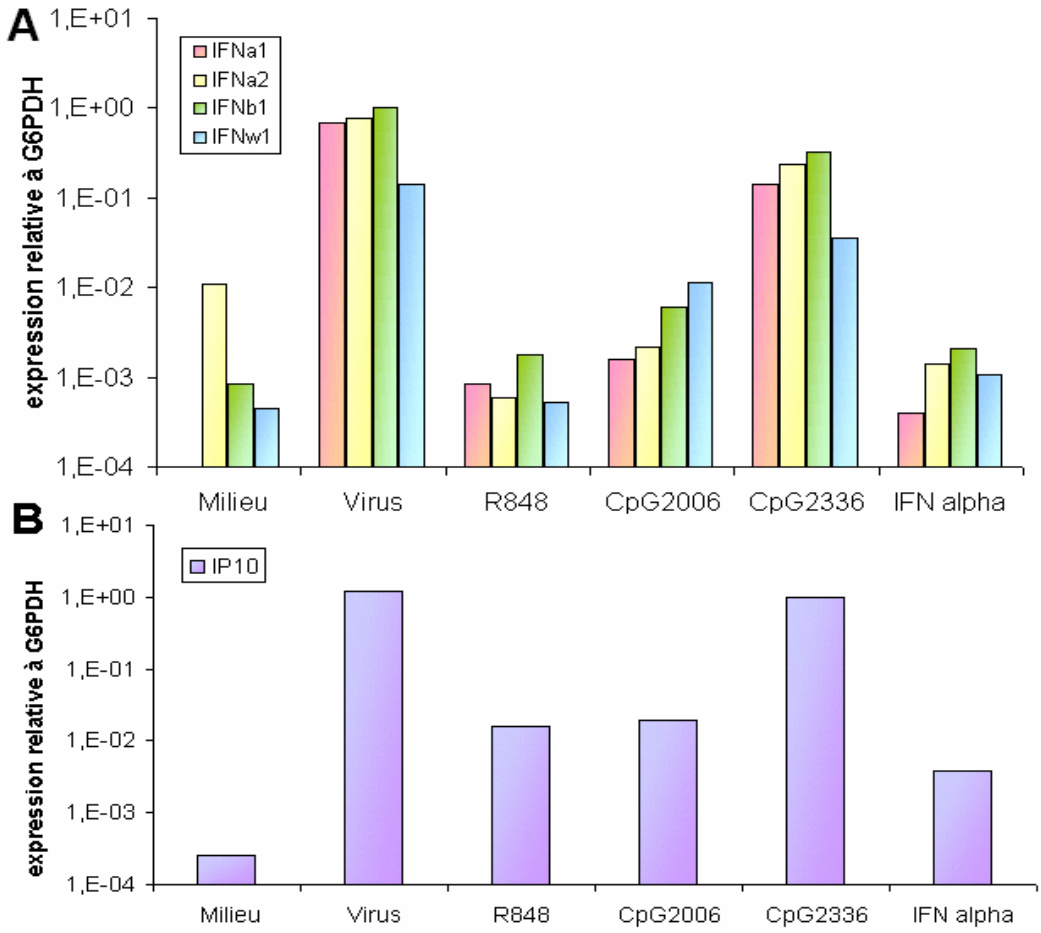


Figure R6. Expression de l'ARNm de **A.** IFN-α1, -α2, -β1 et -ω1 et **B.** de l'IP10, par les GEN2.2 après 18h d'activation par le virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine), R848 (1µg/mL), CpG B (2006 ; 12,5 µg/mL), CpG A (2336 ; 12,5 µg/mL) ou l'IFN-α (5000 U/mL). Expression relative à l'expression d'un gène de référence (G6PDH) mesurée en RT-PCR quantitative.

des IFN de type I (voir figure R6B). Ces résultats nous indiquent donc que l'induction d'expression de TRAIL à la surface des cellules GEN2.2 par le R848 n'est pas non plus due à une sécrétion d'IFN de type I interne, ni à l'implication d'autres types d'IFN que les IFN-α et -β.

5. La transcription des gènes MXA, G1P3 et IRF9 est induite de la même manière que celle de TRAIL dans les cellules GEN2.2

Les ligands des TLR7 et 9 induisent donc tous l'expression de TRAIL à la surface des GEN2.2. Parmi eux, le virus de l'*influenza* et le CpG de type A induisent également une sécrétion d'IFN de type I et d'IP-10 par les cellules alors que le R848 et le CpG de type B ne semblent pas y parvenir. Pour étudier plus en détails cette dichotomie, nous nous sommes intéressés à d'autres gènes que TRAIL, dont la transcription est censée résulter d'une activation de la voie de signalisation de l'IFN de type I, pour voir si leur ARNm était présent

ou non après activation par les différents ligands (voir figure R7). Ainsi, nous retrouvons la transcription du gène de TRAIL après activation par tous les types de ligands de TLR testés (voir figure R7). De la même manière, nous observons la transcription des gènes de MXA, G1P3 et IRF9, après 18h d'activation par le virus et le CpG de type A, mais également avec R848 et le CpG de type B (voir figure R7). Ces résultats suggèrent que des éléments de la voie de signalisation de l'IFN de type I pourraient intervenir dans l'induction de transcription de TRAIL par R848 ou le CpG de type B dans les cellules GEN2.2, sans pour autant impliquer le récepteur de l'IFN de type I.

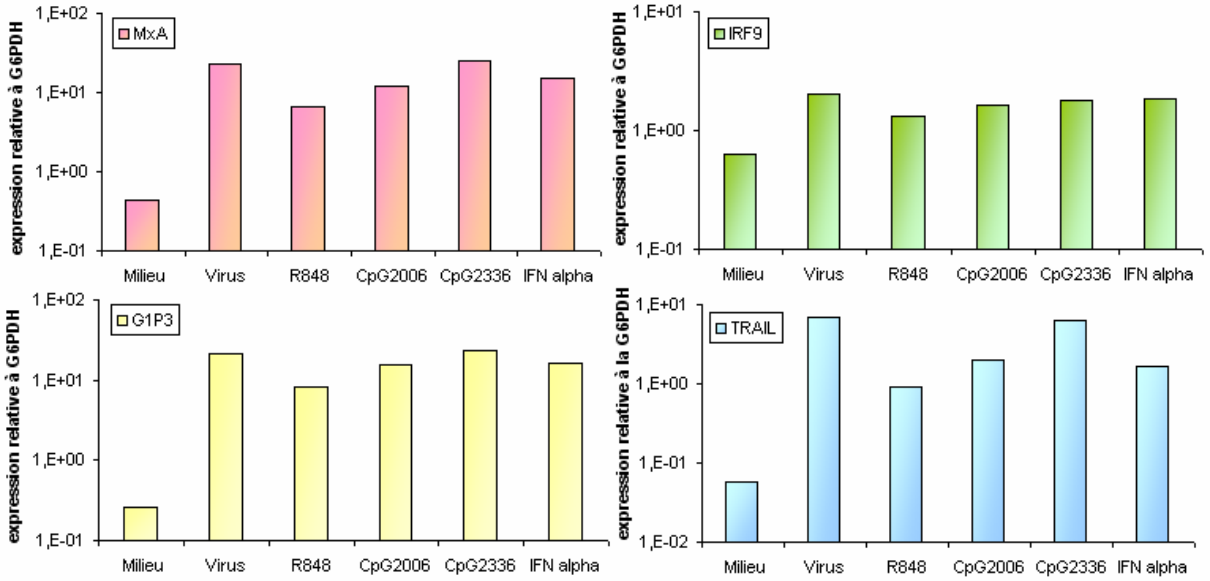


Figure R7. Expression des ARNm de MXA, G1P3, IRF9 et TRAIL après 18h d'activation des GEN2.2 avec le virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine), R848 (1µg/mL), CpG B (2006 ; 12,5 µg/mL), CpG A (2336 ; 12,5 µg/mL) ou l'IFN-α (5000 U/mL), mesurée par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés de façon relative à l'expression d'ARNm du gène de référence G6PDH.

6. Le R848, tout comme le virus, induit une phosphorylation de STAT1 et STAT2 dans les cellules GEN2.2

Pour tester ces hypothèses, nous avons tout d'abord décidé de restreindre l'analyse à la comparaison entre le virus de l'*influenza* et le R848. Nous avons examiné la phosphorylation de STAT1 et STAT2, des activateurs de transcription impliqués dans la voie de signalisation de l'IFN de type I, recrutés et phosphorylés par les kinases JAK1 et TYK2.

STAT1 et STAT2 sont bien phosphorylés sur leurs tyrosines dans les cellules GEN2.2, dès 30 min. d'activation par l'IFN-α (voir figure R8), confirmant leur rôle dans la voie de signalisation de l'IFN de type I. Comme attendu, STAT1 et STAT2 sont également phosphorylés dès 2h d'activation par le virus de l'*influenza* (avec un marquage plus faible pour STAT2) (voir figure R8). Mais 2h d'activation par R848 sont aussi capables d'induire la

phosphorylation de STAT1 et STAT2 dans les cellules GEN2.2 (voir figure R8). Ces résultats nous confortent dans notre hypothèse d'une implication d'éléments de la voie IFN de type I pour l'induction d'expression de TRAIL par R848, indépendamment des IFNα/β.

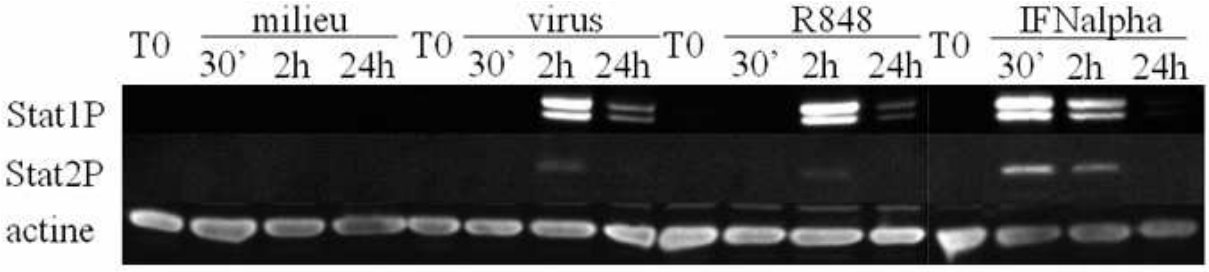


Figure R8. Mise en évidence par Western-Blot de la phosphorylation de STAT1 (pY701) et STAT2 (pY690) avant et après cinétiques d'activation des GEN2.2 par le virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine), R848 (1µg/mL) ou l'IFN-α (5000 U/mL). L'actine sert de contrôle de charge protéique.

7. Le virus de l'*influenza* et R848 sont tous deux internalisés dans des endosomes

Le virus de l'*influenza* activerait la PDC en se liant à son TLR7, chez la souris (Diebold et al. 2004), tout comme le R848. De la même manière, les CpG de type A et B sont tous deux des ligands du TLR9. Comment deux ligands d'un même TLR peuvent-ils aboutir à une signalisation différente pour induire la transcription des mêmes gènes (MXA, G1P3, IRF9 et TRAIL)? Le TLR7 est endosomal et la liaison de ses ligands se fait à l'intérieur de ces endosomes au pH acide. Nous avons donc tout d'abord vérifié que ces différents ligands de TLR nécessitaient bien d'être internalisés dans des endosomes pour induire la sécrétion d'IFN-α et/ou l'expression de TRAIL par les cellules GEN2.2. En effet, il est possible que

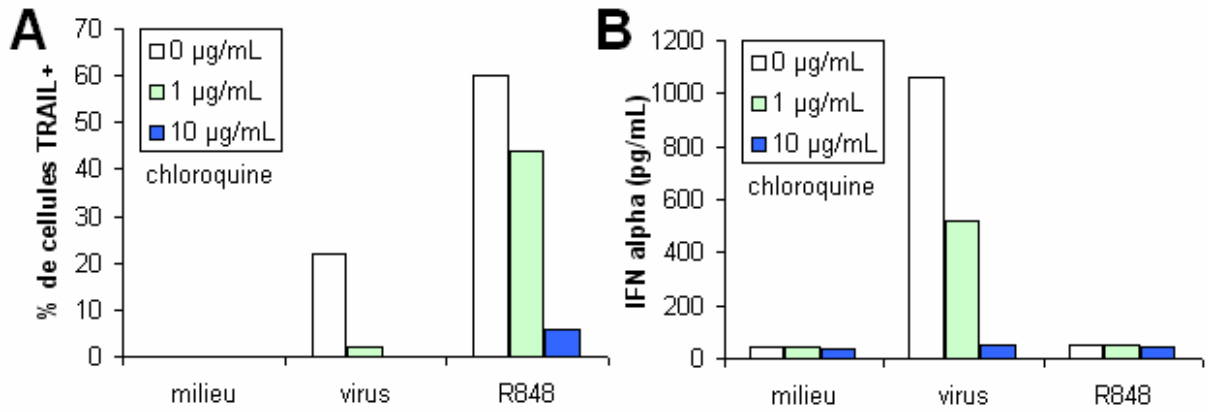


Figure R9. Rôle de l'acidification endosomale sur l'activation des GEN2.2 par les ligands des TLR. **A.** Inhibition de l'expression de TRAIL par la chloroquine sur des cellules GEN2.2 activées pendant 4h par le virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine) ou le R848 (1µg/mL). Les résultats sont exprimés en pourcentages de cellules positives pour TRAIL au cytomètre en flux après marquage avec un anticorps anti-TRAIL biotinylé et un anticorps secondaire streptavidine couplé au PE. **B.** Inhibition de la sécrétion d'IFN-α par la chloroquine sur des cellules GEN2.2 activées pendant 24h par le virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine) ou le R848 (1µg/mL). Le dosage est réalisé par ELISA.

des voies indépendantes des TLR soient activées, comme cela a été montré pour les CpG (Sanjuan et al. 2006), et permettent de recruter des molécules différentes que celles classiquement décrites en aval des TLR7 et 9.

La chloroquine est un inhibiteur de l'acidification endosomale connu pour bloquer l'activation médiée par TLR7. Nous l'avons utilisée sur les cellules GEN2.2 activées par le virus de l'*influenza* ou le R848 pour voir si la différence entre les deux ligands pouvaient provenir d'une reconnaissance initiale différente par la cellule. Ainsi, la sécrétion d'IFN-α et l'expression de TRAIL par les cellules activées après pré-incubation d'1h avec la chloroquine ont été analysées (voir figure R9). La sécrétion d'IFN-α induite par le virus de l'*influenza* est inhibée par la chloroquine (voir figure R9B), prouvant son efficacité. La reconnaissance de ce virus semble donc bien se faire dans les endosomes. En ce qui concerne l'induction d'expression de TRAIL par les GEN2.2, la chloroquine a un effet inhibiteur autant avec le virus qu'avec le R848 (voir figure R9A). Les deux ligands semblent donc être reconnus de la même manière dans les endosomes et leurs différences dans l'induction d'expression de TRAIL sur les GEN2.2 ne peuvent pas être expliquées par une différence dans le mode d'entrée dans les cellules. Des essais d'utilisation de siRNA ciblant TLR7 et TLR9 dans la lignée GEN2.2 sont en cours au laboratoire pour confirmer l'implication de ces récepteurs dans l'activation des cellules GEN2.2 par le virus et le R848.

8. Plusieurs voies de signalisation différentes peuvent être empruntées après la liaison aux TLR

Après liaison d'un ligand au TLR7, il est décrit le recrutement d'un complexe protéique contenant MyD88. Des Western-Blots et des RT-PCR ont été réalisés pour détecter la présence dans les GEN2.2 au repos des molécules MyD88, IRAK1, IRAK4 et TRAF6, présentes dans ce complexe. Ces quatre molécules ont été retrouvées (résultats non montrés). Plusieurs voies ont été décrites en aval de ce complexe : elles comprennent une voie IRF7 / IRF3 conduisant à la transcription d'IFN de type I, une voie IRF5, une voie p38 MAPK et une voie NF-κB conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires. Nous allons examiner l'implication de ces différentes voies dans l'activation de transcription du gène de TRAIL par le virus de l'*influenza* et R848.

8.1. La voie des IRF

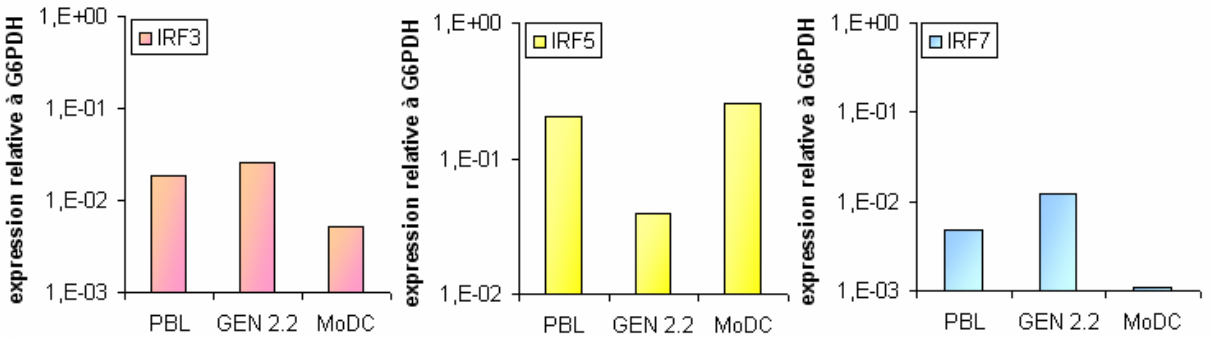


Figure R10. Expression des ARNm d'IRF3, 5 et 7 à l'état de repos dans les cellules de la lignée GEN2.2, des moDC et des PBL, mesurée par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés de façon relative à l'expression d'ARNm du gène de référence G6PDH.

Les GEN2.2 sont des PDC humaines, et celles-ci sont connues pour exprimer constitutivement l'IRF7. Cette expression constitutive pourrait éventuellement permettre l'expression des gènes "induits par la voie de signalisation de l'IFN de type I" sans recourir à la production d'IFN de type I. Pour y voir plus clair, nous avons analysé la présence d'ARNm des facteurs de transcription IRF3, 5 et 7 dans les GEN2.2 au repos, en comparaison avec d'autres types cellulaires (voir figure R10). Les résultats semblent indiquer une présence plutôt faible d'ARNm des IRF3, 5 et 7 dans les GEN2.2, avec une expression relative à la

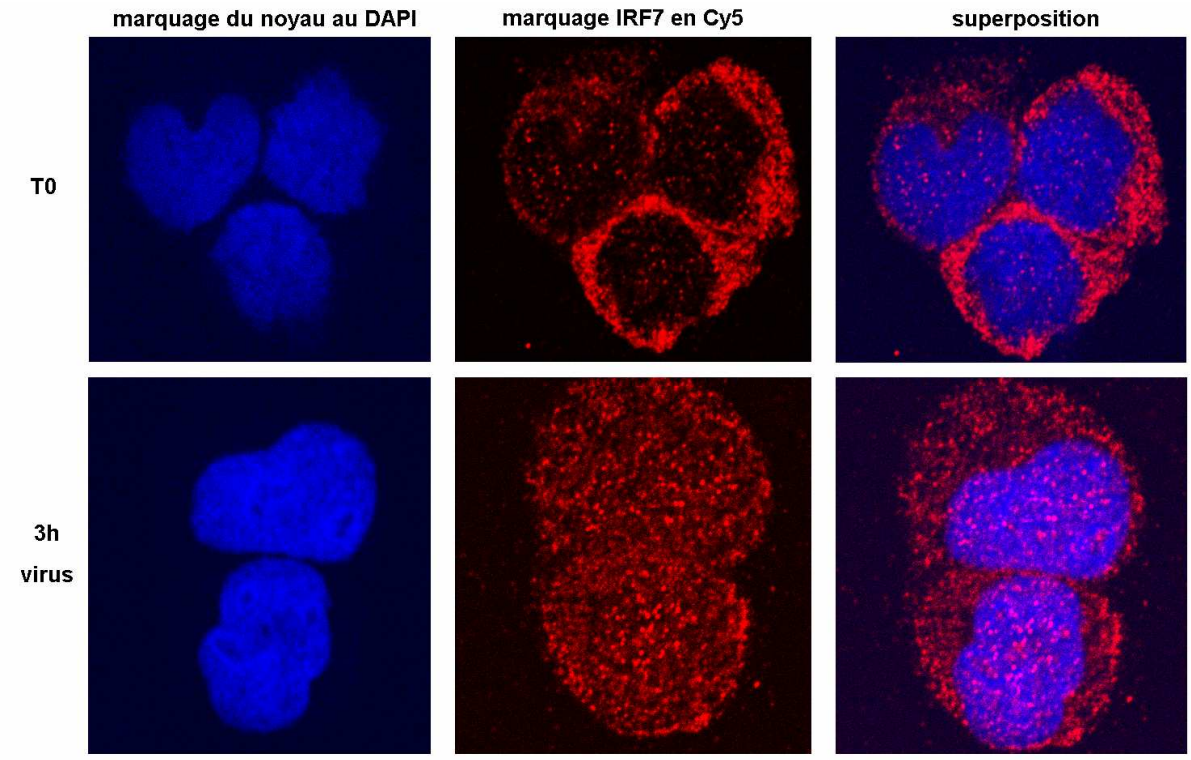


Figure R11. Visualisation de l'IRF7 dans les GEN2.2 en microscopie confocale. Les cellules ont été activées ou non pendant 3h par le virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine), puis fixées et perméabilisées. Un immunomarquage de l'IRF7 (cyanine 5, coloration rouge) et un marquage au DAPI (noyau, coloration bleue) ont ensuite été réalisés.

G6PDH d'environ 0,025, 0,039 et 0,012 respectivement (voir figure R10). Cependant, les ARNm d'IRF3 et IRF7, censés participer à l'induction de sécrétion d'IFN de type I, sont présents en plus grande quantité dans les cellules GEN2.2 que dans les PBL ou les MoDC, contrairement à l'ARNm d'IRF5, qui pourrait également jouer un rôle important dans la sécrétion d'IFN de type I par les cellules (Schoenemeyer et al. 2005) en plus de son induction de cytokines pro-inflammatoires (voir figure R10).

Par ailleurs, la translocation de l'IRF7 dans le noyau des cellules GEN2.2 activées par le virus de l'*influenza* a été suivie par microscopie confocale (voir figure R11). L'IRF7 est surtout présent dans le cytoplasme des cellules au repos, mais après 3h d'activation par le virus, il est également retrouvé dans le noyau des cellules (voir figure R11), suggérant son implication dans une des voies d'activation recrutées par le virus. Des expériences concernant l'activation par les autres ligands de TLR sont en cours.

Les gènes des IRF3, 5 et 7, impliqués dans l'induction d'expression d'IFN de type I, sont donc transcrits dans les cellules GEN2.2 au repos et pourraient ainsi intervenir dans les voies de signalisation induites par le virus et/ou le R848 pour mener à l'expression de TRAIL. L'IRF7 est clairement recruté dans le noyau des cellules GEN2.2 après activation par le virus. Les expériences à venir nous aideront à déterminer s'il est également recruté après activation par le R848 et si les autres IRF interviennent préférentiellement dans l'une ou l'autre voie de signalisation.

8.2. La voie de la p38 MAPK

Deux articles viennent éclairer d'un jour nouveau ce labyrinthe de voies croisées avec la description de la phosphorylation de STAT1 sur une sérine par la MAPK p38 après activation par l'IFN de type I dans des cellules HeLa (Goh et al. 1999) et après liaison de CpG DNA au TLR9, indépendemment de l'IFNαβ, dans des PDC humaines (Osawa et al. 2006).

Nous avons donc examiné la présence de MAPK p38 phosphorylée

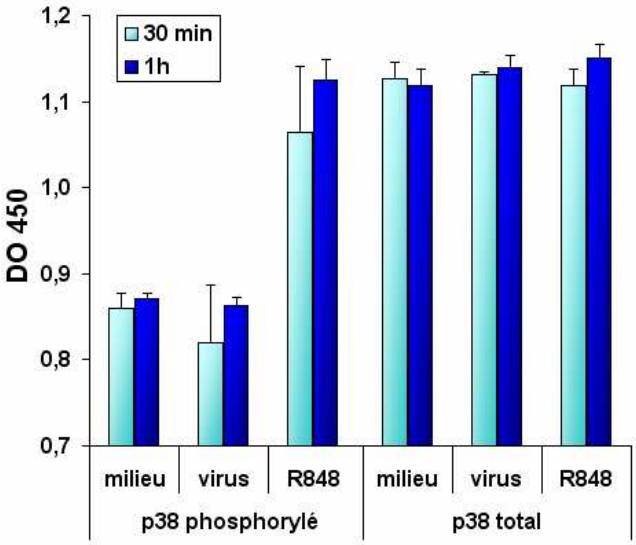


Figure R12. Dosage de la p38 MAPK phosphorylée et totale dans les cellules GEN2.2 activées pendant 30 min. ou 1h avec le virus de l'*influenza* (137 ng/mL d'hémaglutinine) ou R848 (1µg/mL) grâce au kit FACE p38 (Active Motif). Les résultats sont exprimés en absorbance à 450 nm et les expériences ont été réalisées en triplicats.

dans les GEN2.2 activées par le virus ou R848 (voir figure R12). La p38 totale est présente à des niveaux semblables dans les cellules GEN2.2 au repos ou quel que soit le ligand activateur. Après 30 min. ou 1h d'activation par le virus de l'*influenza* ou le CpG de type A, la p38 phosphorylée reste au même niveau que sans activation ; mais après activation par R848, son niveau est sensiblement augmenté (voir figure R12). La p38 MAPK serait donc phosphorylée exclusivement après activation par R848 et pourrait représenter un des éléments de la voie de signalisation induite spécifiquement par le R848 et menant à l'induction d'expression de TRAIL par les cellules GEN2.2 sans qu'il y ait une sécrétion d'IFN de type I comme pour le virus.

8.3. La voie du NF-κB

L'étude de Osawa et al. (Osawa et al. 2006) montre également que les PDC humaines exprimeraient constitutivement les sous-unités p65 et p50 activées de NF-κB et que celui-ci serait impliqué dans la phosphorylation de la MAPK p38.

Nous nous sommes donc demandés si les différentes molécules impliquées dans la voie du NF-κB étaient présentes dans les GEN2.2 au repos. Les western-blots réalisés montrent que c'est le cas pour IKKγ, IKKβ, IκBα, IκBε et la sous-unité p65 du NF-κB (voir figure R13). Nous nous sommes également intéressés aux différentes unités de NF-κB pouvant être transloquées (et donc activées) dans le noyau des GEN2.2 activées par le virus ou R848 en utilisant la méthode TransAM (Active Motif), mais les résultats sont trop préliminaires pour être montrés. Quelques différences sont constatées dans la composition des sous-unités présentes dans le noyau après activation par le virus et R848, mais l'expérience nécessite d'être renouvelée et l'analyse approfondie pour pouvoir tirer des conclusions sur le rôle éventuel de ces sous-unités de NF-κB dans la phosphorylation de la MAPK p38.

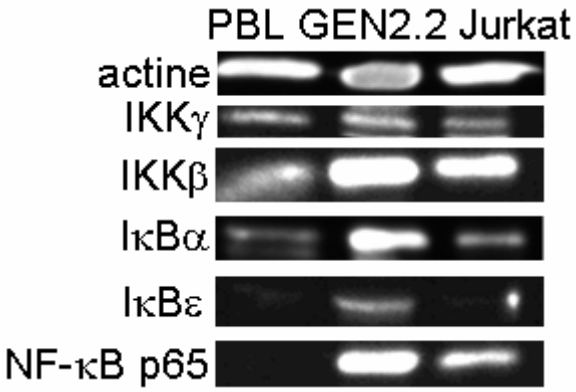


Figure R13. Détection de différentes molécules impliquées dans l'activation du NF-κB par Western-Blot dans les cellules GEN2.2, des PBL et la lignée de cellules Jurkat.

Discussion

Thérapie des leucémies à PDC

La description des leucémies à PDC a donné lieu à la mise en place d'un groupe de travail ciblé sur l'étude de cette pathologie piloté par le Dr F. Garnache-Ottou de l'EFS de Besançon. En effet, après la caractérisation initiale de cette entité, il s'est avéré que certaines LPDC pouvaient présenter des phénotypes variants. Nous avons vu que les LPDC étaient caractérisées par leur phénotype: $CD4^+$, $CD56^+$, $CD3^-$, $CD13^-$, $CD33^-$ et $CD19^-$. Des analyses complémentaires vérifiant l'expression de marqueurs plus spécifiques des PDC les montrent comme étant également HLA-DR^+, $CD123^{+fort}$, $CD116^{faible}$, $CD45RA^+$, BDCA-2^+ ou BDCA-4^+. Il a aussi été montré que les LPDC pouvaient exprimer la molécule CD33 (considérée généralement comme un marqueur myéloïde), tout comme les PDC primaires, jusqu'alors considérées dogmatiquement comme $CD33^-$ (Garnache-Ottou et al. 2005). De même, le CD56 pourrait dans certains cas être absent sur les LPDC, rendant très délicat le diagnostic de LPDC dont l'alerte principale est la co-expression de CD4 et CD56 (Petrella et al. 1999). Pour confirmer l'identité des cellules en cas de phénotype initial atypique, l'analyse de l'expression de BDCA2 et CD123 a été récemment proposée, ainsi qu'une approche multidisciplinaire, faisant intervenir des critères cytogénétiques, cytochimiques, et de biologie moléculaire, voire des analyses fonctionnelles en vue d'améliorer le diagnostic des leucémies à PDC (Garnache-Ottou et al. 2007).

Si reconnaître une LPDC ne représente plus un défi pour les acteurs du diagnostic des hémopathies, trouver quel sera le meilleur traitement à utiliser représente un enjeu majeur dans ces pathologies. En effet, le développement clinique des leucémies à PDC est toujours agressif, conduisant à la mort en trois ans malgré une réponse initiale à la chimiothérapie (Jacob et al. 2003). Dans une série de 23 patients rapportée en 2002, seuls deux patients allo-transplantés ont survécu à long terme (Feuillard et al. 2002). Etant donné les échecs des thérapies conventionnelles, la nécessité d'alternatives dans le traitement des leucémies à PDC est devenue évidente, en particulier pour les patients qui ne pourraient pas bénéficier d'une allogreffe. Les résultats de l'article 1 suggèrent la possibilité d'une thérapie de ces leucémies à PDC, impliquant l'utilisation d'une molécule TRAIL recombinante soluble. En effet, les cellules tumorales qui expriment DR5, au contraire des PDC primaires, pourraient être détruites par la voie TRAIL. La dérégulation de la mort par apoptose étant impliquée dans de nombreuses maladies, plusieurs thérapies basées sur des molécules pro- ou anti-apoptotiques ont débuté avec des phase pré-clinique ou clinique, dont certaines utilisent les récepteurs de TRAIL comme cibles thérapeutiques (Fischer and Schulze-Osthoff 2005). Des molécules

capables de cibler spécifiquement cette voie d'apoptose sont en cours d'essai clinique, et le site clinicaltrials.gov qui recense les essais thérapeutiques en cours aux Etats-Unis fait état d'essais dans des hémopathies ou des tumeurs solides avec des anticorps monoclonaux humanisés ciblant DR4 (mapatumumab), DR5 (lexatumumab ou CS-1008) ou une molécule TRAIL recombinante soluble. Il est intéressant de relever que malgré les craintes qui avaient été exprimées (Jo et al. 2000), le HGS-ETR1, anticorps monoclonal agoniste de DR4 n'a pas présenté de toxicité hépatique ou hématologique aux doses testées.

Ces approches thérapeutiques s'inscrivent dans le mouvement massif du développement des anticorps dans le traitement des cancers (Adams and Weiner 2005). L'utilisation d'un anticorps capable d'induire l'apoptose des cellules leucémiques *in vivo* sans induire de toxicité conséquente des cellules normales avoisinantes aurait un bénéfice thérapeutique certain dans les LPDC. De plus, il est tout à fait envisageable qu'en plus d'un effet cytotoxique antitumoral direct, l'induction de la mort des cellules tumorales par un tel anticorps pourrait avoir des effets immunostimulants. En effet, comme notre équipe l'a proposé lors de l'étude du mode d'action du CD20 (Manches et al. 2003), l'implication de la lyse médiée par le complément, pourrait créer un environnement favorable à la mise en place d'une réponse antitumorale, avec recrutement d'autres cellules du système immunitaire comme des DC myéloïdes capables alors de capter les corps apoptotiques issus des cellules tumorales ciblées par l'anticorps, et d'activer une réponse T antitumorale. L'utilisation d'un anticorps anti-DR5 ou d'une molécule TRAIL soluble pourrait donc être une piste intéressante dans le traitement des LPDC, mais seuls des essais thérapeutiques pourront vérifier la validité de cette approche. En effet, au cours de notre étude, nous n'avons pu qu'approcher indirectement l'induction de l'apoptose des cellules tumorales primaires car les LPDC se sont révélées très fragiles, et la mortalité spontanée de ces cellules ex-vivo ne nous a pas permis d'analyser leur sensibilité à TRAIL.

La piste de l'utilisation d'agents inducteurs d'apoptose est une piste intéressante, cependant, les résultats cliniques obtenus avec de tels agents ne conduisent souvent qu'à des rémissions sans guérisons, et il semble que si le système immunitaire pouvait être activé pour développer une réponse antitumorale, le pronostic des cancers pourrait être largement amélioré. Dans ce contexte, il est intéressant de souligner que de nouveaux anticorps thérapeutiques arrivent sur le marché visant à réactiver de telles réponses immunes, ou à inhiber les éléments du microenvironnement tumoral qui empêchent leur mise en place (Melero et al. 2007).

Dans l’optique d’activer une réponse dirigée contre les cellules leucémiques, il pourrait aussi être envisagé d’induire une différenciation des cellules leucémiques. Ces cellules, en effet comme leurs équivalents normaux, expriment les TLR7 et TLR9, et l’utilisation d’agonistes de ces récepteurs pourrait induire la maturation des cellules leucémiques. De tels agonistes sont actuellement développés par de grands groupes pharmaceutiques, et l’Aldara, dont le principe actif est l’Imiquimod, ligand du TLR7 a une AMM pour le traitement des carcinomes basocellulaires. Ainsi, l’application d’Aldara sur les lésions cutanées qui sont fréquentes dans les LPDC semble une approche thérapeutique novatrice. L’induction de la différenciation des cellules tumorales pourrait remplir deux objectifs : les cellules matures perdent souvent leur potentiel proliférant (c’est le principe des traitements à base d’acide rétinoïque), et de plus, elles pourraient acquérir une immunogénicité les rendant capables d’activer une réponse antitumorale. Le fait que les LPDC puissent sécréter de l’IFN-α (Chaperot et al. 2004) au cours de cette activation pourrait rendre encore plus efficace cette approche.

Les LPDC, au final, possèdent deux casquettes, qui permettent d'envisager leur traitement par les deux approches citées précédemment. D'un côté ce sont des cellules tumorales, ce qui explique leur expression de DR5 en surface et ainsi leur sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL, et de l'autre côté, il s'agit de cellules immunitaires, capables d'induire des réponses immunes importantes après activation, surtout dans une optique anti-virale.

Voies de signalisation utilisées par les différents ligands de TLR dans les PDC GEN2.2 pour induire l'expression de TRAIL

L'histoire des TLR est très récente, en particulier en ce qui concerne les TLR endosomaux que sont les TLR7, 8 et 9. En effet, l'identification des ssRNA en tant que ligands physiologiques de TLR7/8 a été faite en 2004 (Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004; Lund et al. 2004) et celle des motifs CpG hypométhylés comme ligands de TLR9 date de 2001 (Bauer et al. 2001). Cependant, ces TLR sont la cible de nouvelles classes thérapeutiques d'immunomodulateurs dont les champs d'application vont de la thérapie anticancéreuse au traitement des infections virales, ce qui rend cruciale la description de leur mode d'action. La lignée GEN2.2 exprime les TLR7 et 9, ce qui en fait un outil tout à fait intéressant pour étudier les conséquences de l'activation de ces récepteurs.

Les données de la littérature sont relativement pauvres concernant les voies de signalisation des TLR7 et 9 chez l'homme. En effet, la plupart des données disponibles ont été obtenues dans des cellules murines, qui se prêtent facilement à l'analyse des voies de transduction du signal, en particulier avec l'utilisation de souris KO. Il n'est cependant pas absolument certain que les résultats décrits chez la souris puissent être étendus à l'homme dans ce domaine particulier des TLR. En effet, par exemple, les ARN simples brins ssRNA40 ou sspolyU seront des ligands du TLR8 chez l'homme, mais du TLR7 chez la souris (Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004). De plus, chez la souris et chez l'homme, les profils d'expression de ces TLR sont différents. Par exemple, les MDC murines expriment TLR9, alors que les MDC humaines en sont dépourvues.

Les synthèses des données disponibles montrent que la liaison des TLR7 ou 9 à leur ligand induit le recrutement d'un complexe protéique comprenant MyD88, IRAK1 et 4, ainsi que TRAF6. Ensuite, deux voies principales peuvent être activées : i) une voie impliquant la phosphorylation et la dimérisation de l'IRF7 qui est ensuite transloqué dans le noyau où il va se lier à des éléments de réponse ISRE pour activer la transcription de gènes IFN de type I, et ii) une voie impliquant les facteurs de transcription NF-κB, aboutissant à la synthèse de protéines de type inflammatoires. L'orientation vers l'une ou l'autre de ces deux voies selon le ligand semble dépendre de la structure du ligand et de sa stabilité dans les endosomes. Ce mécanisme a été partiellement décrit en 2005 en ce qui concerne l'activation du TLR9. Les auteurs suggèrent que selon leur nature de type A ou B, les CpG ne se lieront pas au TLR9 dans les mêmes compartiments de la voie endosomale, ou ne présenteront pas la même stabilité face aux conditions de pH de ces compartiments, avec pour conséquence que les CpG

A pourront induire l'activation d'IRF7 par TLR9, alors que les CpG B ne le pourront pas (Honda et al. 2005; Kerkmann et al. 2005) mais activeront seulement l'IRF5, essentiel pour les réponses pro-inflammatoires (Takaoka et al. 2005). Concernant l'activation des cellules par la voie TLR7, les données de la littérature sont là encore assez rares, mais il semble que de la même manière, la structure du ligand considéré (ssRNA, virus enveloppé) influence l'orientation vers la production d'IFN de type I ou de cytokines inflammatoires (Wang et al. 2006).

En ce qui concerne les résultats présentés dans les parties 2 et 3, nous montrons, en accord avec les données de la littérature, que les cellules GEN2.2 sécrètent de l'IFN-α en réponse à une activation par CpG A ou virus *influenza*, alors que CpG B ou R848 induiront plutôt des cytokines inflammatoires. La difficulté supplémentaire concernant le virus de l'*influenza* est qu'il est connu pour pouvoir activer d'autres voies que la voie TLR, en particulier en agissant via Mda5, RIG1 ou la PKR. Nous avons considéré dans ce travail que le virus de l'*influenza* activait principalement la voie du TLR7, en s'appuyant sur les données décrites chez la souris (Diebold et al. 2004; Lund et al. 2004), mais chez l'homme, les preuves de cette liaison sont plus rares (Wang et al. 2006). Nos résultats montrant l'inhibition de l'activation induite par le virus par de la chloroquine confirme l'implication d'une voie endosomale, comme attendu dans la voie TLR7, et l'absence d'inhibition par l'aminopurine (résultats non montrés) confirme que la PKR n'est pas impliquée.

En analysant les données de l'induction de TRAIL sur les PDC, nous avons remarqué que cette molécule était induite quel que soit le ligand de TLR7 ou 9 utilisé, avec une détection de la molécule en surface dès 4h d'activation, c'est-à-dire avec une cinétique d'expression différente de celle de l'IFN-α qui n'apparaissait que plus tardivement, et seulement lors des activations avec virus ou CpG A. Nous avons tout d'abord pris le temps de confirmer que les IFN de type I n'étaient réellement pas impliqués dans l'induction de TRAIL par R848 ou CpG B en recherchant exhaustivement par RT-PCR quantitative les ARNm des différents IFN de type I, et en utilisant des expériences d'inhibition. Ces expériences montrent clairement que TRAIL est induit dans les GEN2.2 activées par R848 ou CpG B en l'absence d'IFN de type I. En revanche, lors de l'activation par le virus ou par CpG A, l'INF-α sécrété participe à l'expression de TRAIL, mais nos résultats n'excluent pas qu'une part de l'expression de TRAIL soit induite indépendamment de la boucle interféron au cours de ces activations ; en particulier car l'inhibition avec les anticorps anti-IFN-α et anti-IFN-β n'est pas complète. Une autre observation que nous pouvons faire concerne la corrélation entre la

détection de la sécrétion d'IFN-α et le maintien de l'expression de TRAIL au cours du temps. On pourrait ainsi imaginer que l'IFN-α joue un rôle dans ce maintien d'expression de TRAIL à la surface des GEN2.2, peut-être *via* une boucle d'amplification.

Nous avons aussi remarqué que la transcription de gènes connus pour être activés en présence d'IFN de type I (IRF9, MXA, G1P3) était induite selon le même schéma que TRAIL. Ces résultats nous ont amenés à analyser plus précisément quelles étaient les voies de signalisation impliquées dans l'activation par ces différents ligands. L'induction de transcription des gènes de TRAIL, MXA, IRF9 ou G1P3 pourrait impliquer plusieurs facteurs qui sont : STAT1, la p38 MAPK, le NF-κB et les IRF3, 5 et 7. En effet, si on regarde les promoteurs de ces gènes, on retrouve les sites de liaison de ces différentes molécules. Le promoteur de MXA, par exemple, contient un site ISRE et un site de liaison au NF-κB (Francois et al. 2005).

Avec des approches d'immunomarquage et une étude des molécules de la voie de signalisation du récepteur à l'IFN-α en western-blot d'extraits Laëmlli grâce à une collaboration avec F. Gouilleux (EMI-0351, Amiens), nous avons pu montrer que STAT1 était phosphorylé au cours de l'activation par ces différents ligands de TLR. STAT1 est une protéine clé dans l'activation de transcription des gènes sensibles à l'IFN (pour revue, voir (Kim and Lee 2007)), et sa phosphorylation sur la tyrosine 701 dans nos expériences pourrait suggérer son implication dans l'activation de l'expression de TRAIL. La question se pose alors de savoir quelles sont les molécules permettant de faire le lien entre les TLR7 et 9, et la phosphorylation de STAT1. Afin d'aborder cette question, nous mettons en place un test de mesure de l'activation de STAT1 par la méthode FACE (Active Motif), qui nous permettra, en utilisant différents inhibiteurs, de définir quelles kinases pourraient être impliquées (ERK, PI3K, P38 MAPK).

Il est décrit que STAT1 requiert d'être phosphorylé à la fois sur sa tyrosine 701 et sa sérine 727 pour une activation totale. Or, la p38 MAPK, impliquée dans la voie de signalisation de l'IFN de type I et II (pour revue, voir (Platanias 2003)), joue un rôle clé dans la phosphorylation sur une sérine de STAT1 et les changements transcriptionnels induits par les deux types d'IFN (Goh et al. 1999). Nous avons donc analysé l'activation de la P38 MAPK après activation par les différents ligands de TLR7. Nos résultats préliminaires montrent que le R848 active cette kinase, alors que le virus n'en est pas capable. Ainsi, dans le cas de l'activation par R848, la MAPK p38 [pTpY180/182] pourrait être impliquée et serait ensuite capable de phosphoryler STAT1 sur sa sérine [pS727]. La façon dont la p38 MAPK

est recrutée après activation par R848 pourrait impliquer la petite protéine G Rac1, qui fonctionne comme effecteur en amont de manière tyrosine kinase dépendante (Uddin et al. 2000; Mayer et al. 2001; Platanias 2003) (voir figure D1). Rac1 serait ensuite capable d'activer les MAP kinase kinase (MKK) 3 et 6 (Li et al. 2005).

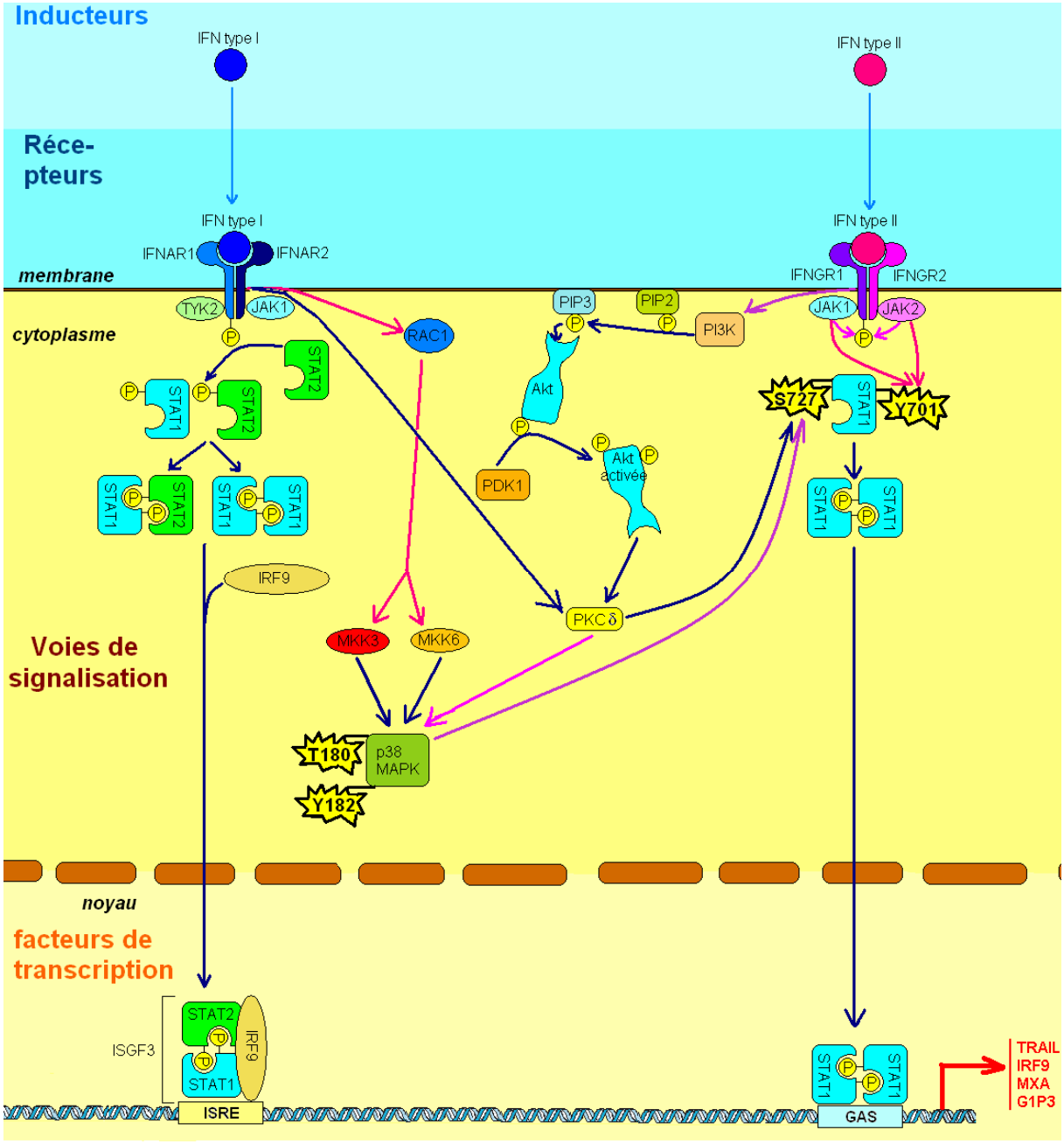


Figure D1. Schéma récapitulif des molécules potentiellement impliquées dans la phosphorylation de STAT1 après activation des récepteurs de l'IFN de type I et de l'IFN de type II. La phosphorylation de STAT1 sur sa sérine 727 et sa tyrosine 701 n'est représentée que dans la signalisation de l'IFN de type II, mais elle se produit de la même manière en aval du récepteur de l'IFN de type I, à la seule différence des kinases phosphorylant la tyrosine 701 (JAK1 et TYK2 à la place de JAK1 et JAK2).

Cependant, la p38 MAPK ne semble pas être la seule kinase capable de phosphoryler STAT1 sur sa sérine 727. En effet, l'utilisation de cellules provenant d'embryons de souris KO pour le

gène de l'isoforme p38α n'a pas d'impact sur la formation du complexe de liaison nucléaire ISGF3 (Li et al. 2004). Il a ainsi été montré qu'une autre protéine, la PKC-δ fonctionnait comme sérine kinase pour STAT1 et qu'elle constituait par ailleurs un régulateur en amont pour la p38 MAPK (Uddin et al. 2002). Cette protéine kinase pourrait elle-même être activée par la voie PI3K/Akt recrutée après liaison d'IFN de type II à son récepteur (Nguyen et al. 2001; Deb et al. 2003). D'autres molécules en amont devraient être capables de phosphoryler STAT1 sur sa tyrosine [pY701]. Les tyrosine kinases de la famille JAK recrutées aux récepteurs des IFN de type I et II sont les candidats les plus probables (Nguyen et al. 2001) (voir figure D1). Nous avons donc utilisé un inhibiteur de la kinase JAK2 (Tyrphostin B42 ; AG490; Calbiochem) pour vérifier son implication dans les voies de signalisation menant à l'induction d'expression de TRAIL par les cellules GEN2.2 après activation par le virus de l'*influenza*, le R848 et l'IFN de type I (résultats non montrés). Dans tous les cas, nous avons observé une inhibition de l'expression de TRAIL, suggérant un rôle de cette kinase dans la voie commune d'activation de transcription du gène de TRAIL après liaison du virus ou du R848 à leur récepteur.

Ainsi, nous arrivons à l'hypothèse que l'activation de la synthèse des IFN de type I n'a lieu que lorsque TLR7 ou TLR9 vont recruter IRF7. En revanche, en ce qui concerne l'activation de la transcription des gènes de TRAIL, MXA, IRF9 et G1P3, les outils que nous avons utilisés et les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas encore de conclure quant à la séquence précise des acteurs impliqués. Les travaux en cours vont permettre d'analyser les différents acteurs de la voie NF-κB, qui pourraient être impliqués dans cette signalisation, à la fois avec une approche d'immunofluorescence pour mettre en évidence les translocations de ces différents facteurs de transcription, et par une approche développée par Active Motif, permettant de détecter l'activation de ces facteurs de transcription. De plus, en collaboration avec A. Dupuis, appartenant à l'équipe "Etude Dynamique des Protéomes" dirigée par J. Garin au CEA de Grenoble, nous mettons en place un programme d'étude du phosphoprotéome des cellules GEN2.2 activées. Cette analyse devrait nous permettre de définir quelles sont les protéines phosphorylées précocement lors d'une activation par différents ligands de TLR7 ou TLR9. Parallèlement, des approches de transfection de la lignée par des shRNA sont aussi prévues, afin d'éteindre spécifiquement l'expression des acteurs potentiels de ces différentes voies de signalisation.

Ces nouvelles méthodes d'étude devraient nous permettre d'y voir plus clair dans le réseau complexe de phosphorylations et recrutement divers des protéines mises en jeu lors de

l'activation d'une PDC par un ligand du TLR7. Les résultats obtenus dans notre modèle pourront ensuite facilement être vérifiés pour le cas des différences de réponse qu'induisent les CpG de type A et B.

Rôle des PDC dans l'immunité anti-tumorale

Le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le fonctionnement du système immunitaire est encore mal connu, mais leur position à la frontière des réponses innées et acquises les désigne comme des acteurs clé de l'immunité (Colonna et al. 2004; Liu 2005). Les données récentes suggèrent qu'elles ont un rôle à jouer dans l'immunité antitumorale (Mohty et al. 2004). En particulier, leurs capacités de sécrétion d'INF de type I et d'activation des lymphocytes T cytotoxiques pourraient être exploitées en immunologie antitumorale. Alors qu'à l'heure actuelle, des patients atteints de diverses pathologies sont traités dans des essais de phase I/II avec des cellules dendritiques d'origine myéloïde, il pourrait être intéressant de préciser le rôle exact des cellules dendritiques d'origine lymphoïde dans les mécanismes de défense de notre organisme et dans la thérapie cellulaire du cancer.

L'obstacle majeur de l'étude de la fonctionnalité des PDC chez l'homme réside dans leur faible abondance et dans l'incapacité de les produire *in vitro* en quantité suffisante. La disponibilité d'une lignée humaine de cellules dendritiques plasmacytoïdes développée et brevetée dans le laboratoire (lignée GEN2.2) représente dans ce contexte un outil inestimable pour étudier les fonctions des PDC (Chaperot and Plumas 2002). A partir de cette lignée, un réseau collaboratif a été créé, dont le but est d'étudier l'ensemble des propriétés immunologiques de ces cellules. Ce réseau s'appuie sur deux projets soutenus par l'institut national du cancer (INCA); l'un coordonné par J. Plumas, "PDC et Cancers", financé en 2004, et l'autre coordonné par C. Caux (U590) "Apoptose et immunité dans les cancers" financé en 2005.

Plusieurs travaux dans le cancer du sein et de l'ovaire suggèrent que la présence de PDC au sein de la tumeur est associée à la progression tumorale (Zou et al. 2001; Treilleux et al. 2004). Par ailleurs d'autres travaux mettent en évidence la présence de PDC immatures dans diverses tumeurs (par exemple, dans le carcinome de la tête et du cou (Hartmann et al. 2003) ou le cancer du poumon (Perrot et al. 2007)) sans que l'on connaisse vraiment la raison de leur localisation et leur rôle par rapport au développement tumoral. Le micro-environnement tumoral pourrait contenir des facteurs capables d'inhiber la maturation des PDC, ou d'empêcher leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires, bloquant ainsi toute possibilité d'induction d'une réponse anti-tumorale efficace. Ainsi, en activant les PDC de manière adéquate, il serait donc peut-être possible de rétablir une réponse immune contre la tumeur, orchestrée par les PDC. Chez la souris (Palamara et al. 2004) et chez l'homme

(Geisse et al. 2004; Urosevic et al. 2005), le recrutement et l'activation des PDC par application locale d'un ligand de TLR7 étaient fortement associés à la régression tumorale. Par ailleurs, l'injection de CpG, ligand du TLR9 exprimé par les PDC chez la souris a un effet adjuvant antitumoral majeur(Vicari et al. 2002; Furumoto et al. 2004). Ainsi l'activation des PDC par des ligands des TLR7 et TLR9, pourrait être exploitée dans la mise en place d'une immunothérapie antitumorale.

Cette association entre recrutement et activation des PDC d'une part et régression tumorale d'autre part laisse fortement à penser que les PDC pourraient jouer un rôle direct à la fois en produisant des facteurs antitumoraux comme les interférons de type I mais aussi en acquérant directement une activité antitumorale. Nous montrons en effet, que les PDC activées par le virus de l'influenza entraîne une expression fonctionnelle rapide et forte de TRAIL, à la fois sur les cellules de notre lignée et sur les PDC normales. Elles pourraient donc jouer un rôle important dans les phases précoces des infections virales, en exerçant des fonctions cytotoxiques leur permettant de détruire les cellules infectées. D'autre part, nous montrons que les ligands des TLR-7 et TLR-9 sont aussi capables aussi de faire exprimer TRAIL par les PDC. Cette expression de TRAIL permet aux PDC de devenir cytotoxiques et de tuer des cellules tumorales dérivées du cancer du poumon et de mélanome. Ainsi on peut rapprocher l'efficacité de l'Aldara, formule thérapeutique d'un ligand de TLR7, dans les carcinomes basocellulaires et le recrutement et l'activation des PDC au niveau tumoral avec l'expression de TRAIL sur ces cellules après activation. Il serait vraiment intéressant de pouvoir étudier plus finement l'expression de TRAIL in situ sur les biopsies de peau des patients en cours de traitement afin de confirmer l'hypothèse de l'implication de l'expression de ce ligand de mort par les PDC dans l'éradication tumorale. Il faut certainement ne pas négliger le rôle que pourrait jouer l'interféron de type I produit par les PDC activées sur l'augmentation de la sensibilité à TRAIL des cellules tumorales comme nous l'avons vu sur les cellules de mélanomes dans notre travail.

De par leur capacité de production énorme d'interféron de type I, on imagine très clairement le rôle positif que peuvent jouer les PDC dans l'immunité antivirale. En revanche, leur implication dans le développement tumoral est plus difficile à comprendre. Il existe certainement une variabilité dans leur fonction dépendante de l'origine et de la localisation tumorales. Cependant, les expériences animales et le retour de certains essais cliniques laissent à penser que, convenablement activées, ces cellules pourraient être à l'origine de régressions tumorales d'une part par une action directe en produisant des facteurs antitumoraux et en acquérant des fonctions cytotoxiques, d'autre part indirectement en

mobilisant les autres acteurs de la réponse innée et en les activant ainsi que secondairement en stimulant les acteurs de la réponse immune adaptative tout en y participant. Les PDC apparaissent ainsi représenter une cible de choix pour de nouvelles approches thérapeutiques.

Références bibliographiques

References

Abbott, D. W., A. Wilkins, J. M. Asara and L. C. Cantley (2004). "The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO." Curr Biol **14**(24): 2217-27.

Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang and C. W. Akey (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." Mol Cell **9**(2): 423-32.

Adams, G. P. and L. M. Weiner (2005). "Monoclonal antibody therapy of cancer." Nat Biotechnol **23**(9): 1147-57.

Agarwal, C., T. Efimova, J. F. Welter, J. F. Crish and R. L. Eckert (1999). "CCAAT/enhancer-binding proteins. A role in regulation of human involucrin promoter response to phorbol ester." J Biol Chem **274**(10): 6190-4.

Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas and H. Wagner (2002). "Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments." Eur J Immunol **32**(7): 1958-68.

Akira, S., K. Takeda and T. Kaisho (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Aksoy, E., W. Vanden Berghe, S. Detienne, Z. Amraoui, K. A. Fitzgerald, G. Haegeman, M. Goldman and F. Willems (2005). "Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF-kappa B activation and IFN-beta synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4." Eur J Immunol **35**(7): 2200-9.

Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein and N. Bhardwaj (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **188**(7): 1359-68.

Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.

Almasan, A. and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy." Cytokine Growth Factor Rev **14**(3-4): 337-48.

Altucci, L. and H. Gronemeyer (2004). "Retinoids and TRAIL: two cooperating actors to fight against cancer." Vitam Horm **67**: 319-45.

Altucci, L., A. Rossin, W. Raffelsberger, A. Reitmair, C. Chomienne and H. Gronemeyer (2001). "Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL." Nat Med **7**(6): 680-6.

Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-30.

Ashkenazi, A., R. C. Pai, S. Fong, S. Leung, D. A. Lawrence, S. A. Marsters, C. Blackie, L. Chang, A. E. McMurtrey, A. Hebert, L. DeForge, I. L. Koumenis, D. Lewis, L. Harris, J. Bussiere, H. Koeppen, Z. Shahrokh and R. H. Schwall (1999). "Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand." J Clin Invest **104**(2): 155-62.

Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere and G. Trinchieri (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." Nat Immunol **2**(12): 1144-50.

Asselin-Paturel, C. and G. Trinchieri (2005). "Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond." J Exp Med **202**(4): 461-5.

Babiuk, S., N. Mookherjee, R. Pontarollo, P. Griebel, S. van Drunen Littel-van den Hurk, R. Hecker and L. Babiuk (2004). "TLR9-/- and TLR9+/+ mice display similar immune responses to a DNA vaccine." Immunology **113**(1): 114-20.

Baechler, E. C., F. M. Batliwalla, G. Karypis, P. M. Gaffney, W. A. Ortmann, K. J. Espe, K. B. Shark, W. J. Grande, K. M. Hughes, V. Kapur, P. K. Gregersen and T. W. Behrens (2003). "Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2610-5.

Baetu, T. M. and J. Hiscott (2002). "On the TRAIL to apoptosis." Cytokine Growth Factor Rev **13**(3): 199-207.

Balachandran, S., P. C. Roberts, L. E. Brown, H. Truong, A. K. Pattnaik, D. R. Archer and G. N. Barber (2000). "Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection." Immunity **13**(1): 129-41.

Ballas, Z. K., A. M. Krieg, T. Warren, W. Rasmussen, H. L. Davis, M. Waldschmidt and G. J. Weiner (2001). "Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs." J Immunol **167**(9): 4878-86.

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

Banchereau, J., B. Pulendran, R. Steinman and K. Palucka (2000). "Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries?" J Exp Med **192**(12): F39-44.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.

Barchet, W., M. Cella, B. Odermatt, C. Asselin-Paturel, M. Colonna and U. Kalinke (2002). "Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo." J Exp Med **195**(4): 507-16.

Barnhart, B. C., E. C. Alappat and M. E. Peter (2003). "The CD95 type I/type II model." Semin Immunol **15**(3): 185-93.

Baron, S. and F. Dianzani (1994). "The interferons: a biological system with therapeutic potential in viral infections." Antiviral Res **24**(2-3): 97-110.

Barton, G. M., J. C. Kagan and R. Medzhitov (2006). "Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA." Nat Immunol **7**(1): 49-56.

Bauer, M., V. Redecke, J. W. Ellwart, B. Scherer, J. P. Kremer, H. Wagner and G. B. Lipford (2001). "Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells." J Immunol **166**(8): 5000-7.

Bauer, S., C. J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner and G. B. Lipford (2001). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9237-42.

Bekeredjian-Ding, I. B., M. Wagner, V. Hornung, T. Giese, M. Schnurr, S. Endres and G. Hartmann (2005). "Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN." J Immunol **174**(7): 4043-50.

Bendriss-Vermare, N., L. Chaperot, M. Peoc'h, B. Vanbervliet, M. C. Jacob, F. Briere, J. C. Bensa, C. Caux and J. Plumas (2004). "In situ leukemic plasmacytoid dendritic cells pattern of chemokine receptors expression and in vitro migratory response." Leukemia **18**(9): 1491-8.

Benedict, C. A., T. A. Banks and C. F. Ware (2003). "Death and survival: viral regulation of TNF signaling pathways." Curr Opin Immunol **15**(1): 59-65.

Benitez-Ribas, D., G. J. Adema, G. Winkels, I. S. Klasen, C. J. Punt, C. G. Figdor and I. J. de Vries (2006). "Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc gamma RII-mediated uptake." J Exp Med **203**(7): 1629-35.

Berent-Maoz, B., A. M. Piliponsky, I. Daigle, H. U. Simon and F. Levi-Schaffer (2006). "Human mast cells undergo TRAIL-induced apoptosis." J Immunol **176**(4): 2272-8.

Bergmann, M., A. Garcia-Sastre, E. Carnero, H. Pehamberger, K. Wolff, P. Palese and T. Muster (2000). "Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication." J Virol **74**(13): 6203-6.

Bin, L. H., L. G. Xu and H. B. Shu (2003). "TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling." J Biol Chem **278**(27): 24526-32.

Blanco, P., A. K. Palucka, M. Gill, V. Pascual and J. Banchereau (2001). "Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus." Science **294**(5546): 1540-3.

Blom, B., S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu (2000). "Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(12): 1785-96.

Bodmer, J. L., N. Holler, S. Reynard, P. Vinciguerra, P. Schneider, P. Juo, J. Blenis and J. Tschopp (2000). "TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8." Nat Cell Biol **2**(4): 241-3.

Bodmer, J. L., P. Meier, J. Tschopp and P. Schneider (2000). "Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL." J Biol Chem **275**(27): 20632-7.

Bong, A. B., B. Bonnekoh, I. Franke, M. P. Schon, J. Ulrich and H. Gollnick (2002). "Imiquimod, a topical immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma." Dermatology **205**(2): 135-8.

Bontkes, H. J., J. J. Ruizendaal, D. Kramer, C. J. Meijer and E. Hooijberg (2005). "Plasmacytoid dendritic cells are present in cervical carcinoma and become activated by human papillomavirus type 16 virus-like particles." Gynecol Oncol **96**(3): 897-901.

Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, M. Gilliet, C. Crain, G. Trinchieri, Y. J. Liu and A. O'Garra (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." J Exp Med **197**(1): 101-9.

Boyle, W. J., W. S. Simonet and D. L. Lacey (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature **423**(6937): 337-42.

Brawand, P., D. R. Fitzpatrick, B. W. Greenfield, K. Brasel, C. R. Maliszewski and T. De Smedt (2002). "Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs." J Immunol **169**(12): 6711-9.

Briere, F., N. Bendriss-Vermare, T. Delale, S. Burg, C. Corbet, M. C. Rissoan, L. Chaperot, J. Plumas, M. C. Jacob, G. Trinchieri and E. E. Bates (2002). "Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol **63**(12): 1081-93.

Burgdorf, S., V. Lukacs-Kornek and C. Kurts (2006). "The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation." J Immunol **176**(11): 6770-6.

Burns, T. F. and W. S. El-Deiry (2001). "Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach." J Biol Chem **276**(41): 37879-86.

Cao, W., D. B. Rosen, T. Ito, L. Bover, M. Bao, G. Watanabe, Z. Yao, L. Zhang, L. L. Lanier and Y. J. Liu (2006). "Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production." J Exp Med **203**(6): 1399-405.

Cario, E. (2003). "Toll-like receptors and intestinal defence: molecular basis and therapeutic implications." Expert Rev Mol Med **2003**: 1-15.

Carpentier, A. F., G. Auf and J. Y. Delattre (2003). "CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy : review of the literature and potential applications in malignant glioma." Front Biosci **8**: e115-27.

Carpentier, A. F., L. Chen, F. Maltonti and J. Y. Delattre (1999). "Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice." Cancer Res **59**(21): 5429-32.

Carpentier, A. F., J. Xie, K. Mokhtari and J. Y. Delattre (2000). "Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs." Clin Cancer Res **6**(6): 2469-73.

Carty, M., R. Goodbody, M. Schroder, J. Stack, P. N. Moynagh and A. G. Bowie (2006). "The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling." Nat Immunol **7**(10): 1074-81.

Cassatella, M. A. (2006). "On the production of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2L) by human neutrophils." J Leukoc Biol **79**(6): 1140-9.

Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt and J. Banchereau (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." J Exp Med **184**(2): 695-706.

Cella, M., F. Facchetti, A. Lanzavecchia and M. Colonna (2000). "Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization." Nat Immunol **1**(4): 305-10.

Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia and M. Colonna (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.

Cha, S. S., M. S. Kim, Y. H. Choi, B. J. Sung, N. K. Shin, H. C. Shin, Y. C. Sung and B. H. Oh (1999). "2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity." Immunity **11**(2): 253-61.

Chamaillard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez and N. Inohara (2003). "An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid." Nat Immunol **4**(7): 702-7.

Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui and M. J. Lenardo (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." Science **288**(5475): 2351-4.

Chaperot, L., N. Bendriss, O. Manches, R. Gressin, M. Maynadie, F. Trimoreau, H. Orfeuvre, B. Corront, J. Feuillard, J. J. Sotto, J. C. Bensa, F. Briere, J. Plumas and M. C. Jacob (2001). "Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells." Blood **97**(10): 3210-7.

Chaperot, L., I. Perrot, M. C. Jacob, D. Blanchard, V. Salaun, V. Deneys, S. Lebecque, F. Briere, J. C. Bensa and J. Plumas (2004). "Leukemic plasmacytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts." Eur J Immunol **34**(2): 418-26.

Chaperot, L. and J. Plumas (2002). Lignée de cellules dendritiques GEN2.2. France.

Chawla-Sarkar, M., D. W. Leaman and E. C. Borden (2001). "Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines." Clin Cancer Res **7**(6): 1821-31.

Chawla-Sarkar, M., D. W. Leaman, B. S. Jacobs and E. C. Borden (2002). "IFN-beta pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis." J Immunol **169**(2): 847-55.

Chawla-Sarkar, M., D. J. Lindner, Y. F. Liu, B. R. Williams, G. C. Sen, R. H. Silverman and E. C. Borden (2003). "Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis." Apoptosis **8**(3): 237-49.

Chehimi, J., D. E. Campbell, L. Azzoni, D. Bacheller, E. Papasavvas, G. Jerandi, K. Mounzer, J. Kostman, G. Trinchieri and L. J. Montaner (2002). "Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals." J Immunol **168**(9): 4796-801.

Chehimi, J., S. E. Starr, H. Kawashima, D. S. Miller, G. Trinchieri, B. Perussia and S. Bandyopadhyay (1989). "Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood." Immunology **68**(4): 486-90.

Chen, Q., B. Gong, A. S. Mahmoud-Ahmed, A. Zhou, E. D. Hsi, M. Hussein and A. Almasan (2001). "Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma." Blood **98**(7): 2183-92.

Chen, W., S. Antonenko, J. M. Sederstrom, X. Liang, A. S. Chan, H. Kanzler, B. Blom, B. R. Blazar and Y. J. Liu (2004). "Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors." Blood **103**(7): 2547-53.

Chiarugi, A. and M. A. Moskowitz (2002). "Cell biology. PARP-1--a perpetrator of apoptotic cell death?" Science **297**(5579): 200-1.

Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari and V. M. Dixit (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell **81**(4): 505-12.

Chinnaiyan, A. M., U. Prasad, S. Shankar, D. A. Hamstra, M. Shanaiah, T. L. Chenevert, B. D. Ross and A. Rehemtulla (2000). "Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1754-9.

Cho, H. J., K. Takabayashi, P. M. Cheng, M. D. Nguyen, M. Corr, S. Tuck and E. Raz (2000). "Immunostimulatory DNA-based vaccines induce cytotoxic lymphocyte activity by a T-helper cell-independent mechanism." Nat Biotechnol **18**(5): 509-14.

Chou, C. F., H. W. Peng, C. Y. Wang, Y. T. Yang and S. H. Han (2000). "An Sp1 binding site involves the transcription of the Fas ligand gene induced by PMA and ionomycin in Jurkat cells." J Biomed Sci **7**(2): 136-43.

Chuang, T. and R. J. Ulevitch (2001). "Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells." Biochim Biophys Acta **1518**(1-2): 157-61.

Chuang, T. H. and R. J. Ulevitch (2000). "Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9." Eur Cytokine Netw **11**(3): 372-8.

Chuntharapai, A., K. Dodge, K. Grimmer, K. Schroeder, S. A. Marsters, H. Koeppen, A. Ashkenazi and K. J. Kim (2001). "Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4." J Immunol **166**(8): 4891-8.

Clancy, L., K. Mruk, K. Archer, M. Woelfel, J. Mongkolsapaya, G. Screaton, M. J. Lenardo and F. K. Chan (2005). "Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18099-104.

Clarke, N., A. M. Jimenez-Lara, E. Voltz and H. Gronemeyer (2004). "Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL." Embo J **23**(15): 3051-60.

Colonna, M., G. Trinchieri and Y. J. Liu (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-26.

Corcoran, L., I. Ferrero, D. Vremec, K. Lucas, J. Waithman, M. O'Keeffe, L. Wu, A. Wilson and K. Shortman (2003). "The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells." J Immunol **170**(10): 4926-32.

Cowling, V. and J. Downward (2002). "Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain." Cell Death Differ **9**(10): 1046-56.

Cretney, E., J. L. McQualter, N. Kayagaki, H. Yagita, C. C. Bernard, I. S. Grewal, A. Ashkenazi and M. J. Smyth (2005). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice." Immunol Cell Biol **83**(5): 511-9.

Cretney, E., K. Takeda, H. Yagita, M. Glaccum, J. J. Peschon and M. J. Smyth (2002). "Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice." J Immunol **168**(3): 1356-61.

Curiel, T. J., P. Cheng, P. Mottram, X. Alvarez, L. Moons, M. Evdemon-Hogan, S. Wei, L. Zou, I. Kryczek, G. Hoyle, A. Lackner, P. Carmeliet and W. Zou (2004). "Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer." Cancer Res **64**(16): 5535-8.

Damiano, J. S., V. Oliveira, K. Welsh and J. C. Reed (2004). "Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses." Biochem J **381**(Pt 1): 213-9.

Damiano, J. S., C. Stehlik, F. Pio, A. Godzik and J. C. Reed (2001). "CLAN, a novel human CED-4-like gene." Genomics **75**(1-3): 77-83.

Daniels, R. A., H. Turley, F. C. Kimberley, X. S. Liu, J. Mongkolsapaya, P. Ch'En, X. N. Xu, B. Q. Jin, F. Pezzella and G. R. Screaton (2005). "Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues." Cell Res **15**(6): 430-8.

Davila, E. and E. Celis (2000). "Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity." J Immunol **165**(1): 539-47.

de Heer, H. J., H. Hammad, T. Soullie, D. Hijdra, N. Vos, M. A. Willart, H. C. Hoogsteden and B. N. Lambrecht (2004). "Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen." J Exp Med **200**(1): 89-98.

Deb, D. K., A. Sassano, F. Lekmine, B. Majchrzak, A. Verma, S. Kambhampati, S. Uddin, A. Rahman, E. N. Fish and L. C. Platanias (2003). "Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma." J Immunol **171**(1): 267-73.

Debatin, K. M. and P. H. Krammer (2004). "Death receptors in chemotherapy and cancer." Oncogene **23**(16): 2950-66.

Decker, T., M. Muller and S. Stockinger (2005). "The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection." Nat Rev Immunol **5**(9): 675-87.

Degli-Esposti, M. A., W. C. Dougall, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, C. A. Smith and R. G. Goodwin (1997). "The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects

against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain." Immunity **7**(6): 813-20.
Della Chiesa, M., C. Romagnani, A. Thiel, L. Moretta and A. Moretta (2006). "Multidirectional interactions are bridging human NK cells with plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells during innate immune responses." Blood.
Demedts, I. K., G. G. Brusselle, K. Y. Vermaelen and R. A. Pauwels (2005). "Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells." Am J Respir Cell Mol Biol **32**(3): 177-84.
Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira and C. Reis e Sousa (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." Science **303**(5663): 1529-31.
Diebold, S. S., M. Montoya, H. Unger, L. Alexopoulou, P. Roy, L. E. Haswell, A. Al-Shamkhani, R. Flavell, P. Borrow and C. Reis e Sousa (2003). "Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers." Nature **424**(6946): 324-8.
Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
Dubois, B., C. Barthelemy, I. Durand, Y. J. Liu, C. Caux and F. Briere (1999). "Toward a role of dendritic cells in the germinal center reaction: triggering of B cell proliferation and isotype switching." J Immunol **162**(6): 3428-36.
Dumitriu, I. E., P. Baruah, M. E. Bianchi, A. A. Manfredi and P. Rovere-Querini (2005). "Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **35**(7): 2184-90.
Dzionek, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck and J. Schmitz (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol **165**(11): 6037-46.
Dzionek, A., Y. Inagaki, K. Okawa, J. Nagafune, J. Rock, Y. Sohma, G. Winkels, M. Zysk, Y. Yamaguchi and J. Schmitz (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions." Hum Immunol **63**(12): 1133-48.
Dzionek, A., Y. Sohma, J. Nagafune, M. Cella, M. Colonna, F. Facchetti, G. Gunther, I. Johnston, A. Lanzavecchia, T. Nagasaka, T. Okada, W. Vermi, G. Winkels, T. Yamamoto, M. Zysk, Y. Yamaguchi and J. Schmitz (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): 1823-34.
Egeter, O., R. Mocikat, K. Ghoreschi, A. Dieckmann and M. Rocken (2000). "Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice." Cancer Res **60**(6): 1515-20.
Emery, J. G., P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee and P. R. Young (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." J Biol Chem **273**(23): 14363-7.
Facchetti, F., C. de Wolf-Peeters, D. Y. Mason, K. Pulford, J. J. van den Oord and V. J. Desmet (1988). "Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin." Am J Pathol **133**(1): 15-21.
Fallarino, F., C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, S. Gizzi, C. Asselin-Paturel, M. C. Fioretti, G. Trinchieri, U. Grohmann and P. Puccetti (2005). "Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells." Int Immunol **17**(11): 1429-38.

Fanger, N. A., C. R. Maliszewski, K. Schooley and T. S. Griffith (1999). "Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)." J Exp Med **190**(8): 1155-64.

Farkas, L., K. Beiske, F. Lund-Johansen, P. Brandtzaeg and F. L. Jahnsen (2001). "Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions." Am J Pathol **159**(1): 237-43.

Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." Science **272**(5258): 50-3.

Feldman, M. and P. Fitzgerald-Bocarsly (1990). "Sequential enrichment and immunocytochemical visualization of human interferon-alpha-producing cells." J Interferon Res **10**(4): 435-46.

Feller, A. C., K. Lennert, H. Stein, H. D. Bruhn and H. H. Wuthe (1983). "Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases." Histopathology **7**(6): 825-39.

Feuillard, J., M. C. Jacob, F. Valensi, M. Maynadie, R. Gressin, L. Chaperot, C. Arnoulet, F. Brignole-Baudouin, B. Drenou, E. Duchayne, A. Falkenrodt, R. Garand, E. Homolle, B. Husson, E. Kuhlein, G. Le Calvez, D. Sainty, M. F. Sotto, F. Trimoreau and M. C. Bene (2002). "Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies." Blood **99**(5): 1556-63.

Fiebiger, E., P. Meraner, E. Weber, I. F. Fang, G. Stingl, H. Ploegh and D. Maurer (2001). "Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells." J Exp Med **193**(8): 881-92.

Fischer, U. and K. Schulze-Osthoff (2005). "Apoptosis-based therapies and drug targets." Cell Death Differ **12 Suppl 1**: 942-61.

Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S. M. Liao and T. Maniatis (2003). "IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway." Nat Immunol **4**(5): 491-6.

Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha and D. T. Golenbock (2003). "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF." J Exp Med **198**(7): 1043-55.

Fleming, C. J., A. M. Bryden, A. Evans, R. S. Dawe and S. H. Ibbotson (2004). "A pilot study of treatment of lentigo maligna with 5% imiquimod cream." Br J Dermatol **151**(2): 485-8.

Fong, L., M. Mengozzi, N. W. Abbey, B. G. Herndier and E. G. Engleman (2002). "Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation." J Virol **76**(21): 11033-41.

Fonteneau, J. F., M. Gilliet, M. Larsson, I. Dasilva, C. Munz, Y. J. Liu and N. Bhardwaj (2003). "Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity." Blood **101**(9): 3520-6.

Francois, C., I. Bernard, S. Castelain, B. Charleston, M. D. Fray, J. C. Capiod and G. Duverlie (2005). "Quantification of different human alpha interferon subtypes and pegylated interferon activities by measuring MxA promoter activation." Antimicrob Agents Chemother **49**(9): 3770-5.

Fuchs, A., M. Cella, T. Kondo and M. Colonna (2005). "Paradoxic inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44." Blood **106**(6): 2076-82.

Fujita, F., Y. Taniguchi, T. Kato, Y. Narita, A. Furuya, T. Ogawa, H. Sakurai, T. Joh, M. Itoh, M. Delhase, M. Karin and M. Nakanishi (2003). "Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling." Mol Cell Biol **23**(21): 7780-93.

Furumoto, K., L. Soares, E. G. Engleman and M. Merad (2004). "Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs." J Clin Invest **113**(5): 774-83.
Gabriele, L., A. Fragale, P. Borghi, P. Sestili, E. Stellacci, M. Venditti, G. Schiavoni, M. Sanchez, F. Belardelli and A. Battistini (2006). "IRF-1 deficiency skews the differentiation of dendritic cells toward plasmacytoid and tolerogenic features." J Leukoc Biol.
Garber, K. (2005). "New apoptosis drugs face critical test." Nat Biotechnol **23**(4): 409-11.
Garnache-Ottou, F., L. Chaperot, S. Biichle, C. Ferrand, J. P. Remy-Martin, E. Deconinck, P. D. de Tailly, B. Bulabois, J. Poulet, E. Kuhlein, M. C. Jacob, V. Salaun, M. Arock, B. Drenou, F. Schillinger, E. Seilles, P. Tiberghien, J. C. Bensa, J. Plumas and P. Saas (2005). "Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells." Blood **105**(3): 1256-64.
Garnache-Ottou, F., J. Feuillard and P. Saas (2007). "Plasmacytoid dendritic cell leukaemia/lymphoma: towards a well defined entity?" Br J Haematol **136**(4): 539-48.
Gaur, U. and B. B. Aggarwal (2003). "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily." Biochem Pharmacol **66**(8): 1403-8.
Geisse, J., I. Caro, J. Lindholm, L. Golitz, P. Stampone and M. Owens (2004). "Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies." J Am Acad Dermatol **50**(5): 722-33.
Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski and J. L. Madara (2001). "Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression." J Immunol **167**(4): 1882-5.
Ghanekar, S. A. (2006). "NKpDC" and "NKmDC": NKDC-like cell subsets in PBMC of healthy human donors. 9th International Conference on Dendritic Cells., Edinburgh.
Gibson, S. J., J. M. Lindh, T. R. Riter, R. M. Gleason, L. M. Rogers, A. E. Fuller, J. L. Oesterich, K. B. Gorden, X. Qiu, S. W. McKane, R. J. Noelle, R. L. Miller, R. M. Kedl, P. Fitzgerald-Bocarsly, M. A. Tomai and J. P. Vasilakos (2002). "Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod." Cell Immunol **218**(1-2): 74-86.
Gill, M. A., A. K. Palucka, T. Barton, F. Ghaffar, H. Jafri, J. Banchereau and O. Ramilo (2005). "Mobilization of plasmacytoid and myeloid dendritic cells to mucosal sites in children with respiratory syncytial virus and other viral respiratory infections." J Infect Dis **191**(7): 1105-15.
Gilliet, M., C. Conrad, M. Geiges, A. Cozzio, W. Thurlimann, G. Burg, F. O. Nestle and R. Dummer (2004). "Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors." Arch Dermatol **140**(12): 1490-5.
Gilliet, M. and Y. J. Liu (2002). "Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **195**(6): 695-704.
Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott and P. J. Sansonetti (2003). "Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection." J Biol Chem **278**(11): 8869-72.
Goh, K. C., S. J. Haque and B. R. Williams (1999). "p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons." Embo J **18**(20): 5601-8.
Gong, B. and A. Almasan (2000). "Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene." Biochem Biophys Res Commun **278**(3): 747-52.
Goriely, S., C. Molle, M. Nguyen, V. Albarani, N. O. Haddou, R. Lin, D. De Wit, V. Flamand, F. Willems and M. Goldman (2006). "Interferon regulatory factor 3 is

involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation." Blood **107**(3): 1078-84.
Granelli-Piperno, A. and P. Nolan (1991). "Nuclear transcription factors that bind to elements of the IL-2 promoter. Induction requirements in primary human T cells." J Immunol **147**(8): 2734-9.
Granucci, F., M. Foti and P. Ricciardi-Castagnoli (2005). "Dendritic cell biology." Adv Immunol **88**: 193-233.
Griffith, T. S., W. A. Chin, G. C. Jackson, D. H. Lynch and M. Z. Kubin (1998). "Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells." J Immunol **161**(6): 2833-40.
Griffith, T. S., C. T. Rauch, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, D. H. Lynch, C. A. Smith, R. G. Goodwin and M. Z. Kubin (1999). "Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies." J Immunol **162**(5): 2597-605.
Griffith, T. S., S. R. Wiley, M. Z. Kubin, L. M. Sedger, C. R. Maliszewski and N. A. Fanger (1999). "Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL." J Exp Med **189**(8): 1343-54.
Groot, F., T. M. van Capel, M. L. Kapsenberg, B. Berkhout and E. C. de Jong (2006). "Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition." Blood **108**(6): 1957-64.
Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau and Y. J. Liu (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.
Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and S. Amigorena (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol **20**: 621-67.
Guiducci, C., G. Ott, J. H. Chan, E. Damon, C. Calacsan, T. Matray, K. D. Lee, R. L. Coffman and F. J. Barrat (2006). "Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation." J Exp Med **203**(8): 1999-2008.
Gursel, M., I. Gursel, H. S. Mostowski and D. M. Klinman (2006). "CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation." J Immunol **177**(3): 1575-80.
Hacker, H., H. Mischak, T. Miethke, S. Liptay, R. Schmid, T. Sparwasser, K. Heeg, G. B. Lipford and H. Wagner (1998). "CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation." Embo J **17**(21): 6230-40.
Hacker, H., V. Redecke, B. Blagoev, I. Kratchmarova, L. C. Hsu, G. G. Wang, M. P. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Hacker, M. Mann and M. Karin (2006). "Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6." Nature **439**(7073): 204-7.
Hafner, M., R. Zawatzky, C. Hirtreiter, W. A. Buurman, B. Echtenacher, T. Hehlgans and D. N. Mannel (2001). "Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type I IFN." Cancer Res **61**(14): 5523-8.
Halaas, O., R. Vik, A. Ashkenazi and T. Espevik (2000). "Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages." Scand J Immunol **51**(3): 244-50.
Halpern, W. (2004). "Variable distribution of TRAIL Receptor 1 in primary human tumor and normal tissues." Eur.J.Cancer **2 (Suppl.8)**: 69.
Harrington, L. E., P. R. Mangan and C. T. Weaver (2006). "Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage." Curr Opin Immunol **18**(3): 349-56.

Hart, D. N. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood **90**(9): 3245-87.
Hartmann, E., B. Wollenberg, S. Rothenfusser, M. Wagner, D. Wellisch, B. Mack, T. Giese, O. Gires, S. Endres and G. Hartmann (2003). "Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer." Cancer Res **63**(19): 6478-87.
Hartmann, G., J. Battiany, H. Poeck, M. Wagner, M. Kerkmann, N. Lubenow, S. Rothenfusser and S. Endres (2003). "Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **33**(6): 1633-41.
Hatada, E., S. Saito and R. Fukuda (1999). "Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells." J Virol **73**(3): 2425-33.
Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-103.
Heckelsmiller, K., K. Rall, S. Beck, A. Schlamp, J. Seiderer, B. Jahrsdorfer, A. Krug, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann (2002). "Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model." J Immunol **169**(7): 3892-9.
Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner and S. Bauer (2003). "The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily." Eur J Immunol **33**(11): 2987-97.
Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner and S. Bauer (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science **303**(5663): 1526-9.
Hemmi, H., T. Kaisho, K. Takeda and S. Akira (2003). "The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets." J Immunol **170**(6): 3059-64.
Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.
Hemmi, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yamamoto, T. Kaisho, H. Sanjo, T. Kawai, K. Hoshino, K. Takeda and S. Akira (2004). "The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection." J Exp Med **199**(12): 1641-50.
Herbeuval, J. P., J. Nilsson, A. Boasso, A. W. Hardy, M. J. Kruhlak, S. A. Anderson, M. J. Dolan, M. Dy, J. Andersson and G. M. Shearer (2006). "Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 7000-5.
Hermans, I. F., D. S. Ritchie, J. Yang, J. M. Roberts and F. Ronchese (2000). "CD8+ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity." J Immunol **164**(6): 3095-101.
Hilliard, B., A. Wilmen, C. Seidel, T. S. Liu, R. Goke and Y. Chen (2001). "Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **166**(2): 1314-9.
Hochrein, H., M. O'Keeffe and H. Wagner (2002). "Human and mouse plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol **63**(12): 1103-10.

Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter and H. Wagner (2004). "Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11416-21.

Hoebe, K. and B. Beutler (2006). "TRAF3: a new component of the TLR-signaling apparatus." Trends Mol Med **12**(5): 187-9.

Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han and B. Beutler (2003). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." Nature **424**(6950): 743-8.

Hofmann, K., P. Bucher and J. Tschopp (1997). "The CARD domain: a new apoptotic signalling motif." Trends Biochem Sci **22**(5): 155-6.

Honda, K., Y. Ohba, H. Yanai, H. Negishi, T. Mizutani, A. Takaoka, C. Taya and T. Taniguchi (2005). "Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction." Nature **434**(7036): 1035-40.

Honda, K., S. Sakaguchi, C. Nakajima, A. Watanabe, H. Yanai, M. Matsumoto, T. Ohteki, T. Kaisho, A. Takaoka, S. Akira, T. Seya and T. Taniguchi (2003). "Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10872-7.

Honda, K., A. Takaoka and T. Taniguchi (2006). "Type I interferon [correction of inteferon] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors." Immunity **25**(3): 349-60.

Honda, K. and T. Taniguchi (2006). "IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors." Nat Rev Immunol **6**(9): 644-58.

Honda, K., H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W. C. Yeh and T. Taniguchi (2004). "Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(43): 15416-21.

Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida and T. Taniguchi (2005). "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses." Nature **434**(7034): 772-7.

Horng, T., G. M. Barton, R. A. Flavell and R. Medzhitov (2002). "The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors." Nature **420**(6913): 329-33.

Horng, T., G. M. Barton and R. Medzhitov (2001). "TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway." Nat Immunol **2**(9): 835-41.

Hornung, V., M. Guenthner-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougerolles, S. Endres and G. Hartmann (2005). "Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." Nat Med **11**(3): 263-70.

Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann (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): 4531-7.

Hosmalin, A. (2006). Plasmacytoid dendritic cells cross-present HIV antigens. 16ème Congrès Européen d'Immunologie, Paris.

Hsu, H., J. Xiong and D. V. Goeddel (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.

Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." Cell **103**(6): 839-42.

Huang, J., T. Liu, L. G. Xu, D. Chen, Z. Zhai and H. B. Shu (2005). "SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways." Embo J **24**(23): 4018-28.

Hugues, S., L. Fetler, L. Bonifaz, J. Helft, F. Amblard and S. Amigorena (2004). "Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity." Nat Immunol **5**(12): 1235-42.

Hymowitz, S. G., H. W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R. F. Kelley, A. Ashkenazi and A. M. de Vos (1999). "Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5." Mol Cell **4**(4): 563-71.

Ichikawa, K., W. Liu, M. Fleck, H. Zhang, L. Zhao, T. Ohtsuka, Z. Wang, D. Liu, J. D. Mountz, M. Ohtsuki, W. J. Koopman, R. Kimberly and T. Zhou (2003). "TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis." J Immunol **171**(2): 1061-9.

Ichikawa, K., W. Liu, L. Zhao, Z. Wang, D. Liu, T. Ohtsuka, H. Zhang, J. D. Mountz, W. J. Koopman, R. P. Kimberly and T. Zhou (2001). "Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity." Nat Med **7**(8): 954-60.

Iezzi, G., D. Scheidegger and A. Lanzavecchia (2001). "Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo." J Exp Med **193**(8): 987-93.

Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." Nat Rev Cancer **2**(4): 277-88.

Inohara, N., Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S. J. Foster, A. P. Moran, J. L. Fernandez-Luna and G. Nunez (2003). "Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease." J Biol Chem **278**(8): 5509-12.

Inoue, H., K. Shiraki, S. Ohmori, T. Sakai, M. Deguchi, T. Yamanaka, H. Okano and T. Nakano (2002). "Histone deacetylase inhibitors sensitize human colonic adenocarcinoma cell lines to TNF-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis." Int J Mol Med **9**(5): 521-5.

Ishii, K. J., C. Coban, H. Kato, K. Takahashi, Y. Torii, F. Takeshita, H. Ludwig, G. Sutter, K. Suzuki, H. Hemmi, S. Sato, M. Yamamoto, S. Uematsu, T. Kawai, O. Takeuchi and S. Akira (2006). "A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA." Nat Immunol **7**(1): 40-8.

Ishii, K. J., F. Takeshita, I. Gursel, M. Gursel, J. Conover, A. Nussenzweig and D. M. Klinman (2002). "Potential role of phosphatidylinositol 3 kinase, rather than DNA-dependent protein kinase, in CpG DNA-induced immune activation." J Exp Med **196**(2): 269-74.

Ito, T., R. Amakawa and S. Fukuhara (2002). "Roles of toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance." Hum Immunol **63**(12): 1120-5.

Ito, T., R. Amakawa, M. Inaba, T. Hori, M. Ota, K. Nakamura, M. Takebayashi, M. Miyaji, T. Yoshimura, K. Inaba and S. Fukuhara (2004). "Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs." J Immunol **172**(7): 4253-9.

Ito, T., R. Amakawa, M. Inaba, S. Ikehara, K. Inaba and S. Fukuhara (2001). "Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs." J Immunol **166**(5): 2961-9.

Ito, T., R. Amakawa, M. Inaba, S. Ikehara, K. Inaba and S. Fukuhara (2001). "Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs." J Immunol **166**(5): 2961-9.

Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira and S. Fukuhara (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced

differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." J Exp Med **195**(11): 1507-12.
Ito, T., M. Inaba, K. Inaba, J. Toki, S. Sogo, T. Iguchi, Y. Adachi, K. Yamaguchi, R. Amakawa, J. Valladeau, S. Saeland, S. Fukuhara and S. Ikehara (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells." J Immunol **163**(3): 1409-19.
Ito, T., Y. H. Wang and Y. J. Liu (2005). "Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9." Springer Semin Immunopathol **26**(3): 221-9.
Izaguirre, A., B. J. Barnes, S. Amrute, W. S. Yeow, N. Megjugorac, J. Dai, D. Feng, E. Chung, P. M. Pitha and P. Fitzgerald-Bocarsly (2003). "Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells." J Leukoc Biol **74**(6): 1125-38.
Jacob, M. C., L. Chaperot, P. Mossuz, J. Feuillard, F. Valensi, D. Leroux, M. C. Bene, J. C. Bensa, F. Briere and J. Plumas (2003). "CD4+ CD56+ lineage negative malignancies: a new entity developed from malignant early plasmacytoid dendritic cells." Haematologica **88**(8): 941-55.
Jahnsen, F. L., F. Lund-Johansen, J. F. Dunne, L. Farkas, R. Haye and P. Brandtzaeg (2000). "Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy." J Immunol **165**(7): 4062-8.
Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
Janssen, E. M., N. M. Droin, E. E. Lemmens, M. J. Pinkoski, S. J. Bensinger, B. D. Ehst, T. S. Griffith, D. R. Green and S. P. Schoenberger (2005). "CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death." Nature **434**(7029): 88-93.
Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto and A. Lanzavecchia (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**(11): 3388-93.
Jego, G., A. K. Palucka, J. P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual and J. Banchereau (2003). "Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6." Immunity **19**(2): 225-34.
Jeremias, I., I. Herr, T. Boehler and K. M. Debatin (1998). "TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells." Eur J Immunol **28**(1): 143-52.
Jo, M., T. H. Kim, D. W. Seol, J. E. Esplen, K. Dorko, T. R. Billiar and S. C. Strom (2000). "Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." Nat Med **6**(5): 564-7.
Johnsen, A. C., J. Haux, B. Steinkjer, U. Nonstad, K. Egeberg, A. Sundan, A. Ashkenazi and T. Espevik (1999). "Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity." Cytokine **11**(9): 664-72.
Judge, A. D., V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock and I. MacLachlan (2005). "Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA." Nat Biotechnol **23**(4): 457-62.
Juo, P., C. J. Kuo, J. Yuan and J. Blenis (1998). "Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade." Curr Biol **8**(18): 1001-8.
Jurk, M., F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A. M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford and S. Bauer (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." Nat Immunol **3**(6): 499.
Jurk, M., B. Schulte, A. Kritzler, B. Noll, E. Uhlmann, T. Wader, C. Schetter, A. M. Krieg and J. Vollmer (2004). "C-Class CpG ODN: sequence requirements and

characterization of immunostimulatory activities on mRNA level." Immunobiology **209**(1-2): 141-54.
Kadowaki, N., S. Antonenko, J. Y. Lau and Y. J. Liu (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med **192**(2): 219-26.
Kadowaki, N., S. Antonenko and Y. J. Liu (2001). "Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN." J Immunol **166**(4): 2291-5.
Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan and Y. J. Liu (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." J Exp Med **194**(6): 863-9.
Kagan, J. C. and R. Medzhitov (2006). "Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling." Cell **125**(5): 943-55.
Kariko, K., M. Buckstein, H. Ni and D. Weissman (2005). "Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA." Immunity **23**(2): 165-75.
Kashii, Y., R. Giorda, R. B. Herberman, T. L. Whiteside and N. L. Vujanovic (1999). "Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells." J Immunol **163**(10): 5358-66.
Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi and S. Akira (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." Immunity **23**(1): 19-28.
Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita and S. Akira (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." Nature **441**(7089): 101-5.
Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." Immunity **11**(1): 115-22.
Kawai, T. and S. Akira (2006). "Innate immune recognition of viral infection." Nat Immunol **7**(2): 131-7.
Kawai, T., S. Sato, K. J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi and S. Akira (2004). "Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6." Nat Immunol **5**(10): 1061-8.
Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi and S. Akira (2005). "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction." Nat Immunol **6**(10): 981-8.
Kawamura, K., N. Kadowaki, T. Kitawaki and T. Uchiyama (2006). "Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4+ cytotoxic regulatory T cells." Blood **107**(3): 1031-8.
Kawarada, Y., R. Ganss, N. Garbi, T. Sacher, B. Arnold and G. J. Hammerling (2001). "NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides." J Immunol **167**(9): 5247-53.
Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, H. Eto, K. Okumura and H. Yagita (1999). "Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs." J Exp Med **189**(9): 1451-60.
Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, A. Kawasaki, H. Akiba, K. Okumura and H. Yagita (1999). "Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity." J Immunol **162**(5): 2639-47.

Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, K. Takeda, H. Akiba, H. Tsutsui, H. Okamura, K. Nakanishi, K. Okumura and H. Yagita (1999). "Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells." J Immunol **163**(4): 1906-13.

Kelley, S. K., L. A. Harris, D. Xie, L. Deforge, K. Totpal, J. Bussiere and J. A. Fox (2001). "Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety." J Pharmacol Exp Ther **299**(1): 31-8.

Kemp, T. J., B. D. Elzey and T. S. Griffith (2003). "Plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-alpha induces TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2L-mediated antitumor activity by human monocytes following CpG oligodeoxynucleotide stimulation." J Immunol **171**(1): 212-8.

Kerkmann, M., L. T. Costa, C. Richter, S. Rothenfusser, J. Battiany, V. Hornung, J. Johnson, S. Englert, T. Ketterer, W. Heckl, S. Thalhammer, S. Endres and G. Hartmann (2005). "Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells." J Biol Chem **280**(9): 8086-93.

Kerkmann, M., S. Rothenfusser, V. Hornung, A. Towarowski, M. Wagner, A. Sarris, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann (2003). "Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **170**(9): 4465-74.

Kim, H. S. and M. S. Lee (2007). "STAT1 as a key modulator of cell death." Cell Signal **19**(3): 454-65.

Kim, Y., N. Suh, M. Sporn and J. C. Reed (2002). "An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis." J Biol Chem **277**(25): 22320-9.

Kimberley, F. C. and G. R. Screaton (2004). "Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors." Cell Res **14**(5): 359-72.

Kirshner, J. R., A. Y. Karpova, M. Kops and P. M. Howley (2005). "Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target." J Virol **79**(14): 9320-4.

Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K. J. Kim and A. Ashkenazi (2000). "Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5." Immunity **12**(6): 611-20.

Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott and A. Ashkenazi (2001). "Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8." J Biol Chem **276**(49): 46639-46.

Klinman, D. M. (2004). "Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides." Nat Rev Immunol **4**(4): 249-58.

Kobayashi, K., N. Inohara, L. D. Hernandez, J. E. Galan, G. Nunez, C. A. Janeway, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2002). "RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems." Nature **416**(6877): 194-9.

Koga, Y., A. Matsuzaki, A. Suminoe, H. Hattori and T. Hara (2004). "Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils." Cancer Res **64**(3): 1037-43.

Kohrgruber, N., N. Halanek, M. Groger, D. Winter, K. Rappersberger, M. Schmitt-Egenolf, G. Stingl and D. Maurer (1999). "Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines." J Immunol **163**(6): 3250-9.

Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol **20**: 709-60.
Krieg, A. M. (2006). "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." Nat Rev Drug Discov **5**(6): 471-84.
Krug, A., G. D. Luker, W. Barchet, D. A. Leib, S. Akira and M. Colonna (2004). "Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9." Blood **103**(4): 1433-7.
Krug, A., S. Rothenfusser, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, S. Blackwell, Z. K. Ballas, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann (2001). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**(7): 2154-63.
Krug, A., A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann (2001). "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." Eur J Immunol **31**(10): 3026-37.
Krug, A., R. Uppaluri, F. Facchetti, B. G. Dorner, K. C. Sheehan, R. D. Schreiber, M. Cella and M. Colonna (2002). "IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation." J Immunol **169**(11): 6079-83.
Krug, A., R. Veeraswamy, A. Pekosz, O. Kanagawa, E. R. Unanue, M. Colonna and M. Cella (2003). "Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells." J Exp Med **197**(7): 899-906.
Kumar, H., T. Kawai, H. Kato, S. Sato, K. Takahashi, C. Coban, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. J. Ishii, O. Takeuchi and S. Akira (2006). "Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses." J Exp Med **203**(7): 1795-803.
Kuwajima, S., T. Sato, K. Ishida, H. Tada, H. Tezuka and T. Ohteki (2006). "Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation." Nat Immunol **7**(7): 740-6.
Kuwana, M. (2002). "Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets." Hum Immunol **63**(12): 1156-63.
Lande, R., E. Giacomini, B. Serafini, B. Rosicarelli, G. D. Sebastiani, G. Minisola, U. Tarantino, V. Riccieri, G. Valesini and E. M. Coccia (2004). "Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis." J Immunol **173**(4): 2815-24.
Langerhans (1868). "Uber die nerven der menschlichen." Virchows Arch Path Anat **44**: 325.
Lanuti, M., S. Rudginsky, S. D. Force, E. S. Lambright, W. M. Siders, M. Y. Chang, K. M. Amin, L. R. Kaiser, R. K. Scheule and S. M. Albelda (2000). "Cationic lipid:bacterial DNA complexes elicit adaptive cellular immunity in murine intraperitoneal tumor models." Cancer Res **60**(11): 2955-63.
Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik and D. T. Golenbock (2004). "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome." Nat Immunol **5**(2): 190-8.
Lavrik, I., A. Golks and P. H. Krammer (2005). "Death receptor signaling." J Cell Sci **118**(Pt 2): 265-7.
Lazarus, R., B. A. Raby, C. Lange, E. K. Silverman, D. J. Kwiatkowski, D. Vercelli, W. J. Klimecki, F. D. Martinez and S. T. Weiss (2004). "TOLL-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples." Am J Respir Crit Care Med **170**(6): 594-600.

Le Bon, A., N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, P. Borrow and D. F. Tough (2003). "Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon." Nat Immunol **4**(10): 1009-15.

Leaman, D. W., M. Chawla-Sarkar, K. Vyas, M. Reheman, K. Tamai, S. Toji and E. C. Borden (2002). "Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis." J Biol Chem **277**(32): 28504-11.

LeBlanc, H. N. and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." Cell Death Differ **10**(1): 66-75.

Lee, J., T. H. Chuang, V. Redecke, L. She, P. M. Pitha, D. A. Carson, E. Raz and H. B. Cottam (2003). "Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6646-51.

Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." Cell **86**(6): 973-83.

Lennert, K. and W. Remmele (1958). "[Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]." Acta Haematol **19**(2): 99-113.

Li, Y., S. Batra, A. Sassano, B. Majchrzak, D. E. Levy, M. Gaestel, E. N. Fish, R. J. Davis and L. C. Platanias (2005). "Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) 3 and MKK6 by type I interferons." J Biol Chem **280**(11): 10001-10.

Li, Y., A. Sassano, B. Majchrzak, D. K. Deb, D. E. Levy, M. Gaestel, A. R. Nebreda, E. N. Fish and L. C. Platanias (2004). "Role of p38alpha Map kinase in Type I interferon signaling." J Biol Chem **279**(2): 970-9.

Liabakk, N. B., A. Sundan, S. Torp, P. Aukrust, S. S. Froland and T. Espevik (2002). "Development, characterization and use of monoclonal antibodies against sTRAIL: measurement of sTRAIL by ELISA." J Immunol Methods **259**(1-2): 119-28.

Lin, R., C. Heylbroeck, P. M. Pitha and J. Hiscott (1998). "Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation." Mol Cell Biol **18**(5): 2986-96.

Lincz, L. F., T. X. Yeh and A. Spencer (2001). "TRAIL-induced eradication of primary tumour cells from multiple myeloma patient bone marrows is not related to TRAIL receptor expression or prior chemotherapy." Leukemia **15**(10): 1650-7.

Liston, P., W. G. Fong and R. G. Korneluk (2003). "The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2." Oncogene **22**(53): 8568-80.

Liu, S., Y. Yu, M. Zhang, W. Wang and X. Cao (2001). "The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells." J Immunol **166**(9): 5407-15.

Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." Annu Rev Immunol **23**: 275-306.

Liu, Y. J., H. Kanzler, V. Soumelis and M. Gilliet (2001). "Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation." Nat Immunol **2**(7): 585-9.

Lohoff, M. and T. W. Mak (2005). "Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation." Nat Rev Immunol **5**(2): 125-35.

Lore, K., M. R. Betts, J. M. Brenchley, J. Kuruppu, S. Khojasteh, S. Perfetto, M. Roederer, R. A. Seder and R. A. Koup (2003). "Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses." J Immunol **171**(8): 4320-8.

Lore, K., A. Smed-Sorensen, J. Vasudevan, J. R. Mascola and R. A. Koup (2005). "Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells." J Exp Med **201**(12): 2023-33.

Lui, G., O. Manches, J. Angel, J.-P. Molens, L. Chaperot and J. Plumas (in preparation). "Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus infected cells."

Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov and A. Iwasaki (2003). "Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **198**(3): 513-20.

Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki and R. A. Flavell (2004). "Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5598-603.

MacDonald, K. P., D. J. Munster, G. J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz and D. N. Hart (2002). "Characterization of human blood dendritic cell subsets." Blood **100**(13): 4512-20.

MacFarlane, M., M. Ahmad, S. M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G. M. Cohen and E. S. Alnemri (1997). "Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL." J Biol Chem **272**(41): 25417-20.

MacFarlane, M., S. Inoue, S. L. Kohlhaas, A. Majid, N. Harper, D. B. Kennedy, M. J. Dyer and G. M. Cohen (2005). "Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1." Cell Death Differ **12**(7): 773-82.

Maeda, T., K. Murata, T. Fukushima, K. Sugahara, K. Tsuruda, M. Anami, Y. Onimaru, K. Tsukasaki, M. Tomonaga, R. Moriuchi, H. Hasegawa, Y. Yamada and S. Kamihira (2005). "A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma." Int J Hematol **81**(2): 148-54.

Mamane, Y., C. Heylbroeck, P. Genin, M. Algarte, M. J. Servant, C. LePage, C. DeLuca, H. Kwon, R. Lin and J. Hiscott (1999). "Interferon regulatory factors: the next generation." Gene **237**(1): 1-14.

Manches, O., G. Lui, L. Chaperot, R. Gressin, J. P. Molens, M. C. Jacob, J. J. Sotto, D. Leroux, J. C. Bensa and J. Plumas (2003). "In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas." Blood **101**(3): 949-54.

Manzel, L., L. Strekowski, F. M. Ismail, J. C. Smith and D. E. Macfarlane (1999). "Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by 4-aminoquinolines and other weak bases: mechanistic studies." J Pharmacol Exp Ther **291**(3): 1337-47.

Marchetti, P., T. Hirsch, N. Zamzami, M. Castedo, D. Decaudin, S. A. Susin, B. Masse and G. Kroemer (1996). "Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis." J Immunol **157**(11): 4830-6.

Mariani, S. M. and P. H. Krammer (1998). "Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells." Eur J Immunol **28**(5): 1492-8.

Mariathasan, S., K. Newton, D. M. Monack, D. Vucic, D. M. French, W. P. Lee, M. Roose-Girma, S. Erickson and V. M. Dixit (2004). "Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf." Nature **430**(6996): 213-8.

Marie, I., J. E. Durbin and D. E. Levy (1998). "Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7." Embo J **17**(22): 6660-9.

Marschner, A., S. Rothenfusser, V. Hornung, D. Prell, A. Krug, M. Kerkmann, D. Wellisch, H. Poeck, A. Greinacher, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann (2005). "CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **35**(8): 2347-57.

Marsters, S. A., J. P. Sheridan, R. M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A. D. Goddard, P. Godowski and A. Ashkenazi (1997). "A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain." Curr Biol **7**(12): 1003-6.

Martinez-Lorenzo, M. J., M. A. Alava, S. Gamen, K. J. Kim, A. Chuntharapai, A. Pineiro, J. Naval and A. Anel (1998). "Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells." Eur J Immunol **28**(9): 2714-25.

Martinou, J. C. and D. R. Green (2001). "Breaking the mitochondrial barrier." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 63-7.

Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-5.

Mayer, I. A., A. Verma, I. M. Grumbach, S. Uddin, F. Lekmine, F. Ravandi, B. Majchrzak, S. Fujita, E. N. Fish and L. C. Platanias (2001). "The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon-alpha in BCR-ABL-expressing cells." J Biol Chem **276**(30): 28570-7.

McWhirter, S. M., K. A. Fitzgerald, J. Rosains, D. C. Rowe, D. T. Golenbock and T. Maniatis (2004). "IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 233-8.

Means, T. K., E. Latz, F. Hayashi, M. R. Murali, D. T. Golenbock and A. D. Luster (2005). "Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9." J Clin Invest **115**(2): 407-17.

Medema, J. P., D. H. Schuurhuis, D. Rea, J. van Tongeren, J. de Jong, S. A. Bres, S. Laban, R. E. Toes, M. Toebes, T. N. Schumacher, B. A. Bladergroen, F. Ossendorp, J. A. Kummer, C. J. Melief and R. Offringa (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): 657-67.

Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.

Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." N Engl J Med **343**(5): 338-44.

Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition." Cell **91**(3): 295-8.

Melchjorsen, J., S. B. Jensen, L. Malmgaard, S. B. Rasmussen, F. Weber, A. G. Bowie, S. Matikainen and S. R. Paludan (2005). "Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner." J Virol **79**(20): 12944-51.

Melero, I., S. Hervas-Stubbs, M. Glennie, D. M. Pardoll and L. Chen (2007). "Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy." Nat Rev Cancer **7**(2): 95-106.

Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher and J. Tschopp (2004). "RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation." Nat Immunol **5**(5): 503-7.

Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager and J. Tschopp (2005). "Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus." Nature **437**(7062): 1167-72.

Mi, Q. S., D. Ly, S. E. Lamhamedi-Cherradi, K. V. Salojin, L. Zhou, M. Grattan, C. Meagher, P. Zucker, Y. H. Chen, J. Nagle, D. Taub and T. L. Delovitch (2003). "Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice." Diabetes **52**(8): 1967-75.

Miconnet, I., S. Koenig, D. Speiser, A. Krieg, P. Guillaume, J. C. Cerottini and P. Romero (2002). "CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide." J Immunol **168**(3): 1212-8.

Mirandola, P., C. Ponti, G. Gobbi, I. Sponzilli, M. Vaccarezza, L. Cocco, G. Zauli, P. Secchiero, F. A. Manzoli and M. Vitale (2004). "Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity." Blood **104**(8): 2418-24.

Miura, Y., Y. Koyanagi and H. Mizusawa (2003). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces neuronal apoptosis in HIV-encephalopathy." J Med Dent Sci **50**(1): 17-25.

Miyake, K. (2006). "Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors." J Endotoxin Res **12**(4): 195-204.

Miyamoto, M., T. Fujita, Y. Kimura, M. Maruyama, H. Harada, Y. Sudo, T. Miyata and T. Taniguchi (1988). "Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements." Cell **54**(6): 903-13.

Modur, V., R. Nagarajan, B. M. Evers and J. Milbrandt (2002). "FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer." J Biol Chem **277**(49): 47928-37.

Mohty, M., D. Isnardon, N. Vey, F. Briere, D. Blaise, D. Olive and B. Gaugler (2002). "Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34+/CD38- primitive haematopoietic progenitors." Br J Haematol **119**(1): 115-8.

Mohty, M., D. Jarrossay, M. Lafage-Pochitaloff, C. Zandotti, F. Briere, X. N. de Lamballeri, D. Isnardon, D. Sainty, D. Olive and B. Gaugler (2001). "Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment." Blood **98**(13): 3750-6.

Mohty, M., D. Olive and B. Gaugler (2004). "Plasmacytoid DCs and cancer: a new role for an enigmatic cell." Trends Immunol **25**(8): 397-8; author reply 398-9.

Mongkolsapaya, J., J. M. Grimes, N. Chen, X. N. Xu, D. I. Stuart, E. Y. Jones and G. R. Screaton (1999). "Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation." Nat Struct Biol **6**(11): 1048-53.

Morrison, B. H., J. A. Bauer, J. Hu, R. W. Grane, A. M. Ozdemir, M. Chawla-Sarkar, B. Gong, A. Almasan, D. V. Kalvakolanu and D. J. Lindner (2002). "Inositol hexakisphosphate kinase 2 sensitizes ovarian carcinoma cells to multiple cancer therapeutics." Oncogene **21**(12): 1882-9.

Moseman, E. A., X. Liang, A. J. Dawson, A. Panoskaltsis-Mortari, A. M. Krieg, Y. J. Liu, B. R. Blazar and W. Chen (2004). "Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **173**(7): 4433-42.

Motoki, K., E. Mori, A. Matsumoto, M. Thomas, T. Tomura, R. Humphreys, V. Albert, M. Muto, H. Yoshida, M. Aoki, T. Tamada, R. Kuroki, I. Ishida, C. F. Ware and S. Kataoka (2005). "Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2." Clin Cancer Res **11**(8): 3126-35.

Muppidi, J. R., J. Tschopp and R. M. Siegel (2004). "Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction." Immunity **21**(4): 461-5.

Musgrave, B. L., T. Phu, J. J. Butler, A. P. Makrigiannis and D. W. Hoskin (1999). "Murine TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) expression induced by T cell activation is blocked by rapamycin, cyclosporin A, and inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and protein tyrosine kinases: evidence

for TRAIL induction via the T cell receptor signaling pathway." Exp Cell Res **252**(1): 96-103.
Naka, T., K. Sugamura, B. L. Hylander, M. B. Widmer, Y. M. Rustum and E. A. Repasky (2002). "Effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with chemotherapeutic agents on patients' colon tumors grown in SCID mice." Cancer Res **62**(20): 5800-6.
Nakaya, T., M. Sato, N. Hata, M. Asagiri, H. Suemori, S. Noguchi, N. Tanaka and T. Taniguchi (2001). "Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection." Biochem Biophys Res Commun **283**(5): 1150-6.
Narita, M. (2006). "Human Plasmacytoid Dendritic Cell like Leukemia Cell Line (PMDC05) Established from a Patient with CD4+CD56+ Acute Leukemia". 48th annual meeting and expostion of American Society of Hematology, Orlando, Florida.
Negishi, H., Y. Ohba, H. Yanai, A. Takaoka, K. Honma, K. Yui, T. Matsuyama, T. Taniguchi and K. Honda (2005). "Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 15989-94.
Nguyen, H., C. V. Ramana, J. Bayes and G. R. Stark (2001). "Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression." J Biol Chem **276**(36): 33361-8.
Nguyen, T., W. Thomas, X. D. Zhang, C. Gray and P. Hersey (2000). "Immunologically-mediated tumour cell apoptosis: the role of TRAIL in T cell and cytokine-mediated responses to melanoma." Forum (Genova) **10**(3): 243-52.
Nimmanapalli, R., C. L. Perkins, M. Orlando, E. O'Bryan, D. Nguyen and K. N. Bhalla (2001). "Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels." Cancer Res **61**(2): 759-63.
Nishiya, T., E. Kajita, S. Miwa and A. L. Defranco (2005). "TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements." J Biol Chem **280**(44): 37107-17.
Novak, N., J. P. Allam, T. Hagemann, C. Jenneck, S. Laffer, R. Valenta, J. Kochan and T. Bieber (2004). "Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis." J Allergy Clin Immunol **114**(2): 364-70.
Obata, Y., K. Yamamoto, M. Miyazaki, K. Shimotohno, S. Kohno and T. Matsuyama (2005). "Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3." J Biol Chem **280**(18): 18355-60.
O'Doherty, U., M. Peng, S. Gezelter, W. J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj and R. M. Steinman (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." Immunology **82**(3): 487-93.
Oehadian, A., N. Koide, M. M. Mu, F. Hassan, S. Islam, T. Yoshida and T. Yokochi (2005). "Interferon (IFN)-beta induces apoptotic cell death in DHL-4 diffuse large B cell lymphoma cells through tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)." Cancer Lett **225**(1): 85-92.
Oganesyan, G., S. K. Saha, B. Guo, J. Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry and G. Cheng (2006). "Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response." Nature **439**(7073): 208-11.
Ohta, T., T. Kinoshita, M. Naito, T. Nozaki, M. Masutani, T. Tsuruo and A. Miyajima (1997). "Requirement of the caspase-3/CPP32 protease cascade for apoptotic death following cytokine deprivation in hematopoietic cells." J Biol Chem **272**(37): 23111-6.

Olweus, J., A. BitMansour, R. Warnke, P. A. Thompson, J. Carballido, L. J. Picker and F. Lund-Johansen (1997). "Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12551-6.

Osawa, Y., S. Iho, R. Takauji, H. Takatsuka, S. Yamamoto, T. Takahashi, S. Horiguchi, Y. Urasaki, T. Matsuki and S. Fujieda (2006). "Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **177**(7): 4841-52.

Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa and T. Seya (2003). "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." Nat Immunol **4**(2): 161-7.

Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto and T. Seya (2003). "TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta." J Biol Chem **278**(50): 49751-62.

Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-71.

Ozoren, N., K. Kim, T. F. Burns, D. T. Dicker, A. D. Moscioni and W. S. El-Deiry (2000). "The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." Cancer Res **60**(22): 6259-65.

Palamara, F., S. Meindl, M. Holcmann, P. Luhrs, G. Stingl and M. Sibilia (2004). "Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod." J Immunol **173**(5): 3051-61.

Pan, G., J. Ni, Y. F. Wei, G. Yu, R. Gentz and V. M. Dixit (1997). "An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL." Science **277**(5327): 815-8.

Pan, G., J. Ni, G. Yu, Y. F. Wei and V. M. Dixit (1998). "TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling." FEBS Lett **424**(1-2): 41-5.

Park, S. M., R. Schickel and M. E. Peter (2005). "Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 610-6.

Park, W. S., J. H. Lee, M. S. Shin, J. Y. Park, H. S. Kim, Y. S. Kim, S. N. Lee, W. Xiao, C. H. Park, S. H. Lee, N. J. Yoo and J. Y. Lee (2002). "Inactivating mutations of the caspase-10 gene in gastric cancer." Oncogene **21**(18): 2919-25.

Penna, G., S. Sozzani and L. Adorini (2001). "Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **167**(4): 1862-6.

Penna, G., M. Vulcano, S. Sozzani and L. Adorini (2002). "Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol **63**(12): 1164-71.

Perrot, I., D. Blanchard, N. Freymond, S. Isaac, B. Guibert, Y. Pacheco and S. Lebecque (2007). "Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage." J Immunol **178**(5): 2763-9.

Perry, A. K., E. K. Chow, J. B. Goodnough, W. C. Yeh and G. Cheng (2004). "Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection." J Exp Med **199**(12): 1651-8.

Perussia, B., V. Fanning and G. Trinchieri (1985). "A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses." Nat Immun Cell Growth Regul **4**(3): 120-37.

Petak, I., L. Douglas, D. M. Tillman, R. Vernes and J. A. Houghton (2000). "Pediatric rhabdomyosarcoma cell lines are resistant to Fas-induced apoptosis and highly sensitive to TRAIL-induced apoptosis." Clin Cancer Res **6**(10): 4119-27.

Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." Cell Death Differ **10**(1): 26-35.

Petrella, T., S. Dalac, M. Maynadie, F. Mugneret, E. Thomine, P. Courville, P. Joly, B. Lenormand, L. Arnould, J. Wechsler, M. Bagot, C. Rieux, J. Bosq, M. F. Avril, A. Bernheim, T. Molina, A. Devidas, M. H. Delfau-Larue, P. Gaulard and D. Lambert (1999). "CD4+ CD56+ cutaneous neoplasms: a distinct hematological entity? Groupe Francais d'Etude des Lymphomes Cutanes (GFELC)." Am J Surg Pathol **23**(2): 137-46.

Pitti, R. M., S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore and A. Ashkenazi (1996). "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family." J Biol Chem **271**(22): 12687-90.

Platanias, L. C. (2003). "The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling." Pharmacol Ther **98**(2): 129-42.

Platanias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." Nat Rev Immunol **5**(5): 375-86.

Pukac, L., P. Kanakaraj, R. Humphreys, R. Alderson, M. Bloom, C. Sung, T. Riccobene, R. Johnson, M. Fiscella, A. Mahoney, J. Carrell, E. Boyd, X. T. Yao, L. Zhang, L. Zhong, A. von Kerczek, L. Shepard, T. Vaughan, B. Edwards, C. Dobson, T. Salcedo and V. Albert (2005). "HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo." Br J Cancer **92**(8): 1430-41.

Pulendran, B., J. Banchereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, C. Maliszewski, J. Davoust, J. Fay and K. Palucka (2000). "Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo." J Immunol **165**(1): 566-72.

Rani, M. R. and R. M. Ransohoff (2005). "Alternative and accessory pathways in the regulation of IFN-beta-mediated gene expression." J Interferon Cytokine Res **25**(12): 788-98.

Reis e Sousa, C., P. D. Stahl and J. M. Austyn (1993). "Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro." J Exp Med **178**(2): 509-19.

Rissoan, M. C., T. Duhen, J. M. Bridon, N. Bendriss-Vermare, C. Peronne, B. de Saint Vis, F. Briere and E. E. Bates (2002). "Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells." Blood **100**(9): 3295-303.

Rissoan, M. C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt and Y. J. Liu (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." Science **283**(5405): 1183-6.

Rivera-Walsh, I., M. Waterfield, G. Xiao, A. Fong and S. C. Sun (2001). "NF-kappaB signaling pathway governs TRAIL gene expression and human T-cell leukemia virus-I Tax-induced T-cell death." J Biol Chem **276**(44): 40385-8.

Robinson, S. P., S. Patterson, N. English, D. Davies, S. C. Knight and C. D. Reid (1999). "Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells." Eur J Immunol **29**(9): 2769-78.

Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser and G. Schuler (1996). "Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability." J Immunol Methods **196**(2): 137-51.

Rubio-Moscardo, F., D. Blesa, C. Mestre, R. Siebert, T. Balasas, A. Benito, A. Rosenwald, J. Climent, J. I. Martinez, M. Schilhabel, E. L. Karran, S. Gesk, M. Esteller, R. deLeeuw, L. M. Staudt, J. L. Fernandez-Luna, D. Pinkel, M. J. Dyer and J. A. Martinez-Climent (2005). "Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes." Blood **106**(9): 3214-22.

Ruiz-Ruiz, C. and A. Lopez-Rivas (2002). "Mitochondria-dependent and -independent mechanisms in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis are both regulated by interferon-gamma in human breast tumour cells." Biochem J **365**(Pt 3): 825-32.

Rutz, M., J. Metzger, T. Gellert, P. Luppa, G. B. Lipford, H. Wagner and S. Bauer (2004). "Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner." Eur J Immunol **34**(9): 2541-50.

Saas, P. and P. Tiberghien (2002). "Dendritic cells: to where do they lead?" Transplantation **73**(1 Suppl): S12-5.

Saha, S. K., E. M. Pietras, J. Q. He, J. R. Kang, S. Y. Liu, G. Oganesyan, A. Shahangian, B. Zarnegar, T. L. Shiba, Y. Wang and G. Cheng (2006). "Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif." Embo J **25**(14): 3257-63.

Saitoh, T., A. Tun-Kyi, A. Ryo, M. Yamamoto, G. Finn, T. Fujita, S. Akira, N. Yamamoto, K. P. Lu and S. Yamaoka (2006). "Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1." Nat Immunol **7**(6): 598-605.

Sakahira, H., M. Enari and S. Nagata (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." Nature **391**(6662): 96-9.

Salio, M., M. Cella, W. Vermi, F. Facchetti, M. J. Palmowski, C. L. Smith, D. Shepherd, M. Colonna and V. Cerundolo (2003). "Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions." Eur J Immunol **33**(4): 1052-62.

Salio, M., M. J. Palmowski, A. Atzberger, I. F. Hermans and V. Cerundolo (2004). "CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens." J Exp Med **199**(4): 567-79.

Sandor, F., E. Latz, F. Re, L. Mandell, G. Repik, D. T. Golenbock, T. Espevik, E. A. Kurt-Jones and R. W. Finberg (2003). "Importance of extra- and intracellular domains of TLR1 and TLR2 in NFkappa B signaling." J Cell Biol **162**(6): 1099-110.

Sanjuan, M. A., N. Rao, K. T. Lai, Y. Gu, S. Sun, A. Fuchs, W. P. Fung-Leung, M. Colonna and L. Karlsson (2006). "CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion." J Cell Biol **172**(7): 1057-68.

Sato, K., S. Hida, H. Takayanagi, T. Yokochi, N. Kayagaki, K. Takeda, H. Yagita, K. Okumura, N. Tanaka, T. Taniguchi and K. Ogasawara (2001). "Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta." Eur J Immunol **31**(11): 3138-46.

Sato, M., N. Hata, M. Asagiri, T. Nakaya, T. Taniguchi and N. Tanaka (1998). "Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7." FEBS Lett **441**(1): 106-10.

Sato, M., H. Suemori, N. Hata, M. Asagiri, K. Ogasawara, K. Nakao, T. Nakaya, M. Katsuki, S. Noguchi, N. Tanaka and T. Taniguchi (2000). "Distinct and essential roles of

transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction." Immunity **13**(4): 539-48.
Sato, M., N. Tanaka, N. Hata, E. Oda and T. Taniguchi (1998). "Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene." FEBS Lett **425**(1): 112-6.
Savill, J., C. Gregory and C. Haslett (2003). "Cell biology. Eat me or die." Science **302**(5650): 1516-7.
Sayers, T. J., A. D. Brooks, C. Y. Koh, W. Ma, N. Seki, A. Raziuddin, B. R. Blazar, X. Zhang, P. J. Elliott and W. J. Murphy (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP." Blood **102**(1): 303-10.
Schmidt, C. (2006). "Toll-like receptor therapies compete to reduce side effects." Nat Biotechnol **24**(3): 230-1.
Schmitz, I., S. Kirchhoff and P. H. Krammer (2000). "Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways." Int J Biochem Cell Biol **32**(11-12): 1123-36.
Schoenemeyer, A., B. J. Barnes, M. E. Mancl, E. Latz, N. Goutagny, P. M. Pitha, K. A. Fitzgerald and D. T. Golenbock (2005). "The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling." J Biol Chem **280**(17): 17005-12.
Schotte, R., M. C. Rissoan, N. Bendriss-Vermare, J. M. Bridon, T. Duhen, K. Weijer, F. Briere and H. Spits (2003). "The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development." Blood **101**(3): 1015-23.
Schroder, K., M. J. Sweet and D. A. Hume (2006). "Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages." Immunobiology **211**(6-8): 511-24.
Schroeder, J. T., A. P. Bieneman, H. Xiao, K. L. Chichester, K. Vasagar, S. Saini and M. C. Liu (2005). "TLR9- and FcepsilonRI-mediated responses oppose one another in plasmacytoid dendritic cells by down-regulating receptor expression." J Immunol **175**(9): 5724-31.
Sedger, L. M., D. M. Shows, R. A. Blanton, J. J. Peschon, R. G. Goodwin, D. Cosman and S. R. Wiley (1999). "IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression." J Immunol **163**(2): 920-6.
Seeds, R. E., S. Gordon and J. L. Miller (2006). "Receptors and ligands involved in viral induction of type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells." Immunobiology **211**(6-8): 525-35.
Ségal-Bendirdjian, E. (1999). "Mort cellulaire: signalisation et exécution de l'apoptose." Hématologie **5**(5): 376-87.
Seki, N., Y. Hayakawa, A. D. Brooks, J. Wine, R. H. Wiltrout, H. Yagita, J. E. Tanner, M. J. Smyth and T. J. Sayers (2003). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis is an important endogenous mechanism for resistance to liver metastases in murine renal cancer." Cancer Res **63**(1): 207-13.
Seth, R. B., L. Sun and Z. J. Chen (2006). "Antiviral innate immunity pathways." Cell Res **16**(2): 141-7.
Seth, R. B., L. Sun, C. K. Ea and Z. J. Chen (2005). "Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3." Cell **122**(5): 669-82.
Seya, T., H. Oshiumi, M. Sasai, T. Akazawa and M. Matsumoto (2005). "TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons." Int J Biochem Cell Biol **37**(3): 524-9.

Sharma, S., B. R. tenOever, N. Grandvaux, G. P. Zhou, R. Lin and J. Hiscott (2003). "Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway." Science **300**(5622): 1148-51.
Shen, F., Z. Hu, J. Goswami and S. L. Gaffen (2006). "Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes." J Biol Chem **281**(34): 24138-48.
Sheridan, J. P., S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski and A. Ashkenazi (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." Science **277**(5327): 818-21.
Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell **9**(3): 459-70.
Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake and M. Kimoto (1999). "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4." J Exp Med **189**(11): 1777-82.
Shin, M. S., H. S. Kim, C. S. Kang, W. S. Park, S. Y. Kim, S. N. Lee, J. H. Lee, J. Y. Park, J. J. Jang, C. W. Kim, S. H. Kim, J. Y. Lee, N. J. Yoo and S. H. Lee (2002). "Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas." Blood **99**(11): 4094-9.
Shinohara, M. L., L. Lu, J. Bu, M. B. Werneck, K. S. Kobayashi, L. H. Glimcher and H. Cantor (2006). "Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells." Nat Immunol **7**(5): 498-506.
Sidbury, R., N. Neuschler, E. Neuschler, P. Sun, X. Q. Wang, R. Miller, M. Tomai, E. Puscasiu, S. Gugneja and A. S. Paller (2003). "Topically applied imiquimod inhibits vascular tumor growth in vivo." J Invest Dermatol **121**(5): 1205-9.
Sidky, Y. A., E. C. Borden, C. E. Weeks, M. J. Reiter, J. F. Hatcher and G. T. Bryan (1992). "Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine." Cancer Res **52**(13): 3528-33.
Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Luthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee and W. J. Boyle (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." Cell **89**(2): 309-19.
Sioud, M. (2006). "Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors." Trends Mol Med **12**(4): 167-76.
Sivori, S., M. Falco, M. Della Chiesa, S. Carlomagno, M. Vitale, L. Moretta and A. Moretta (2004). "CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(27): 10116-21.
Smit, J. J., B. D. Rudd and N. W. Lukacs (2006). "Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus." J Exp Med **203**(5): 1153-9.
Smith, K. A. (2006). "The structure of IL2 bound to the three chains of the IL2 receptor and how signaling occurs." Med Immunol **5**: 3.
Smyth, M. J., E. Cretney, K. Takeda, R. H. Wiltrout, L. M. Sedger, N. Kayagaki, H. Yagita and K. Okumura (2001). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

(TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis." J Exp Med **193**(6): 661-70.
Smyth, M. J., K. Takeda, Y. Hayakawa, J. J. Peschon, M. R. van den Brink and H. Yagita (2003). "Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy." Immunity **18**(1): 1-6.
Song, K., Y. Chen, R. Goke, A. Wilmen, C. Seidel, A. Goke and B. Hilliard (2000). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression." J Exp Med **191**(7): 1095-104.
Soumelis, V., I. Scott, F. Gheyas, D. Bouhour, G. Cozon, L. Cotte, L. Huang, J. A. Levy and Y. J. Liu (2001). "Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients." Blood **98**(4): 906-12.
Spies, B., H. Hochrein, M. Vabulas, K. Huster, D. H. Busch, F. Schmitz, A. Heit and H. Wagner (2003). "Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice." J Immunol **171**(11): 5908-12.
Spits, H., F. Couwenberg, A. Q. Bakker, K. Weijer and C. H. Uittenbogaart (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): 1775-84.
Sprick, M. R., E. Rieser, H. Stahl, A. Grosse-Wilde, M. A. Weigand and H. Walczak (2002). "Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8." Embo J **21**(17): 4520-30.
Sprick, M. R., M. A. Weigand, E. Rieser, C. T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P. H. Krammer and H. Walczak (2000). "FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2." Immunity **12**(6): 599-609.
Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
Stetson, D. B. and R. Medzhitov (2006). "Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response." Immunity **24**(1): 93-103.
Strater, J. and P. Moller (2000). "Expression and function of death receptors and their natural ligands in the intestine." Ann N Y Acad Sci **915**: 162-70.
Strober, W., P. J. Murray, A. Kitani and T. Watanabe (2006). "Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2." Nat Rev Immunol **6**(1): 9-20.
Suhara, W., M. Yoneyama, T. Iwamura, S. Yoshimura, K. Tamura, H. Namiki, S. Aimoto and T. Fujita (2000). "Analyses of virus-induced homomeric and heteromeric protein associations between IRF-3 and coactivator CBP/p300." J Biochem (Tokyo) **128**(2): 301-7.
Sun, Q., L. Sun, H. H. Liu, X. Chen, R. B. Seth, J. Forman and Z. J. Chen (2006). "The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses." Immunity **24**(5): 633-42.
Svensson, H., B. Cederblad, M. Lindahl and G. Alm (1996). "Stimulation of natural interferon-alpha/beta-producing cells by Staphylococcus aureus." J Interferon Cytokine Res **16**(1): 7-16.
Szanto, A., V. Narkar, Q. Shen, I. P. Uray, P. J. Davies and L. Nagy (2004). "Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions." Cell Death Differ **11 Suppl 2**: S126-43.

Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak and T. Taniguchi (2005). "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors." Nature **434**(7030): 243-9.

Takauji, R., S. Iho, H. Takatsuka, S. Yamamoto, T. Takahashi, H. Kitagawa, H. Iwasaki, R. Iida, T. Yokochi and T. Matsuki (2002). "CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors." J Leukoc Biol **72**(5): 1011-9.

Takeda, K., Y. Hayakawa, M. J. Smyth, N. Kayagaki, N. Yamaguchi, S. Kakuta, Y. Iwakura, H. Yagita and K. Okumura (2001). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells." Nat Med **7**(1): 94-100.

Takeda, K., T. Kaisho and S. Akira (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.

Takeda, K., M. J. Smyth, E. Cretney, Y. Hayakawa, N. Kayagaki, H. Yagita and K. Okumura (2002). "Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development." J Exp Med **195**(2): 161-9.

Takeuchi, K., Y. Motoda and F. Ito (2006). "Role of transcription factor activator protein 1 (AP1) in epidermal growth factor-mediated protection against apoptosis induced by a DNA-damaging agent." Febs J **273**(16): 3743-55.

Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda and S. Akira (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." Int Immunol **13**(7): 933-40.

Tallant, T., A. Deb, N. Kar, J. Lupica, M. J. de Veer and J. A. DiDonato (2004). "Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells." BMC Microbiol **4**: 33.

Tang, Q. and J. A. Bluestone (2006). "Plasmacytoid DCs and T(reg) cells: casual acquaintance or monogamous relationship?" Nat Immunol **7**(6): 551-3.

Taniguchi, T., K. Ogasawara, A. Takaoka and N. Tanaka (2001). "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." Annu Rev Immunol **19**: 623-55.

Taniguchi, T. and A. Takaoka (2001). "A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(5): 378-86.

Taniguchi, T. and A. Takaoka (2002). "The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors." Curr Opin Immunol **14**(1): 111-6.

Thome, M., P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meinl, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J. L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P. H. Krammer, M. E. Peter and J. Tschopp (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." Nature **386**(6624): 517-21.

Tighe, H., K. Takabayashi, D. Schwartz, G. Van Nest, S. Tuck, J. J. Eiden, A. Kagey-Sobotka, P. S. Creticos, L. M. Lichtenstein, H. L. Spiegelberg and E. Raz (2000). "Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity." J Allergy Clin Immunol **106**(1 Pt 1): 124-34.

Tordjman, R., Y. Lepelletier, V. Lemarchandel, M. Cambot, P. Gaulard, O. Hermine and P. H. Romeo (2002). "A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response." Nat Immunol **3**(5): 477-82.

Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." Nat Rev Immunol **2**(10): 735-47.

Treilleux, I., J. Y. Blay, N. Bendriss-Vermare, I. Ray-Coquard, T. Bachelot, J. P. Guastalla, A. Bremond, S. Goddard, J. J. Pin, C. Barthelemy-Dubois and S. Lebecque (2004). "Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer." Clin Cancer Res **10**(22): 7466-74.

Triantafilou, K., G. Orthopoulos, E. Vakakis, M. A. Ahmed, D. T. Golenbock, P. M. Lepper and M. Triantafilou (2005). "Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent." Cell Microbiol **7**(8): 1117-26.

Trinchieri, G., D. Santoli, R. R. Dee and B. B. Knowles (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.

Tsujimura, H., T. Tamura, H. J. Kong, A. Nishiyama, K. J. Ishii, D. M. Klinman and K. Ozato (2004). "Toll-like receptor 9 signaling activates NF-kappaB through IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein in dendritic cells." J Immunol **172**(11): 6820-7.

Uddin, S., F. Lekmine, N. Sharma, B. Majchrzak, I. Mayer, P. R. Young, G. M. Bokoch, E. N. Fish and L. C. Platanias (2000). "The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins." J Biol Chem **275**(36): 27634-40.

Uddin, S., A. Sassano, D. K. Deb, A. Verma, B. Majchrzak, A. Rahman, A. B. Malik, E. N. Fish and L. C. Platanias (2002). "Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727." J Biol Chem **277**(17): 14408-16.

Uematsu, S. and S. Akira (2006). "Toll-like receptors and innate immunity." J Mol Med.

Uematsu, S., S. Sato, M. Yamamoto, T. Hirotani, H. Kato, F. Takeshita, M. Matsuda, C. Coban, K. J. Ishii, T. Kawai, O. Takeuchi and S. Akira (2005). "Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon-{alpha} induction." J Exp Med **201**(6): 915-23.

Urosevic, M., R. Dummer, C. Conrad, M. Beyeler, E. Laine, G. Burg and M. Gilliet (2005). "Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid predendritic cells following imiquimod treatment." J Natl Cancer Inst **97**(15): 1143-53.

Vanbervliet, B., N. Bendriss-Vermare, C. Massacrier, B. Homey, O. de Bouteiller, F. Briere, G. Trinchieri and C. Caux (2003). "The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12." J Exp Med **198**(5): 823-30.

Vanden Eijnden, S., S. Goriely, D. De Wit, M. Goldman and F. Willems (2006). "Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns." Eur J Immunol **36**(1): 21-6.

Verhagen, A. M., J. Silke, P. G. Ekert, M. Pakusch, H. Kaufmann, L. M. Connolly, C. L. Day, A. Tikoo, R. Burke, C. Wrobel, R. L. Moritz, R. J. Simpson and D. L. Vaux (2002). "HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins." J Biol Chem **277**(1): 445-54.

Vermi, W., R. Bonecchi, F. Facchetti, D. Bianchi, S. Sozzani, S. Festa, A. Berenzi, M. Cella and M. Colonna (2003). "Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas." J Pathol **200**(2): 255-68.

Vermi, W., E. Riboldi, V. Wittamer, F. Gentili, W. Luini, S. Marrelli, A. Vecchi, J. D. Franssen, D. Communi, L. Massardi, M. Sironi, A. Mantovani, M. Parmentier, F. Facchetti and S. Sozzani (2005). "Role of ChemR23 in directing the migration of

myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin." J Exp Med **201**(4): 509-15.
Vicari, A. P., C. Chiodoni, C. Vaure, S. Ait-Yahia, C. Dercamp, F. Matsos, O. Reynard, C. Taverne, P. Merle, M. P. Colombo, A. O'Garra, G. Trinchieri and C. Caux (2002). "Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody." J Exp Med **196**(4): 541-9.
Vidalain, P. O., O. Azocar, B. Lamouille, A. Astier, C. Rabourdin-Combe and C. Servet-Delprat (2000). "Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells." J Virol **74**(1): 556-9.
Vollmer, J., S. Tluk, C. Schmitz, S. Hamm, M. Jurk, A. Forsbach, S. Akira, K. M. Kelly, W. H. Reeves, S. Bauer and A. M. Krieg (2005). "Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8." J Exp Med **202**(11): 1575-85.
Waibler, Z., U. Kalinke, J. Will, M. H. Juan, J. M. Pfeilschifter and H. H. Radeke (2007). "TLR-ligand stimulated interleukin-23 subunit expression and assembly is regulated differentially in murine plasmacytoid and myeloid dendritic cells." Mol Immunol **44**(7): 1483-1489.
Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich (2002). "TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy." Apoptosis **7**(5): 449-59.
Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin and C. T. Rauch (1997). "TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL." Embo J **16**(17): 5386-97.
Wandinger, K. P., J. D. Lunemann, O. Wengert, J. Bellmann-Strobl, O. Aktas, A. Weber, E. Grundstrom, S. Ehrlich, K. D. Wernecke, H. D. Volk and F. Zipp (2003). "TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis." Lancet **361**(9374): 2036-43.
Wang, J., H. J. Chun, W. Wong, D. M. Spencer and M. J. Lenardo (2001). "Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13884-8.
Wang, J., L. Zheng, A. Lobito, F. K. Chan, J. Dale, M. Sneller, X. Yao, J. M. Puck, S. E. Straus and M. J. Lenardo (1999). "Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II." Cell **98**(1): 47-58.
Wang, J. P., P. Liu, E. Latz, D. T. Golenbock, R. W. Finberg and D. H. Libraty (2006). "Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition." J Immunol **177**(10): 7114-21.
Wang, Q., Y. Ji, X. Wang and B. M. Evers (2000). "Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human TRAIL gene." Biochem Biophys Res Commun **276**(2): 466-71.
Wang, Q., X. Wang, A. Hernandez, M. R. Hellmich, Z. Gatalica and B. M. Evers (2002). "Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells." J Biol Chem **277**(39): 36602-10.
Wang, R., L. Zhang, X. Zhang, J. Moreno, X. Luo, M. Tondravi and Y. Shi (2001). "Differential regulation of the expression of CD95 ligand, receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), and TNF-alpha during T cell activation." J Immunol **166**(3): 1983-90.

Wang, S. and W. S. El-Deiry (2003). "Requirement of p53 targets in chemosensitization of colonic carcinoma to death ligand therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15095-100.
Wang, S. H., Z. Cao, J. M. Wolf, M. Van Antwerp and J. R. Baker, Jr. (2005). "Death ligand tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand inhibits experimental autoimmune thyroiditis." Endocrinology **146**(11): 4721-6.
Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." Genes Dev **15**(22): 2922-33.
Wang, X., M. Li, H. Zheng, T. Muster, P. Palese, A. A. Beg and A. Garcia-Sastre (2000). "Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon." J Virol **74**(24): 11566-73.
Warren, T. L., C. E. Dahle and G. J. Weiner (2000). "CpG oligodeoxynucleotides enhance monoclonal antibody therapy of a murine lymphoma." Clin Lymphoma **1**(1): 57-61.
Wathelet, M. G., C. H. Lin, B. S. Parekh, L. V. Ronco, P. M. Howley and T. Maniatis (1998). "Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo." Mol Cell **1**(4): 507-18.
Weaver, B. K., K. P. Kumar and N. C. Reich (1998). "Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1." Mol Cell Biol **18**(3): 1359-68.
Weaver, C. T., L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli and K. M. Murphy (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." Immunity **24**(6): 677-88.
Wen, J., N. Ramadevi, D. Nguyen, C. Perkins, E. Worthington and K. Bhalla (2000). "Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells." Blood **96**(12): 3900-6.
Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith and et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." Immunity **3**(6): 673-82.
Willems, F. (2006). DC responses in human newborns. 16ème Congrès Européen d'Immunologie., Paris.
Williams, B. R. (2001). "Signal integration via PKR." Sci STKE **2001**(89): RE2.
Willis, S., C. L. Day, M. G. Hinds and D. C. Huang (2003). "The Bcl-2-regulated apoptotic pathway." J Cell Sci **116**(Pt 20): 4053-6.
Xu, L. G., Y. Y. Wang, K. J. Han, L. Y. Li, Z. Zhai and H. B. Shu (2005). "VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling." Mol Cell **19**(6): 727-40.
Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda and S. Akira (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." Science **301**(5633): 640-3.
Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda and S. Akira (2002). "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4." Nature **420**(6913): 324-9.
Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda and S. Akira (2003). "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway." Nat Immunol **4**(11): 1144-50.
Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda and S. Akira (2002). "Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that

preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling." J Immunol **169**(12): 6668-72.
Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones and X. Wang (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." Science **275**(5303): 1129-32.
Yang, Y., I. Tikhonov, T. J. Ruckwardt, M. Djavani, J. C. Zapata, C. D. Pauza and M. S. Salvato (2003). "Monocytes treated with human immunodeficiency virus Tat kill uninfected CD4(+) cells by a tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism." J Virol **77**(12): 6700-8.
Yang, Y. L., L. F. Reis, J. Pavlovic, A. Aguzzi, R. Schafer, A. Kumar, B. R. Williams, M. Aguet and C. Weissmann (1995). "Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase." Embo J **14**(24): 6095-106.
Yi, A. K., R. Tuetken, T. Redford, M. Waldschmidt, J. Kirsch and A. M. Krieg (1998). "CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species." J Immunol **160**(10): 4755-61.
Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato and T. Fujita (2005). "Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity." J Immunol **175**(5): 2851-8.
Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-7.
Yoneyama, M., W. Suhara, Y. Fukuhara, M. Fukuda, E. Nishida and T. Fujita (1998). "Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300." Embo J **17**(4): 1087-95.
Zamai, L., M. Ahmad, I. M. Bennett, L. Azzoni, E. S. Alnemri and B. Perussia (1998). "Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells." J Exp Med **188**(12): 2375-80.
Zamzami, N. and G. Kroemer (2001). "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 67-71.
Zelenay, S., F. Elias and J. Flo (2003). "Immunostimulatory effects of plasmid DNA and synthetic oligodeoxynucleotides." Eur J Immunol **33**(5): 1382-92.
Zerafa, N., J. A. Westwood, E. Cretney, S. Mitchell, P. Waring, M. Iezzi and M. J. Smyth (2005). "Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies." J Immunol **175**(9): 5586-90.
Zhang, G. (2004). "Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding." Curr Opin Struct Biol **14**(2): 154-60.
Zhang, M., X. Li, X. Pang, L. Ding, O. Wood, K. Clouse, I. Hewlett and A. I. Dayton (2001). "Identification of a potential HIV-induced source of bystander-mediated apoptosis in T cells: upregulation of trail in primary human macrophages by HIV-1 tat." J Biomed Sci **8**(3): 290-6.
Zhang, X. D., A. V. Franco, T. Nguyen, C. P. Gray and P. Hersey (2000). "Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells." J Immunol **164**(8): 3961-70.
Zhang, X. D., X. Y. Zhang, C. P. Gray, T. Nguyen and P. Hersey (2001). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria." Cancer Res **61**(19): 7339-48.

Zhang, Z. and F. S. Wang (2005). "Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses." Cell Mol Immunol **2**(6): 411-7.

Zhao, J., H. J. Kong, H. Li, B. Huang, M. Yang, C. Zhu, M. Bogunovic, F. Zheng, L. Mayer, K. Ozato, J. Unkeless and H. Xiong (2006). "IRF-8/interferon (IFN) consensus sequence-binding protein is involved in Toll-like receptor (TLR) signaling and contributes to the cross-talk between TLR and IFN-gamma signaling pathways." J Biol Chem **281**(15): 10073-80.

Zheng, L., C. L. Trageser, D. M. Willerford and M. J. Lenardo (1998). "T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death." J Immunol **160**(2): 763-9.

Zheng, T. S. and R. A. Flavell (1999). "Apoptosis. All's well that ends dead." Nature **400**(6743): 410-1.

Zhou, H., I. Wertz, K. O'Rourke, M. Ultsch, S. Seshagiri, M. Eby, W. Xiao and V. M. Dixit (2004). "Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO." Nature **427**(6970): 167-71.

Zou, H., Y. Li, X. Liu and X. Wang (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem **274**(17): 11549-56.

Zou, W., V. Machelon, A. Coulomb-L'Hermin, J. Borvak, F. Nome, T. Isaeva, S. Wei, R. Krzysiek, I. Durand-Gasselin, A. Gordon, T. Pustilnik, D. T. Curiel, P. Galanaud, F. Capron, D. Emilie and T. J. Curiel (2001). "Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells." Nat Med **7**(12): 1339-46.

Zwaveling, S., S. C. Ferreira Mota, J. Nouta, M. Johnson, G. B. Lipford, R. Offringa, S. H. van der Burg and C. J. Melief (2002). "Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides." J Immunol **169**(1): 350-8.

RÉSUMÉ

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC) représentent une nouvelle entité distincte de cellules dendritiques. Elles peuvent sécréter de grandes quantités d'interféron de type I après stimulation par un virus ou des produits bactériens tels que les CpG ODN grâce à leur expression sélective des Toll-*like* récepteurs (TLR)7 et 9.

Notre laboratoire a récemment développé une lignée de PDC (GEN2.2) à partir de leucémies à PDC (LPDC), qui résistent aux thérapies conventionnelles. Les GEN2.2 partagent la plupart des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des PDC normales. Nous avons d'abord utilisé cette lignée comme modèle de LPDC et nous montrons qu'elles sont sensibles à l'apoptose induite par TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) *via* l'expression du récepteur DR5, comme la plupart des LPDC, alors que les PDC normales ne le sont pas, ce qui permettrait la mise en place de thérapies des leucémies à PDC utilisant des agonistes de TRAIL.

Les PDC normales sont difficiles à isoler ou générer. Nous avons donc ensuite utilisé la lignée GEN2.2 comme modèle de PDC normales. Nous avons ainsi découvert que ces cellules, une fois activées par des ligands des TLR7 et 9, acquièrent une fonction cytotoxique *via* l'expression de TRAIL et peuvent tuer des cellules tumorales. Les PDC pourraient donc jouer un rôle crucial dans l'éradication des cancers après activation.

Enfin, nous avons cherché à préciser les mécanismes moléculaires d'induction de TRAIL dans les PDC après activation par des ligands des TLR7 et 9.

L'ensemble des travaux suggère que les PDC pourraient représenter une cible de choix dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques anti-tumorales.

ABSTRACT

Plasmacytoid dendritic cells (PDC) represent a new distinct entity of dendritic cells. They are able to secrete high amounts of type I interferon upon viral exposure or stimulation by bacterial products such as CpG ODN due to their selective expression of Toll-like receptors (TLR)7 et 9.

Our laboratory has recently developed a PDC cell line (GEN2.2) derived from PDC leukemia (LPDC), which resist to conventional therapy. GEN2.2 share most of the phenotypic and functional features of normal PDC. We first used this cell line as a LPDC model and we show that they are sensitive to TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)-induced apoptosis *via* the expression of the receptor DR5, like most of the LPDC, whereas normal PDC are not, allowing the setting of PDC leukaemia therapies using TRAIL agonists.

Normal PDC are difficult to isolate or to generate. We then used the GEN2.2 cell line as a normal PDC model. We thus discovered that these cells, once activated by TLR7 and 9 ligands, acquire a cytotoxic function *via* TRAIL expression and are able to kill tumoral cells. Therefore, PDC could play a crucial role in eradicating cancer, after activation.

Finally, we tried to specify the molecular mechanisms for TRAIL induction in PDC upon activation with TLR7 and 9 ligands.

Altogether, this work suggest that PDC could represent a key target in the development of new tantitumoral therapeutic approaches.

MOTS-CLEFS

cellules dendritiques plasmacytoïdes – leucémie - apoptose - TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) - influenza - TLR (Toll-Like Recepteurs) - IFN de type I – thérapie antitumorale