

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

**UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE
AIX MARSEILLE II**

THÈSE

En vue d'obtenir le titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Karine SERRE

Le 30 Janvier 2002

Présentation d'Antigènes Exogènes
par les Cellules Dendritiques,
aux Lymphocytes T CD4 et aux Lymphocytes T CD8,
in vitro et in vivo

Directeur de thèse : Patrick Machy

Thèse soutenue devant le jury composé de :

Pr. Philippe NAQUET

Dr. Muriel MOSER

Pr. Frédéric TRIEBEL

Dr. Claude LECLERC

Dr. Patrick MACHY

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur scientifique

Remerciements

Pour ses discussions enrichissantes, son esprit critique, et sa disponibilité aussi bien sur un plan scientifique mais surtout humain, je remercie très chaleureusement Patrick Machy. J'apprécie énormément ta liberté de parole et d'écoute, mais tu sais déjà cela.

Je remercie Lee Leserman de m'avoir accueillie dans son équipe au sein du Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy et d'avoir supervisé mon travail avec enthousiasme. Son soutien et sa confiance m'ont été très bénéfiques durant ces années.

Je tiens également à remercier Muriel Moser, Frédéric Triebel, Claude Leclerc et Philippe Naquet qui me font l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je suis très reconnaissante à Laurent Giraud pour m'avoir supportée durant tant d'heures "hottement lamineuses" et pour les rares fois où mon "flux" a dépassé ma pensée.

J'adresse mes remerciements à toute l'équipe d'Anne-Marie Schmitt-Verhulst pour sa clémence envers mes délits d'anticorps, à Claude Boyer pour m'avoir "encouragée" à passer ma thèse, et à Annick Guimezanes pour m'avoir permis de me sustenter à la Sogères.

Merci aussi à Olivier Wurtz pour m'avoir laissée exercer mon talent artistique sur sa voiture, et Marc Bajénoff "for technical assistance".

Je remercie diététiquement Michel Buferne pour ses pâtes au basilic, et pour sa bonne humeur contagieuse ainsi que pour son (pro)verbe affûté.

Un merci fort en couleurs pour Geneviève Victorero, qui ne s'est jamais lassée de prodiguer tous les conseils nécessaires pour me permettre d'affronter "les choses de la vie".

Delph, je ne peux écrire cette page sans t'adresser ici un clin d'œil. Merci à toi pour les soirées à 10 sous, pour les 3 B, pour cette grange mille fois restaurée, et pour toutes les questions sans réponses qui nous ont animées.

Si quelqu'un a bien su me donner force et courage, durant ces périodes, c'est à toi Laurence que je le dois.

J'espère aussi que "le club des cinq" va "vire volter" pendant encore longtemps !!

Comment exprimer tout ce que j'éprouve à l'égard de mes parents ?

Ils m'ont toujours fait confiance et m'ont toujours soutenue quelle que soit la décision que je prenais. Un simple merci serait bien maussade en regard de tout cela.

Sommaire

Liste des figures	6
Abréviations	7
Résumé	8
Introduction : Pourquoi s'intéresser aux cellules dendritiques ?	9
Objectifs et questions posées dans ce travail	12
I)- Les cellules dendritiques	17
1)- Origine des cellules dendritiques	17
1.1)- <i>Les précurseurs des cellules dendritiques myéloïdes</i>	19
1.2)- <i>Les précurseurs des cellules dendritiques lymphoïdes</i>	20
1.3)- <i>CD8α : un marqueur de l'ontogénie des cellules dendritiques ?</i>	22
2)- Distribution tissulaire des cellules dendritiques in vivo	24
2.1)- <i>Les cellules dendritiques de la peau</i>	25
2.1.1)- Les cellules de Langerhans	25
2.1.2)- Les cellules dendritiques interstitielles	26
2.2)- <i>Les cellules dendritiques circulantes</i>	27
2.2.1)- Les cellules dendritiques du sang périphérique	27
2.2.2)- Les cellules dendritiques de la lymphe afférente	28
2.3)- <i>Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes</i>	29
3)- Les cellules dendritiques: un lien majeur entre l'immunité innée et l'immunité acquise	37
3.1)- <i>Les cellules dendritiques et leurs fonctions dans l'immunité innée</i>	37
3.2)- <i>Les cellules dendritiques et leurs fonctions dans l'immunité acquise</i>	38
4)- Différents mécanismes de capture des pathogènes et des antigènes	40
4.1)- <i>Reconnaissance non spécifique</i>	41
4.2)- <i>Reconnaissance directe des pathogènes par des récepteurs</i>	42
4.2.1)- Les récepteurs de la famille Toll	43
4.2.2)- Les récepteurs au mannose	47
4.2.3)- Les récepteurs aux cellules nécrotiques ou apoptotiques	49
4.3)- <i>Reconnaissance indirecte des pathogènes par des récepteurs</i>	50
4.3.1)- Les récepteurs au complément	50
4.3.2)- Les récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines	51
5)- La maturation des cellules dendritiques	60
5.1)- <i>Les changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels</i>	62
5.2)- <i>Induction de la maturation des cellules dendritiques par différents stimuli</i>	64
6)- Les propriétés de migration des cellules dendritiques	68
6.1)- <i>Migration des cellules dendritiques de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires</i>	69

6.2)- *Circulation moléculaire de la peau vers les ganglions cutanés via la lymphe afférente* 72

7)- Les propriétés de présentation antigénique dans le contexte des molécules du CMH par les cellules dendritiques 74

7.1)- *Présentation d'antigènes exogènes par les molécules de classe II du CMH* 74

7.1.1)- Structure et trafic intracellulaire des molécules de classe II 74

7.1.2)- La voie d'endocytose et le chargement en peptides des molécules de classe I 77

7.1.3)- Les voies de présentation de l'antigène par les molécules de classe II dans les cellules dendritiques 80

7.1.4)- Régulation de la présentation antigénique lors de la maturation des cellules dendritiques 82

7.1.5)- Agencement des complexes CMH/peptides à la surface des cellules dendritiques : la synapse immunologique 83

7.2)- *Présentation d'antigènes par les molécules de classe I du CMH* 86

7.2.1)- Structure et trafic intracellulaire des molécules de classe I 86

7.2.2)- Le protéasome génère des peptides destinés à la présentation dans le contexte des molécules de classe I 90

7.2.3)- Présentation d'antigènes exogènes dans le contexte des molécules de classe I par les cellules dendritiques 91

7.2.4)- Les différentes formes d'antigènes permettant la présentation croisée 92

8)- Les cellules dendritiques et leurs fonctions de régulation de l'immunité acquise 94

8.1)- *Les cellules dendritiques sont impliquées dans la tolérance centrale et périphérique* 94

8.1.1)- Les cellules dendritiques et la tolérance centrale 94

8.1.2)- Les cellules dendritiques et la tolérance périphérique 94

8.1.3)- Modulation de l'immunogénicité des cellules dendritiques par les tumeurs 97

8.2)- *Rôle des cellules dendritiques dans la polarisation des lymphocytes T CD4 vers Th1 et Th2* 97

8.2.1)- Les lymphocytes T CD4 Th1 et Th2 97

8.2.2)- Les propriétés de polarisation des populations de cellules dendritiques CD8 α - et CD8 α + 98

8.2.3)- La production de cytokines par les cellules dendritiques CD8 α - et CD8 α + 99

8.3)- *Rôle des cellules dendritiques dans l'activation des lymphocytes T CD8* 102

8.3.1)- Les populations de cellules dendritiques, CD8 α - et CD8 α +, responsables de la présentation croisée 102

8.3.2)- Le dialogue à trois partenaires : les lymphocytes T CD4, les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD8 103

II)- Le contexte et le système expérimental 109

1)- Le contexte 109

2)- Le système expérimental 110

2.1)- *Les liposomes* 110

2.1.1)- Structure et caractéristiques 110

2.1.2)- Interactions avec les cellules et mécanismes d'entrée 113

2.1.3)- Devenir des liposomes injectés in vivo 116

2.1.4)- Quelles sont les cellules qui capturent les liposomes et qui initient la réponse immune ?	117
2.2)- <i>Approche expérimentale utilisée in vitro</i>	119
2.2.1)- Les cellules présentatrices d'antigènes	119
2.2.2)- Les antigènes	119
2.2.3)- Les lymphocytes T	120
2.3)- <i>Approche expérimentale utilisée in vivo</i>	120
III)- Articles	123
1)- Présentation aux lymphocytes T CD4 par les cellules dendritiques in vitro	125
2)- Présentation aux lymphocytes T CD8 par les cellules dendritiques in vitro	132
3)- Rôles des lymphocytes T CD4 dans l'acquisition des propriétés d'activation des lymphocytes T CD8 par les cellules dendritiques	136
4)- Présentation aux lymphocytes T CD4 et CD8 in vivo	141
IV)- Discussion	148
V)- Bibliographie	159

Liste des figures

- Figure 1 : Physiologie des cellules dendritiques.
- Figure 2 : Plan de l'introduction.
- Figure 3 : Les différentes populations de cellules dendritiques générées *in vitro*.
- Figure 4 : Anatomie de la pulpe blanche de la rate.
- Figure 5 : Anatomie des ganglions lymphatiques.
- Figure 6 : Cinq populations de DC caractérisées et localisées dans les amygdales humaines.
- Figure 7 : Dialogues entre une cellule dendritique et un lymphocyte T CD4.
- Figure 8 : Ligand et signalisation intracellulaire des récepteurs de la famille Toll.
- Figure 9 : Représentation schématique des récepteurs aux fragments Fc des IgG humaines.
- Figure 10 : Signalisation intracellulaire et internalisation sous le récepteur aux fragments Fc des IgG chez l'homme.
- Figure 11 : Molécules et récepteurs exprimés par les DC responsables de l'activation et/ou de la capture d'antigènes.
- Figure 12 : Programme de maturation et de présentation antigénique des cellules dendritiques.
- Figure 13 : Les cellules dendritiques sont sensibles à de nombreux stimuli.
- Figure 14 : Migration des cellules de Langerhans jusqu'aux zones T des ganglions.
- Figure 15 : Circulation des molécules dans le ganglion lymphatique en fonction de leur poids moléculaire et de leur taille.
- Figure 16 : Structure des molécules de classe II.
- Figure 17 : Transport et chargement en peptides des molécules de classe II.
- Figure 18 : Transport des molécules de classe II dans les différents compartiments de la voie d'endocytose.
- Figure 19 : Trois voies de chargement en peptides des molécules de classe II dans les DC.
- Figure 20 : La synapse immunologique.
- Figure 21 : Structure des molécules de classe I.
- Figure 22 : Transport et chargement en peptides des molécules de classe I.
- Figure 23 : Contrôle de la tolérance périphérique par les cellules dendritiques.
- Figure 24 : Rôle des cellules dendritiques dans la polarisation des lymphocytes T CD4.
- Figure 25 : Rôle des lymphocytes T CD4 dans l'acquisition, par les cellules dendritiques, des propriétés de stimulation des lymphocytes T CD8.
- Figure 26 : Composition et formation des liposomes utilisés.
- Figure 27 : Systèmes de ciblage des liposomes à la surface cellulaire.
- Figure 28 : Rôle des lymphocytes T CD4 dans l'acquisition de la propriété de présentation par les molécules de classe I, par les DC.
- Figure 29 : Propriétés des DC à polariser des lymphocytes T CD4 vers Th1 ou Th2, en fonction de l'organisation des molécules de classe II exprimées à leur surface membranaire.
- Figure 30 : Contrôle de la tolérance périphérique et de l'induction d'une immunité par les DC.

Abréviations

ADN—Acide désoxyribonucléique

APC—Antigen-Presenting Cell (cellule présentatrice d'antigène)

ARN—Acide ribonucléique

ARNm—Acide ribonucléique messager

ATP—Adénosine triphosphate

BCR—B cell receptor

CFA—Adjuvant complet de Freund

CIIV—Class II-containing Vesicles

CLIP—MHC class-II associated invariant chain peptide

CMH—Complexe Majeur d'histocompatibilité

DC—Dendritic cells (Cellules dendritiques)

DC-CK1—Dendritic Cell-derived chemokine

DC-SIGN—Dendritic Cell-Specific Icam Grabbing Non integrin

DEC-205—Dendritic and Epithelial Cells (glycoprotéine membranaire de 205kDa)

DNP—Dinitrophenyl

ELC—EBV-induced molecule-1 ligand chemokine (MIP-3 β = Exodus-3)

FcR—Récepteur aux fragments Fc des immunoglobulines

GM-CSF—Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

HEL—Hen Egg Lysozyme

HEV—High Endothelial Venules

IDC—Interdigitating dendritic cell

IFN—Interféron

Ig—Immunoglobuline

IL—Interleukine

Lag—Langerhans Associated Granule

LAG-3—Lymphocyte Activation Gene-3

LAMP-1—Lysosomal Associated Membrane Proteins = CD107a

LBP—LPS-Binding Protein

LPS—Lipopolysaccharide

MCP—Monocyte Chemoattractant Protein

MDC—Macrophage-derived chemokine

MIIC—MHC class II enriched compartment

MIP—Macrophage Inflammatory Protein (MIP-1 α = LARC = Exodus)

OVA—Ovalbumine

PALS—Periarteriolar Lymphoid Sheaths (zone T de la rate)

PAMPs—Pathogen Antigen Molecules Pattern

PRRs—Pattern Recognition Receptor

RANK—Receptor Activator of NF- κ B

RANTES—Regulated Upon Activation, normal T-cell Expressed and Secreted

SLC—Secondary Lymphoid organ Chemokine (6Ckine = TCA4 = Exodus-2)

SMAC—SupraMolecular Activation Cluster

TAP—Transporter associated with Antigen Processing

TARC—Thymus and Activation-Regulated Chemokine

TCR—T cell receptor

TGF—Transforming Growth Factor

Th—T helper

TNF—Tumor Necrosis Factor

TRANCE—Tumor necrosis factor (TNF)-Related Activation-Induced Cytokine

Résumé

Nous étudions, *in vitro* et *in vivo*, les relations existant entre la forme d'un antigène et les propriétés de capture et de présentation, par des cellules dendritiques, aux lymphocytes T CD4 et aux lymphocytes T CD8 naïfs. Les cellules dendritiques expriment divers récepteurs responsables, non seulement de l'internalisation des antigènes, mais aussi, de l'activation cellulaire. Nous comparons diverses formes d'antigènes : solubles, protéiques ou peptidiques, ou bien vésiculaires, c'est-à-dire encapsulés dans des liposomes. Ces derniers sont des vésicules artificielles, constituées de phospholipides organisés en bicouches, renfermant un compartiment aqueux dans lequel peuvent être retenus des antigènes. Ils sont dirigés de façon spécifique sur les récepteurs Fc.

Ces liposomes, contenant l'antigène et capturés par les récepteurs Fc des cellules dendritiques, permettent la présentation aux lymphocytes T CD4 et CD8, par les molécules de classe II et par les molécules de classe I, respectivement, à des concentrations 10000 fois plus faibles que le même antigène soluble. La présentation aux lymphocytes T CD8 est dépendante du protéasome et de TAP, ce qui indique que l'antigène est transporté dans le cytosol puis dans le réticulum endoplasmique des cellules dendritiques, où des peptides sont associés aux molécules de classe I. La présentation par les molécules de classe II est acquise très précocement lors de la différenciation en cellules dendritiques, alors que la présentation par les molécules de classe I nécessite un stade développemental plus tardif. Ceci suggère que l'accessibilité aux compartiments de chargement des molécules de classe I est un processus régulé dans les cellules dendritiques, dépendant de leur état de "maturation". Nous montrons que les lymphocytes T CD4, reconnaissant leur antigène sur les cellules dendritiques, induisent le transport des antigènes exogènes des compartiments d'endocytose vers le cytosol, permettant l'association avec les molécules de classe I naissantes. Ceci pourrait expliquer le rôle des lymphocytes T CD4 dans l'établissement des réponses cytotoxiques.

Enfin, nous avons étudié chez la souris, les premières étapes conduisant à l'activation de lymphocytes T *in vivo*, en fonction de la forme d'antigène injecté dans les coussinets plantaires. Les liposomes sont plus efficaces, que l'antigène sous forme soluble ou en présence de LPS ou de CFA, pour délivrer des antigènes aux cellules dendritiques. Celles-ci se localisent alors dans les ganglions drainants avec un phénotype mature et présentent des peptides dérivés des antigènes aux lymphocytes T CD4 et aux lymphocytes T CD8. Tout comme nous l'avons observé *in vitro*, la présentation d'antigène exogène est dépendante de TAP, et les lymphocytes T CD4 endogènes, jouent un rôle important dans l'induction de l'activation des lymphocytes T CD8.

Il est important de tirer profit des mécanismes développés par les cellules dendritiques pour reconnaître des pathogènes. Ainsi pour les applications vaccinales il faut tenir compte des récepteurs responsables du processus de présentation des cellules dendritiques, et de leur état de maturation, afin d'induire une immunité protectrice, efficace, et mémoire.

Mots clés : Cellules dendritiques, Récepteur Fc, présentation antigénique *in vitro* et *in vivo*, lymphocytes T CD4 et CD8, molécules de classe II et de classe I du CMH, liposomes.

Introduction : Pourquoi s'intéresser aux cellules dendritiques ?

Une attention toute particulière est portée sur les cellules dendritiques (DC) parce qu'elles jouent un rôle prépondérant dans l'établissement de réponses immunes primaires (Banchereau and Steinman, 1998; Hart, 1997; Steinman, 1991). Elles sont présentes dans tout l'organisme, dotant le système immunitaire d'un outil de surveillance des plus efficaces, ce qui leur a valu, d'ailleurs, la dénomination de "sentinelles". Bien qu'il ait été démontré que les DC puissent avoir diverses origines, et qu'il n'existe pas une unique population mais bel et bien une famille de sous populations, toutes conservent ces propriétés extraordinaires de présentation d'antigène et de stimulation de lymphocytes T naïfs.

Schématiquement, les progéniteurs des DC sont issus de la moelle osseuse. Des précurseurs entrent dans la circulation sanguine et colonisent les tissus périphériques où ils se différencient en DC dites "immatures". Elles sont caractérisées par des propriétés de capture antigénique extrêmement importantes. Leur rôle de sentinelle implique qu'elles doivent détecter la présence de pathogènes dès leur entrée dans l'organisme. Pour cela les DC expriment de nombreux récepteurs reconnaissant des structures communes aux micro-organismes (Pearson, 1996), comme les récepteurs de la famille Toll (Kopp and Medzhitov, 1999) et les récepteurs au mannose (MMR, DEC-205) (Stahl and Ezekowitz, 1998). Elles sont, ainsi, sensibles aux toxines produites par les pathogènes (Rescigno et al., 1999).

Les DC sont aussi considérées comme des cellules de l'immunité innée (Clark et al., 2000). Non seulement elles capturent les pathogènes, mais elles agissent aussi directement sur les cellules environnantes, en produisant de grandes quantités de cytokines, telles que IL-12 et interféron de type I et II. Les DC participent ainsi à l'initiation d'une réaction inflammatoire sur le site d'infection. Il a ainsi été démontré qu'elles stimulent les NK et les lymphocytes NKT à sécréter des cytokines et à tuer les pathogènes ou les cellules infectées.

De plus, les DC sont considérées comme un lien majeur entre l'immunité innée et l'immunité acquise (Palucka and Banchereau, 1999a; Palucka and Banchereau, 1999b). En effet, elles capturent des pathogènes et antigènes, sous diverses formes (solubles, complexes immuns, corps apoptotiques, ...) et par différents moyens (récepteurs au mannose, au complément, aux portions Fc des immunoglobulines, ...), afin de présenter aux lymphocytes T, des peptides associés aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II ou de classe I. En présence de pathogènes, ou d'un contexte inflammatoire, les DC s'engagent dans un processus complexe de maturation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (sites de mise en place de la réponse). Ces DC, alors dites "matures", ont subi de nombreux changements qui ont conduit à l'acquisition de leur fonction de présentation d'antigènes.

Non seulement les DC ont la capacité, qu'elles ne partagent avec aucune autre cellule, de pouvoir activer des lymphocytes T CD4 ou CD8 naïfs, mais de plus, elles contrôlent la qualité de la réponse T en régulant les diverses classes de lymphocytes T "helpers" (Th1, Th2) (Moser and Murphy, 2000). Les DC sont également capables d'interagir avec des lymphocytes

B et de participer à leur activation, nécessaire pour la production d'anticorps (MacPherson et al., 1999). Les lymphocytes T naïfs recirculent principalement au sein des organes lymphoïdes secondaires, mais une fois qu'ils ont été stimulés, ils quittent ces organes et migrent jusqu'au site d'infection où ils exercent leurs fonctions effectrices afin d'éliminer les pathogènes. Un schéma descriptif des différentes étapes de mise en place d'une réponse immune contre un pathogène est présenté dans la [figure 1](#).

Cependant, induire l'immunité, ne pourrait être qu'une partie seulement des propriétés des DC. Il est de plus en plus évident que ces cellules participent activement au maintien de la tolérance périphérique (Sallusto and Lanzavecchia, 1999; Steinman et al., 2000). Elles peuvent dans ce contexte, tolérer directement des lymphocytes T mais également générer des lymphocytes T régulateurs capables de moduler l'activation d'autres lymphocytes T. Cette propriété est extrêmement intéressante pour le contrôle de l'auto-immunité et pour la réjection des transplantations (Thomson and Lu, 1999). Comment les DC peuvent-elles être à l'origine de tant de fonctions différentes et contradictoires, avec autant d'efficacité ? Cette diversité fonctionnelle semble reposer sur l'hétérogénéité des populations existantes, et sur l'incroyable plasticité de ces cellules.

Grâce à leur formidable potentiel à activer une réponse lymphocytaire T contre un antigène donné, les DC semblent être des actrices prometteuses dans de nombreux cas de vaccination et d'immuno-intervention pour induire, par exemple, une immunité anti-tumorale (Grabbe et al., 1995; Nouri-Shirazi et al., 2000; Schuler and Steinman, 1997), ou encore pour induire une tolérance dans les cas de maladies auto-immunes ou allergiques. À l'évidence, utiliser les DC, qui sont actuellement pressenties comme un candidat "adjuvant" optimal afin d'orienter ou moduler la réponse immune, est une approche séduisante (Citterio et al., 1999; Moser et al., 1995). De telles approches nécessitent cependant des étapes capitales de compréhension de la physiologie des DC et des paramètres contrôlant l'acquisition et la présentation des antigènes. C'est dans cet objectif que nous nous sommes intéressés aux propriétés des DC dans le contexte de l'activation du système immunitaire et de l'induction d'une réponse contre un antigène donné. Nous avons développé un modèle, volontairement réductionniste mais autant que possible physiologique, permettant *in vitro* et *in vivo* d'étudier les propriétés des DC à capturer et présenter des antigènes exogènes afin de stimuler des lymphocytes T. Nous nous sommes intéressés tout particulièrement aux mécanismes de reconnaissance et de capture des antigènes, en tentant de définir les caractéristiques requises de ces antigènes, qui permettent d'obtenir une efficacité maximale de présentation par les DC. Nous tenterons, de comprendre comment ces cellules acquièrent les propriétés de stimulation des lymphocytes T CD4 et quel est le rôle de ces derniers dans l'activation des lymphocytes T CD8 pour la mise en place des réponses cytotoxiques.

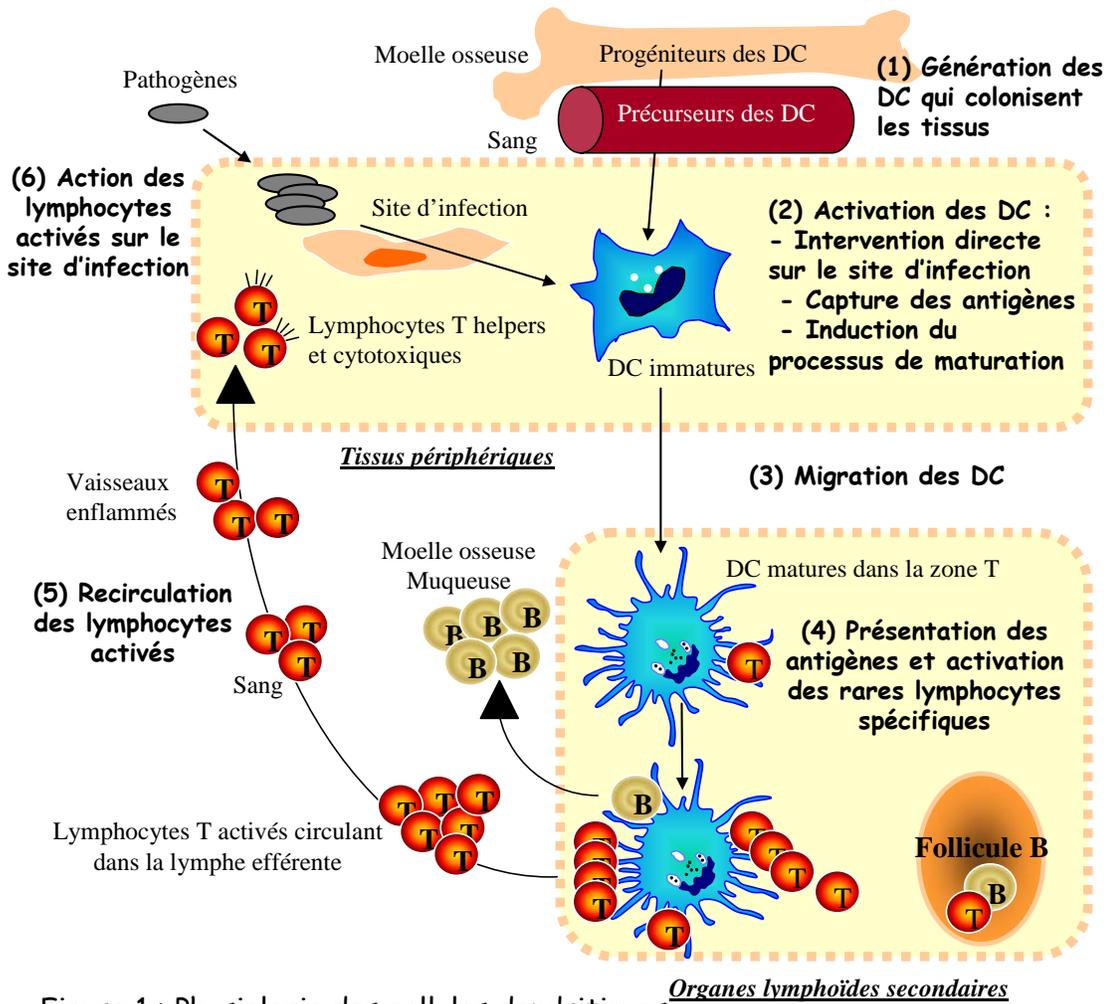


Figure 1 : Physiologie des cellules dendritiques.

Des précurseurs circulent dans le sang et colonisent les tissus périphériques, où ils se différencient en DC immatures. Ces dernières ont un rôle de sentinelles du système immunitaire, à l'affût de toute intrusion par des agents infectieux. Lorsqu'elles reçoivent un signal adéquat, ces DC immatures capturent des antigènes et quittent les tissus en direction des organes lymphoïdes secondaires. Après un processus complexe de maturation, elles présentent des peptides, dérivés des antigènes, en association avec les molécules du CMH, aux rares lymphocytes T CD4 et CD8. Ces derniers sont alors activés et, en réponse, induisent le stade terminal de maturation des DC qui supporte la prolifération et la différenciation de ces lymphocytes. A la fin de ce processus les DC meurent par apoptose. Les lymphocytes T activés migrent dans les tissus périphériques, au site d'infection, car ils sont sensibles aux cytokines et chimiokines de l'inflammation. Les lymphocytes T helpers sécrètent des interleukines et les lymphocytes T cytotoxiques éliminent les cellules infectées si nécessaire. Les lymphocytes B, quant à eux, se différencient en plasmocytes dans les organes lymphoïdes, après contact avec les lymphocytes T activés par les DC, puis ils migrent en des sites variés comme la moelle osseuse, où ils produisent des anticorps, qui pourront éventuellement neutraliser les pathogènes.

Adapté de Banchereau, J. et Steinman, R., Nature. 1998, 392: 245-252 Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

Objectifs et questions posées dans ce travail

L'étape initiale de mise en place d'une réponse immunitaire est la reconnaissance des antigènes exogènes. Deux cellules présentatrices d'antigènes, qui expriment les molécules de classe II, ont des propriétés toutes particulières : les DC pour leur aptitude à capturer et à présenter aux lymphocytes T naïfs, diverses formes d'antigènes et, les lymphocytes B pour leur capacité à exprimer un récepteur spécifique à un antigène; le BCR. Afin d'étudier les événements qui conduisent les DC à présenter des antigènes exogènes dans le contexte des molécules du CMH aux lymphocytes T CD4, nous les avons tout d'abord comparé *in vitro* avec les lymphocytes B. Nous avons voulu comprendre ce que sont les antigènes pour les DC, en définissant leurs caractéristiques nécessaires pour être efficacement présentés. Dans le but de délivrer un antigène à volonté dans un type cellulaire donné, nous avons comparé différentes formes d'antigènes; solubles, et vésiculaires reconnus par un récepteur. Nous utilisons un système de transport, les liposomes, capable de délivrer un antigène de manière efficace et spécifiquement sur un récepteur. Les propriétés particulièrement intéressantes des liposomes sont leur taille (proche de celle d'un virus ou d'une bactérie) et la présence de ligands à leur surface, qui permettent de les opsoniser et d'agréger les molécules cibles sur lesquelles ils sont dirigés.

Les propriétés d'endocytose en phase fluide des DC ne paraissent pas suffisantes à la capture antigénique, mis à part pour de très fortes concentrations qui sont alors de relevance physiologique discutable. Il est donc logique de supposer l'existence de récepteurs ayant les mêmes propriétés que le BCR, permettant aux DC de détecter les antigènes. De bons candidats semblent être les récepteurs appartenant à la famille des récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines (FcR). Nous avons étudié l'effet de l'engagement et de l'agréation du FcR, sur les propriétés de présentation antigénique et nous comparons ainsi étroitement les deux récepteurs qui semblent avoir des fonctions analogues, le BCR des lymphocytes B et le FcR des DC.

L'étape qui suit la reconnaissance d'un antigène est sa présentation et la conversion des informations reçues par les DC en signaux compréhensibles par les lymphocytes T. Les DC ont la capacité de présenter des antigènes exogènes dans le contexte du CMH de classe II et I et peuvent donc activer respectivement des lymphocytes T CD4 helpers (Sallusto and Lanzavecchia, 1994) et des CD8 cytotoxiques (Inaba et al., 1987). La capture d'un antigène exogène est généralement suivie de sa dégradation partielle ou totale par des processus enzymatiques ou chimiques ayant lieu dans différents compartiments de la voie d'endocytose. Brièvement, les antigènes exogènes sont internalisés dans des vésicules de dégradation, où les peptides issus de la protéolyse sont associés aux molécules du CMH de classe II. L'association des peptides avec les molécules classe I s'effectue, quant à elle, dans le

réticulum endoplasmique, ce qui nécessite un devenir intracellulaire différent, et le passage de l'antigène dans le cytoplasme. Nous avons étudié les interactions, spécifiques d'un antigène, existant entre les DC et les lymphocytes T CD4 et CD8 qui conduisent à l'activation optimale des lymphocytes et à l'acquisition des programmes effecteurs.

La forme de l'antigène internalisé par les DC, impliquant tel ou tel récepteur ou molécule, a d'importantes conséquences sur les bases moléculaires impliquées dans sa présentation et également sur le devenir des lymphocytes T CD4. Nous avons analysé l'influence de la forme de l'antigène sur le potentiel de présentation des DC et évalué les conséquences sur l'activation des lymphocytes T en termes de prolifération, de sécrétion de cytokines des lymphocytes T CD4, et de cytotoxicité des lymphocytes T CD8.

Dans de nombreux cas, l'activation des lymphocytes T CD8 est complexe et requiert la présence de lymphocytes T CD4 helpers activés (Pardoll and Topalian, 1998; Toes et al., 1999). Ce phénomène est désigné sous le terme de "help". Une première interaction entre DC et lymphocyte T CD4 a pour conséquence l'activation du lymphocyte T CD4 qui en retour stimule la DC (Lanzavecchia, 1998). Cette DC stimulée peut, à présent induire l'expansion et la différenciation de lymphocytes T CD8 naïfs. Le mécanisme par lequel les lymphocytes CD4 apportent le "help" n'est pas encore totalement élucidé. Nous avons tenté de comprendre les mécanismes d'activation des lymphocytes T CD4 par les DC et le rôle prépondérant de cette interaction CD4/DC dans la stimulation de lymphocytes T CD8, notamment afin d'identifier les mécanismes et les bases moléculaires impliquées dans le "help" fourni par les lymphocytes T CD4 aux DC.

Enfin, dans le cadre de la vaccination, qui a pour but de mettre en place une immunité rapide, puissante et mémoire contre des pathogènes, les problèmes liés à la faible immunogénicité des peptides ou des protéines solubles ont rendu nécessaire l'ajout d'adjuvant. Il nous est donc apparu important de confronter les résultats obtenus *in vitro* avec une réalité physiologique existant *in vivo*. Dans ce but, nous avons comparé diverses formes d'antigènes, en présence ou non d'adjuvants, pour leur potentiel à permettre l'activation de lymphocytes T *in vivo*. En définitive, nous avons essayé de comprendre comment un antigène est appréhendé par le système immunitaire et tenté de répondre aux questions suivantes :

Comment les DC "perçoivent-elles" les antigènes *in vitro* ?

Quelles sont les conséquences de la forme de l'antigène sur l'acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes T CD4 et CD8 ?

Comment les lymphocytes T CD4 conditionnent les DC pour stimuler des lymphocytes T CD8 ?

Comment un antigène est-il "perçu" par le système immunitaire *in vivo* ?

Quelle est la forme de l'antigène la plus efficace pour induire l'activation des lymphocytes T CD4 et des lymphocytes T CD8 *in vivo* ?

Dans un premier temps, nous introduirons de façon descriptive l'originalité et la complexité des DC, en suivant un plan basé sur la physiologie de ces cellules (Figure 2).

Ensuite, nous présenterons les résultats obtenus :

1) Présentation d'antigènes dans le contexte des molécules de classe II *in vitro*

- comparaison des propriétés de présentation d'antigènes exogènes aux lymphocytes T CD4 par des lymphocytes B et des DC (Serre et al., 1998),

2) Présentation d'antigènes dans le contexte des molécules de classe I *in vitro*

- mise en évidence des processus de régulation des propriétés de présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD8 par les DC (Machy et al., 2000),

3) Rôles des lymphocytes T CD4 dans l'acquisition des propriétés d'activation des lymphocytes T CD8 par les cellules dendritiques

- contrôle, par les lymphocytes T CD4, de la présentation dans le contexte des molécules de classe I des DC (Machy et al., 2002),

4) Présentation d'antigènes dans le contexte des molécules de classe II et de classe I *in vivo*

- identification des cellules responsables de la capture des liposomes *in vivo* et analyse de leurs propriétés à activer des lymphocytes T CD4 et CD8 (Serre et al., 2002).

Enfin, nous discuterons les résultats obtenus pendant ce travail et les perspectives, à plus ou moins long terme, qui peuvent être envisagées.

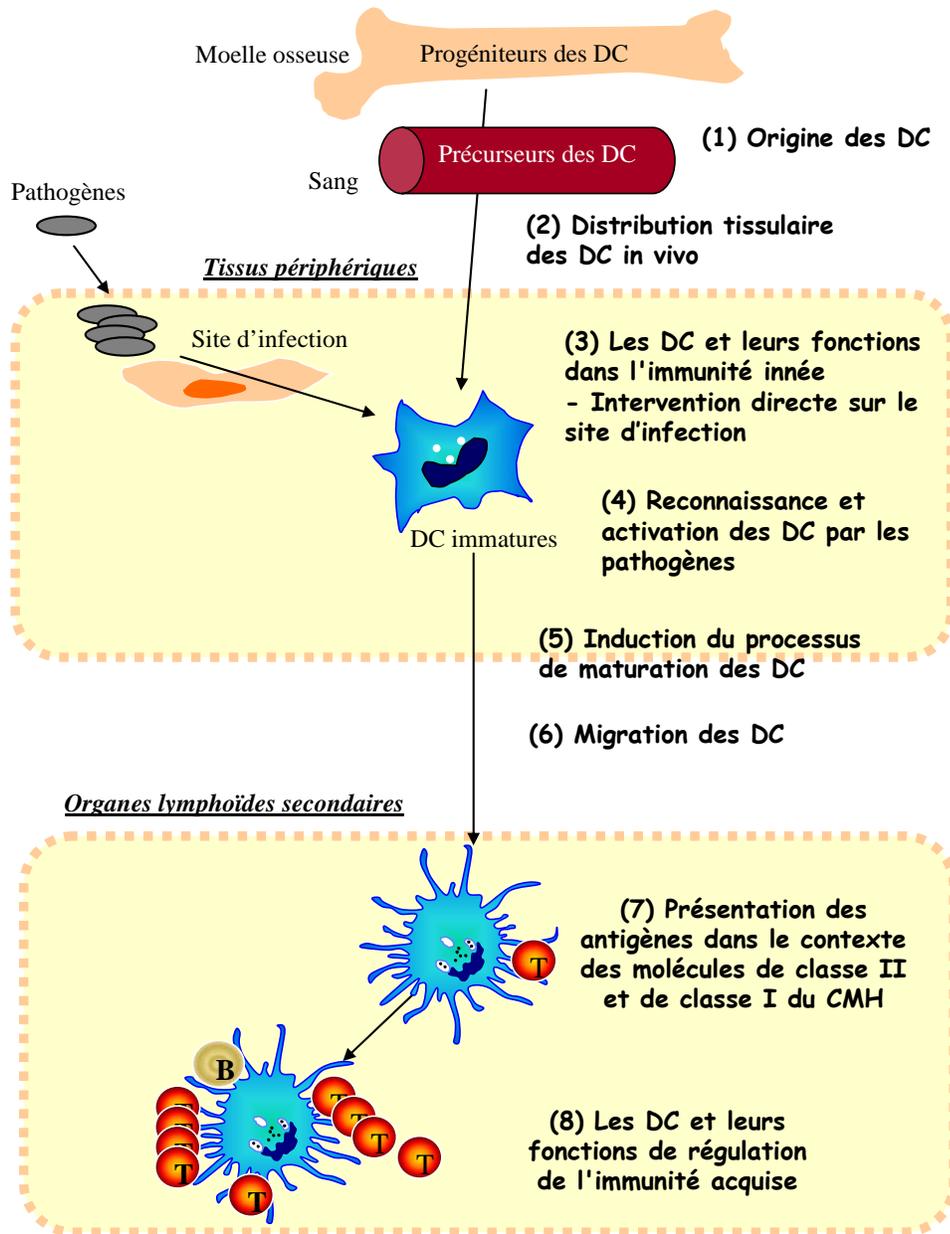


Figure 2 : Plan de l'introduction.
 Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

Introduction

I)- Les cellules dendritiques

A partir de 1973 des études approfondies conduites par Ralph Steinman ont commencé à caractériser une nouvelle population cellulaire et à révéler leur extraordinaire propriété à induire des réactions mixtes lymphocytaires (Steinman and Cohn, 1973). Elles ont été identifiées dans la rate de souris grâce à leur morphologie typique, de longues extensions cytoplasmiques, ou dendrites, qui leur valu le nom de cellules dendritiques (DC). Nous tenterons de comprendre dans cette introduction pourquoi les DC sont si fascinantes par leur rôle crucial dans l'initiation de la réponse immunitaire, mais aussi à cause de l'élégance avec laquelle elles remplissent leurs multiples fonctions.

1)- Origine des cellules dendritiques

L'absence de marqueurs spécifiques des DC, et leur rareté *in vivo* ont rendu difficiles l'étude et la caractérisation de ces cellules, notamment immatures, et plus encore de leurs précurseurs. Les DC ont une définition bien plus fonctionnelle que phénotypique. Elles sont caractérisées principalement par leur morphologie (présence de longues dendrites à l'état mature), par leurs propriétés d'endocytose et de capture de l'antigène, par leur forte expression des molécules du CMH de classe II et de costimulation, et par leur capacité à stimuler des lymphocytes T. La complexité de l'ontogénie des DC s'illustre par diverses constatations : 1) elles sont dérivées à partir de différents précurseurs, 2) différentes DC peuvent être générées à partir d'un même précurseur, 3) différentes populations de DC sont présentes dans des tissus aussi variés que la peau, le sang, et les organes lymphoïdes. Il ne faut vraisemblablement pas considérer les DC comme un type cellulaire unique, mais plutôt comme un système cellulaire.

Les DC n'étant que très faiblement représentées au sein de l'organisme, tant dans les tissus que dans les liquides biologiques, leur étude a été grandement facilitée dès lors qu'il a été possible de les générer *in vitro* grâce à des cytokines recombinantes. Les DC "immatures" sont générées continuellement à partir de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ces dernières se différencient en précurseurs myéloïdes ou en précurseurs lymphoïdes. Grâce à l'étude de l'expression de marqueurs phénotypiques à la fois chez l'homme et chez la souris, deux populations de DC, l'une dite "myéloïde" et l'autre dite "lymphoïde" ont été mises en évidence. L'ontogénie de ces cellules semblerait être différente puisque les DC myéloïdes partagent un précurseur commun avec les cellules de type myéloïde (monocytes, macrophages, neutrophiles, granulocytes, basophiles), alors que les DC lymphoïdes partagent un précurseur commun avec les lymphocytes (lymphocytes T, lymphocytes B). La corrélation entre le modèle murin et le modèle humain n'étant pas parfaite, et parfois même contradictoire, nous développerons les résultats séparément et essayerons de voir si ces dénominations sont encore d'actualité.

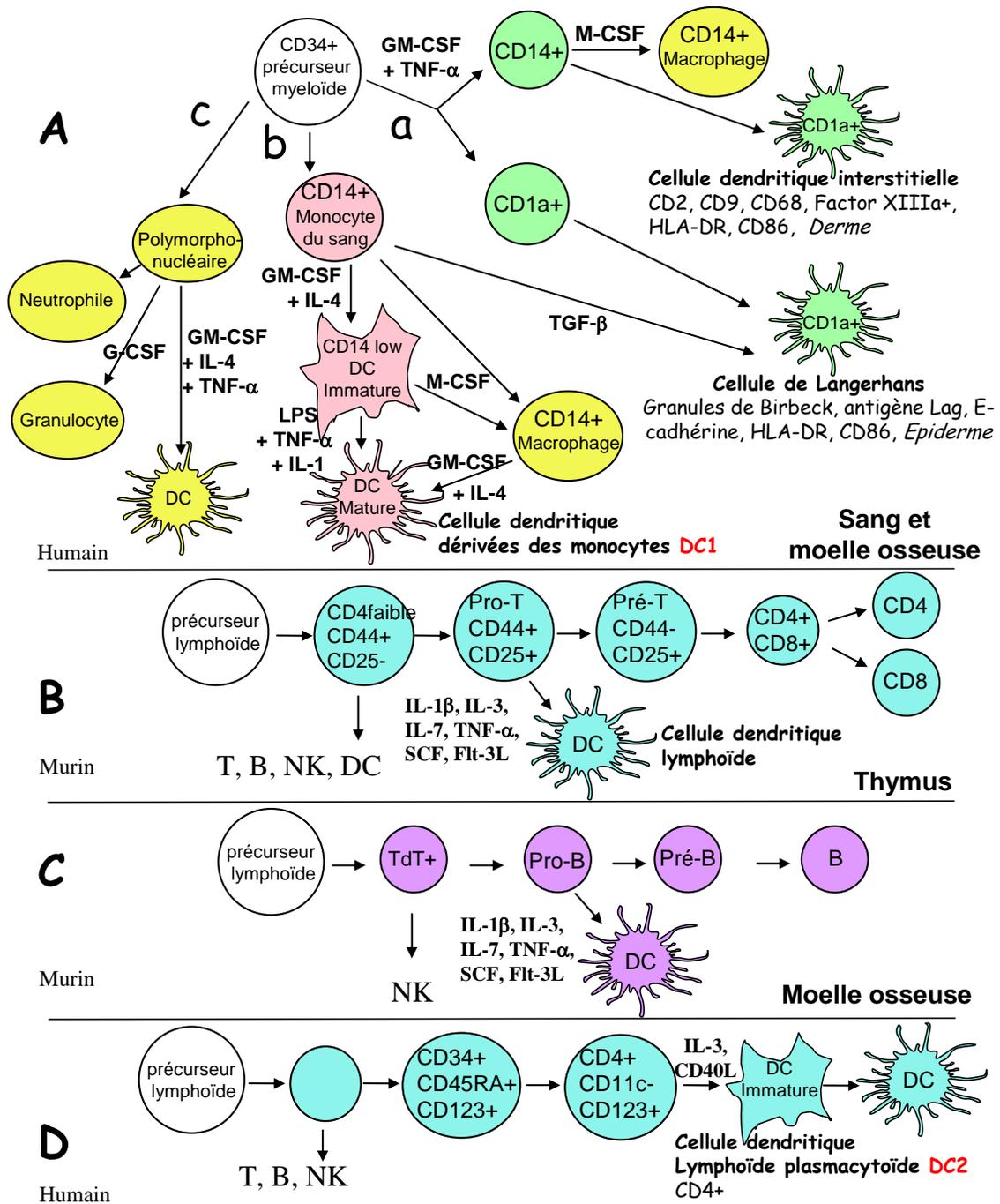


Figure 3 : Les différentes populations de cellules dendritiques générées *in vitro*.

Adapté de Björck, P., Clinical Immunology. 1999, 92: 119-127
 Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

1.1.)- Les précurseurs des cellules dendritiques myéloïdes

Dans le modèle murin, des DC ont été produites à partir de la moelle osseuse en présence de GM-CSF (Inaba et al., 1992a). Un précurseur capable de proliférer a également été mis en évidence dans le sang périphérique de souris (Inaba et al., 1992b). La différenciation en DC est sous le contrôle de l'environnement et de cytokines (GM-CSF, IL-4, TNF- α , TGF- β entre autres). Si le rôle du GM-CSF semble incontestable *in vitro*, étonnamment cette cytokine ne paraît pas être indispensable *in vivo*. Le nombre de DC dans le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques n'est que faiblement réduit dans les souris déficientes en GM-CSF ou en son récepteur (Vremec et al., 1997). De même, dans les souris transgéniques, exprimant du GM-CSF (Metcalf et al., 1996), ou dans les souris normales ayant subi des injections de GM-CSF ou de GM-CSF + IL-4, le nombre de DC ne varie pas de manière significative dans les organes lymphoïdes. D'autres facteurs de croissance se sont révélés participer au processus de génération des DC *in vivo*. Le TGF- β est un facteur essentiel. D'une part, les souris déficientes en TGF- β sont dépourvues de cellules de Langerhans alors que toutes les autres populations de DC se développent normalement (Borkowski et al., 1996). D'autre part, il participe à la différenciation des cellules de Langerhans *in vitro* (Caux et al., 1999; Geissmann et al., 1998). Il a été observé que parmi divers facteurs de croissance seul le Flt3-L permet d'augmenter de dix fois le nombre de DC dans la rate et dans de multiples autres organes lymphoïdes ainsi que le sang (Maraskovsky et al., 1996). Ces DC sont fonctionnelles, car elles sont tout aussi efficaces que celles de souris non traitées, à activer des lymphocytes T dans des réactions mixtes lymphocytaires.

Chez l'homme, deux types de précurseurs de DC myéloïdes ont été identifiés : des progéniteurs hématopoïétiques multipotents CD34+ du sang de cordon et, des monocytes CD14+, du sang périphérique (Figure 3Aab). Les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ du sang de cordon, cultivés en présence de GM-CSF et de TNF- α , génèrent après quelques jours de culture deux types de précurseurs différents, identifiés par l'expression mutuellement exclusive de CD1a et CD14 (Caux et al., 1996). Ces deux populations mûrissent ensuite en cellules typiquement dendritiques (Figure 3Aa). Les précurseurs CD1a+, génèrent des cellules exprimant les granules de Birbeck, l'antigène Lag, et la E-cadhérine, autant de marqueurs spécifiques des cellules de Langerhans résidant dans l'épiderme. Les précurseurs CD14+ génèrent, en revanche, des cellules qui perdent l'expression de CD14, mais acquièrent CD1a, CD2, CD9, CD68, et le facteur XIIIa, des marqueurs caractéristiques des DC résidant dans le derme et dites interstitielles. De manière assez intéressante, qui souligne bien la complexité des relations existant entre tous ces types cellulaires, les précurseurs CD14+, et non pas les CD1a+, sont encore bipotents car ils peuvent se différencier en macrophage sous l'influence du M-CSF (Szabolcs et al., 1996).

Des DC peuvent également se développer à partir de monocytes CD14⁺ du sang périphérique en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Sallusto and Lanzavecchia, 1994) (Figure 3Ab). Ces cellules ont toutes les caractéristiques de DC immatures. Elles mûrissent sous l'influence de divers stimuli tels que LPS, IL-1, TNF- α , ou l'engagement de CD40 (Bender et al., 1996; Romani et al., 1996; Zhou and Tedder, 1996). Ces DC sont nommées DC1 par Yong-Jun Liu pour leur capacité à polariser des lymphocytes T CD4 vers Th1 (Rissoan et al., 1999). La différenciation de monocytes en présence de cytokines nécessite sept jours de culture *in vitro*. Dans un modèle particulièrement intéressant, deux jours seulement suffisent en absence complète de cytokine. Des monocytes se différencient en DC lors de la transmigration au travers d'une monocouche de cellules endothéliales, recouvertes d'une matrice de collagène (Randolph et al., 1998). Le contact entre les monocytes et les cellules endothéliales est le facteur limitant, mais un stimulus mimant un pathogène, comme la présence de billes de zymosan ou de LPS dans la matrice de collagène, permet de quadrupler le rendement de différenciation en DC. Les monocytes qui restent au niveau de la matrice, quant à eux, deviennent des macrophages. De même, il est intéressant de remarquer que les DC immatures dérivées des monocytes sont encore sensibles au M-CSF et peuvent générer des macrophages. Cette capacité est ensuite perdue lors de la maturation. Inversement, même des macrophages totalement différenciés sont encore capables de générer des DC en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Palucka et al., 1999).

Enfin, il existe une autre voie de différenciation à partir de précurseurs immédiats aux polynucléaires neutrophiles qui peuvent engendrer des cellules, aux caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de DC, en présence de GM-CSF, IL-4 et TNF- α (Oehler et al., 1998) (Figure 3Ac).

1.2)- Les précurseurs des cellules dendritiques lymphoïdes

L'idée d'une origine "thymique" des DC a été initialement proposée car il existe des DC résidentes dans le thymus (Crowley et al., 1989). Ces DC thymiques murines expriment les marqueurs attendus sur les DC, tels que CD11c, CMH de classe II, DEC 205, mais aussi CD45, CD44, HSA, LFA-1, et partagent avec les lymphocytes T de nombreux marqueurs (CD2, CD8 α , CD25, Thy-1) (Vremec et al., 1992). Les DC du thymus expriment toutes la molécule CD8 sous forme d'homodimère de la chaîne α . Le laboratoire de Ken Shortman a mis en évidence un précurseur, présent dans le thymus, commun aux lymphocytes T et à ces DC et il a suggéré ainsi, une origine intrathymique de ces DC. En effet, l'injection intrathymique, d'un précurseur thymocytaire exprimant faiblement CD4, dans des souris déplétées en cellules souches hématopoïétiques par irradiation, donne naissance à des lymphocytes T mais aussi à des cellules CD11c⁺ et CMH de classe II⁺ dans le thymus (Ardavin et al., 1993). Ce même précurseur injecté dans le sang, génère dans la rate des DC exprimant CD8 α , ressemblant à celles présentes dans le thymus, suggérant une origine lymphoïde possible pour cette population de DC en périphérie.

Ce marqueur CD8 a été ensuite longtemps utilisé afin de discriminer les DC d'origine myéloïde (CD8 α -) et celles d'origine lymphoïde (CD8 α +). Différents précurseurs ont été injectés dans le sang afin d'affiner l'identification des précurseurs T capables de générer des DC dans la rate (Wu et al., 1996). Le précurseur thymique exprimant faiblement CD4 engendre des lymphocytes T, des lymphocytes B et des DC, mais pas de cellules myéloïdes. Le précurseur pro-T (CD4-, CD8-, CD3-, CD44+, CD25+) génère des lymphocytes T et des DC. Le précurseur pré-T (CD4-, CD8-, CD3-, CD44-, CD25+) ne donne plus naissance qu'à des lymphocytes T. Des résultats tout à fait identiques ont été obtenus *in vitro* démontrant que ces mêmes précurseurs pouvaient se développer en DC en présence d'un cocktail de cytokines IL-1 β , IL-3, IL-7, TNF- α , SCF et Flt-3L (Lucas et al., 1998; Saunders et al., 1996) (Figure 3B). Toutes les cytokines de ce cocktail ne sont peut-être pas nécessaires à la différenciation des DC, à l'exception de l'IL-3 et l'IL-7, mais elles en augmentent le rendement. Ces DC sont générées en absence complète de GM-CSF ce qui les distingue encore des DC myéloïdes. Étonnamment, ces DC lymphoïdes dérivées *in vitro* n'expriment pas CD8 α . Enfin, des cellules pro-B exprimant CD19 ont également pu être dérivées en DC en présence du cocktail de cytokines IL-1 β , IL-3, IL-7, TNF- α , SCF et Flt-3L, ce qui ajoute encore à la complexité des cellules capables de donner des DC (Bjorck and Kincade, 1998; Izon et al., 2001) (Figure 3C). Ces DC expriment les marqueurs CD11c, DEC-205, CD80, CD86 et les molécules de classe II.

Des DC thymiques chez l'homme ont également été mises en évidence par le groupe de Ken Shortman (Sotzik et al., 1994). Ces cellules ont un phénotype classique (CD11c+, CMH de classe II+, CD45+, LFA-1+, ICAM-1+, CD2+). Elles sont pourtant différentes des DC thymiques murines car elles n'expriment pas CD8 mais fortement CD4 (Winkel et al., 1994). Une origine lymphoïde de cette sous population a aussi été démontrée (Spits et al., 1998). Un précurseur (CD34+, CD45RA+, CD10+, CD38+, Thy-1-, Lin-, c-kit-), présent dans la moelle osseuse, qui ne se différencie pas en cellules myéloïdes ou en érythrocytes, peut se développer en lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK et DC (Galy et al., 1998; Galy et al., 1995). Des précurseurs dans le thymus fœtal (CD34+, CD38+, CD45RA+, Thy-1-) (Res et al., 1996), et dans le thymus postnatal (CD33faible, CD34+) (Marquez et al., 1998) capables de générer des lymphocytes T, des cellules NK, et des cellules au phénotype de DC, ont ensuite été identifiés.

Une source de DC lymphoïdes périphériques a été mise en évidence chez l'homme. Il a été proposé que les énigmatiques cellules plasmacytoïdes représentent un lignage capable de se différencier en DC (Galibert et al., 2001). Ces cellules ont été identifiées dans les zones T des tissus lymphoïdes sur la base de leur morphologie semblable aux plasmocytes. Bien que l'origine myéloïde ou lymphoïde de ces cellules soit encore un sujet controversé, certaines évidences tendent à suggérer qu'elles seraient plutôt dérivées d'un précurseur lymphoïde. Elles n'expriment pas les marqueurs myéloïdes classiques et sont CD11b-, CD11c-, CD13-, CD33-

Elles ne se différencient pas en macrophages sous l'influence du M-CSF. Inversement, elles sont positives pour des molécules présentes sur les lymphocytes telles que CD4, CD2, CD5, CD7, et elles ont des ARNm spécifiques de pT- α qui est considéré comme un des marqueurs les plus précoces de cellules engagées vers la différenciation en lymphocytes T (Res et al., 1999). Un précurseur (CD4+, CD11c-) circule dans le sang (O'Doherty et al., 1994) et génère des cellules plasmacytoïdes (CD4+, CD45RA+, CD11c-, CD3-) lors de son entrée dans les organes lymphoïdes, via les veinules endothéliales (HEV : High Endothelial Venules) (Grouard et al., 1997). Ces cellules sont caractérisées par une expression forte du récepteur à l'IL-3 (CD123+) (Olweus et al., 1997). Il est possible de les générer *in vitro*, en présence d'IL-3, à partir de précurseurs CD34+ du sang (Blom et al., 2000; Spits et al., 2000). Ces cellules plasmacytoïdes se révèlent être des cellules importantes dans l'immunité innée car elles sont capables de produire de grandes quantités d'IFN de type I (Siegal et al., 1999) après activation par le virus de l'influenza ou CD40L (Cella et al., 1999a). En présence d'IL-3, un facteur de survie, et de CD40L, un facteur de différenciation, ces cellules plasmacytoïdes se différencient en DC (Grouard et al., 1997) (**Figure 3D**). Ces DC sont nommées DC2 par Yong-Jun Liu pour leur capacité à polariser des lymphocytes T CD4 vers Th2 (Rissoan et al., 1999).

Très récemment, des cellules plasmacytoïdes ont aussi été mises en évidence dans la rate et les ganglions de souris avec un phénotype CD11c+, B220+, GR-1+ (Nakano et al., 2001).

1.3)- CD8 α : un marqueur de l'ontogénie des cellules dendritiques ?

Cette dichotomie, entre les DC d'origine myéloïde et les DC d'origine lymphoïde, s'accompagne d'une dichotomie fonctionnelle. En effet, l'une des hypothèses a été que les DC myéloïdes capturent les antigènes en périphérie et migrent jusqu'aux zones T des organes lymphoïdes secondaires afin d'initier la réponse immune. Les DC lymphoïdes, en revanche, résident dans la médulla thymique (Ardavin, 1997) et dans les zones T des organes lymphoïdes. Elles sont capables d'induire l'apoptose de lymphocytes T CD4 par un mécanisme dépendant en partie de FasL (Suss and Shortman, 1996) et de réguler la réponse de lymphocytes T CD8 (Kronin et al., 1996); elles auraient ainsi un rôle plutôt régulateur (Steinman et al., 1997; Steinman et al., 2000). Cependant, ce modèle ne donne pas pleinement satisfaction puisque l'on retrouve les deux types de DC myéloïdes et lymphoïdes dans la rate avec un très fort potentiel à activer des lymphocytes T.

Non seulement les DC purifiées à partir de la rate sont capables de présenter efficacement des antigènes, mais plus encore, elles sont des éléments régulateurs majeurs de la réponse immune qui peuvent influencer la polarisation des lymphocytes T CD4. En effet, la polarisation vers Th1 et Th2 semble être modulée par ces populations de DC myéloïdes et lymphoïdes. Le concept suggère actuellement que les DC CD8 α - induiraient préférentiellement des Th2, alors que les DC CD8 α + promouvraient plutôt Th1 via leur forte production d'IL-12 (cf.

paragraphe 8.2)). La limitation de ce concept est la contrainte qu'il impose, car l'origine d'une population donnée de DC déterminerait ses fonctions futures et induirait une réponse T donnée. Ceci va à l'encontre de l'adaptabilité du système immunitaire, à moins de supposer que toutes les populations de DC puissent être, à un moment donné, en contact avec l'antigène et donc que l'origine des DC ne conditionne peut-être pas leur localisation tissulaire.

Différents travaux récents montrent que cette dichotomie entre les DC myéloïdes et les DC lymphoïdes, basée sur l'expression de CD8 α , n'aurait pas lieu d'être. Par exemple, l'origine des cellules de Langerhans est extrêmement confuse. Ces cellules de Langerhans sont associées à un linéage myéloïde, puisque dérivées *in vitro* à partir de monocytes du sang en présence de TGF- β (Geissmann et al., 1998; Zhang et al., 1999). De plus, les souris déficientes en facteur de transcription Ikaros (qui régule le développement du linéage lymphoïde incluant les DC thymiques) ont toujours des cellules de Langerhans (Georgopoulos et al., 1994). Pourtant le laboratoire de Carlos Ardavin a démontré, dans des expériences de reconstitution de souris irradiées, que le précurseur de thymocytes exprimant faiblement CD4, pouvait générer des cellules de Langerhans, suggérant ainsi que ces dernières pourraient provenir d'un linéage lymphoïde (Anjuere et al., 2000a). Les cellules de Langerhans fraîchement isolées à partir de la peau, pourraient exprimer CD8 α + après stimulation par CD40 (Anjuere et al., 2000b). Des expériences de sensibilisation de la peau avec du FITC démontrent que les cellules de Langerhans, qui sont stimulées au niveau de la peau, migrent au sein des zones T des ganglions lymphatiques et acquièrent CD8 α + (Merad et al., 2000).

Enfin, des études récentes ont indiqué que le phénotype des DC de la rate, basé sur CD8 α , n'était pas déterminé par leur ontogénie. Deux groupes différents ont rapporté que le précurseur de thymocytes, exprimant faiblement CD4, génère dans la rate les deux populations de DC CD8 α - et CD8 α + (Manz et al., 2001; Martin et al., 2000). Inversement, il a été montré qu'un précurseur myéloïde, pouvait également engendrer des DC CD8 α + (Traver et al., 2000). L'origine des DC, basée sur l'analyse phénotypique des cellules, est une approche qui est à réévaluer. Il est donc difficile de dire à présent quelle est la voie, majoritaire, myéloïde versus lymphoïde, à partir de laquelle les DC sont générées *in vivo*.

L'idée nouvelle émergeant actuellement, serait que l'expression de CD8 α ne serait donc pas le témoin de l'origine ontogénique des DC mais plutôt d'un état de stimulation / maturation ou d'une prédisposition à induire un certain type de réponse T (Th1 / Th2). L'expression de CD8 α , dont le rôle n'a pas encore été clarifié d'ailleurs, devrait donc être déterminé par le microenvironnement et l'histoire de la DC et rendre compte de l'acquisition de telle ou telle fonction. Dans ce manuscrit, à présent, nous n'évoquerons plus les DC myéloïdes et lymphoïdes mais les DC CD8 α - et les DC CD8 α +

Il semble donc évident qu'il n'y a pas une, mais plusieurs voies de différenciation capables de donner des DC. Il reste encore à démontrer que ces résultats obtenus *in vitro* reflètent bien une réalité physiologique *in vivo*. Les progéniteurs de DC résidant au sein de la moelle osseuse, libèrent dans la circulation sanguine des précurseurs qui patrouillent au travers du sang, des tissus périphériques, des organes lymphoïdes prêts à recevoir les signaux adéquats de leur différenciation en DC. La multiplicité des types cellulaires capables, en présence de diverses cytokines, d'engendrer des DC pourrait rendre compte de leur répartition tissulaire, de leur pouvoir à détecter et capturer les pathogènes à tout moment, en tout lieu et en toutes circonstances et pourrait être la base même d'une stratégie qui a évolué pour la surveillance immunologique. De multiples populations ont été récemment décrites au sein des tissus non lymphoïdes et lymphoïdes et leur identification est très importante afin de définir précisément ces différentes populations, leurs phénotypes, leurs localisations, et leurs fonctions pour comprendre au mieux leurs rôles au sein du système immunitaire *in vivo*. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux phénotypes, aux mouvements et aux rôles des DC en réponse à des agents infectieux ou aux produits libérés par ces agents.

2)- Distribution tissulaire des cellules dendritiques *in vivo*

Des DC ont été observées dans les tissus biologiques aussi variés que la peau, le cœur, les poumons, le foie, le sang, la lymphe, la rate, les ganglions et les plaques de Peyer. Les DC étant présentes à l'état de trace dans l'organisme, en absence de marqueurs spécifiques, l'identification de ces cellules s'est avérée extrêmement longue et difficile. Afin de caractériser précisément les différentes populations des étapes d'enrichissement et de purification sont nécessaires. Cependant, les méthodes utilisées pendant des années, ont été trop drastiques et ont provoqué la perte de certaines populations qui sont restées très longtemps ignorées. Par exemple, l'adhésion sur plastique, l'enrichissement par élimination des lymphocytes T (avec l'utilisation d'anticorps anti-CD4), ont été des étapes très critiques dans les protocoles qui ont retardé l'avancée du phénotypage des DC *in vivo*. Ainsi, ce n'est qu'en 1997, que le groupe de Maraskovsky utilisant une méthode plus simple, a mis en évidence l'existence de DC exprimant CD4 chez la souris (Pulendran et al., 1997). De plus, les techniques de séparation peuvent entraîner des changements significatifs sur l'expression des marqueurs de surface et sur l'état d'activation des DC. Nous présenterons ici les résultats les plus récents sur l'identification des DC.

De même, que pour l'identification des DC dérivées *in vitro*, la caractérisation des DC *in vivo* est basée principalement sur leur morphologie, l'expression de l'intégrine α CD11c (bien que chez l'homme certaines populations ne l'expriment pas), l'expression forte des molécules du CMH de classe II et de costimulation, et leur capacité à capturer des antigènes et à stimuler des lymphocytes T. L'expression de CD11c est presque exclusivement restreinte aux DC (Metlay et al., 1990). CD11c est une intégrine α qui s'associe à l'intégrine β 2 (CD18). Ce

couple CD11c/CD18 joue un rôle important dans l'adhésion des DC avec l'endothélium et avec les lymphocytes T.

2.1)- Les cellules dendritiques de la peau

Au niveau de la peau ou des muqueuses, les DC sont représentées par les cellules de Langerhans, qui sont situées dans l'épiderme et par les DC interstitielles situées plus profondément dans le derme (Romani and Schuler, 1992). Les cellules de Langerhans sont cinq fois plus nombreuses que les DC interstitielles. Leurs caractéristiques phénotypiques respectives sont décrites dans la [table 1](#).

Cellules de Langerhans	DC interstitielles
Murin	
CMH de classe I+ CMH de classe II++ CD11c+++ CD8α- CD11b+++ DEC-205+++ Granule de Birbeck+++	CMH de classe I+ CMH de classe II++ CD11c+++ CD8α+ CD11b+++ DEC-205+++ Granule de Birbeck-
Humain	
HLA de classe I+ HLA de classe II+ CD11c+ CD1a+ CD14- CLA+ DC-SIGN- E-cadhérine+++ Facteur XIIIa de coagulation- Granule de Birbeck+++ Lag+++	HLA de classe I+ HLA de classe II+ CD11c+ CD1a+/- CD14+/- CLA+ DC-SIGN+ E-cadhérine- Facteur XIIIa de coagulation++ Granule de Birbeck- Lag-

Table 1 : Comparaison phénotypique des deux types de DC présentes dans la peau chez l'homme et chez la souris.

HLA : human leucocyte antigen

2.1.1)- Les cellules de Langerhans

La première description de cellules particulières de la peau, par Langerhans, date de 1868. Les études sur les cellules de Langerhans ont permis de proposer un modèle pour la différenciation et la maturation des DC. Originaires de la moelle osseuse, elles passent dans le

sang puis s'établissent dans l'épiderme (où elles représentent 2 à 4% des cellules épidermiques), dans l'épithélium de la peau, la cavité orale, l'œsophage, les poumons, l'urètre et le vagin. Elles sont en contact très étroit avec les kératinocytes qui participent eux aussi aux conflits immunitaires, car ils produisent de nombreuses cytokines telles que GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8, TGF- β .

Les cellules de Langerhans sont principalement caractérisées par des inclusions cytoplasmiques formées d'une double membrane et appelées : granules de Birbeck. La fonction de ces granules n'a pas encore été définie. Les cellules de Langerhans humaines sont caractérisées par l'expression de CD1a, de la E-cadhérine (Tang et al., 1993), de la langérine (Valladeau et al., 2000) et par la présence intracytoplasmique de l'antigène Lag (Langerhans Associated Granule) (Kashihara et al., 1986). La langérine et l'antigène Lag pourraient, en fait, être la même molécule (Valladeau et al., 2000). Les cellules de Langerhans sont les seules cellules, de l'épiderme sain, à exprimer les molécules de classe II. Elles possèdent à ce stade immature d'importantes propriétés de captures antigéniques et de reconnaissances des pathogènes (Reis e Sousa et al., 1993), notamment, grâce à l'expression d'un récepteur homologue au récepteur au mannose (DEC-205) (Jiang et al., 1995). La compréhension de la physiologie des cellules de Langerhans a été possible en grande partie grâce aux études conduites *in vitro*. Il a été observé que les fonctions de capture et de présentation des antigènes sont des événements séquentiels. Ces cellules mûrissent spontanément après culture et acquièrent les capacités de stimulation des lymphocytes T (Schuler and Steinman, 1985).

In vivo, après une stimulation antigénique, elles quittent l'épiderme pour aller vers les ganglions, via la lymphe afférente, où elles se transforment en DC interdigitées (Hoefsmit et al., 1982). La migration est une fonction très importante de ces cellules de Langerhans. Elle a été très largement décrite, par des expériences de sensibilisation sur la peau par des haptènes fluorescents, où l'on voit les cellules de Langerhans se déplacer après stimulus inflammatoire vers les vaisseaux lymphatiques afférents puis les zones T des ganglions (Cumberbatch and Kimber, 1990; Knight et al., 1985; Kripke et al., 1990; Macatonia et al., 1987; van Wilsem et al., 1994). Des stimuli aussi variés que des haptènes sensibilisateurs sur la peau, ou des pathogènes, ou des cytokines de l'inflammation, ont tous une caractéristique commune : ce sont des témoins de "danger". L'administration de LPS, d'IL-1 ou de TNF- α provoque la migration des cellules de Langerhans, et des DC du cœur et des reins, vers les organes lymphoïdes (Cumberbatch et al., 1997a; Cumberbatch et al., 1997b; Roake et al., 1995). Une fois dans les ganglions, les cellules de Langerhans se différencient en DC, dites matures, avec un fort potentiel à activer les rares lymphocytes T, spécifiques de l'antigène qu'elles présentent.

2.1.2)- Les cellules dendritiques interstitielles

Les DC interstitielles (ou DC dermales), se situent au niveau du derme et des tissus interstitiels de la plupart des organes (cœur, foie, poumons, rein, pancréas, thyroïde...). Ces

cellules sont différentes des cellules de Langerhans car elles n'expriment ni CD1a, ni l'antigène Lag. Elles semblent, de plus, être issues d'un précurseur distinct de celui des cellules de Langerhans, comme cela a été suggéré par l'étude *in vitro* réalisée par Christophe Caux (Caux et al., 1996). Les DC interstitielles ont cependant des similitudes avec les cellules de Langerhans : elles forment notamment un réseau de cellules sentinelles capables de capturer des antigènes en périphérie. Ces cellules ont elles aussi des propriétés de capture antigénique qui semblent plus intenses et plus durables que celles des cellules de Langerhans (Caux et al., 1997). Elles peuvent ensuite, mûrir *in vitro* et perdre leur capacité d'endocytose au profit des propriétés de stimulation allogénique (Austyn et al., 1994).

Cependant, une différence importante est à noter, car les DC interstitielles matures, participent à l'activation des lymphocytes B. Par la sécrétion de facteurs solubles, elles stimulent la production d'anticorps et la prolifération des lymphocytes B préalablement activés via CD40 (Dubois et al., 1999; Dubois et al., 1997). Les DC dermales régulent aussi la commutation isotypique puisqu'elles sont indispensables à l'expression de certains isotypes d'immunoglobulines tels que les IgA (Fayette et al., 1997).

2.2)- Les cellules dendritiques circulantes

Non seulement il existe des précurseurs des DC, mais aussi des DC dans le sang et la lymphe afférente. Afin de comprendre, comment elles colonisent les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes il est important de pouvoir caractériser les diverses populations de DC présentes dans ces liquides biologiques. Il faudrait pouvoir estimer leur état de maturation, et savoir si elles ont, ou non, rencontré un antigène ou un signal qui a provoqué leur migration. Cependant, ces études ne peuvent être conduites aisément dans les modèles les plus connus que sont l'homme et la souris, ce qui est un frein conséquent à la compréhension de la physiologie de ces cellules. Les processus de circulation des DC dans l'organisme sont encore mal connus actuellement.

2.2.1)- Les cellules dendritiques du sang périphérique

Il a été estimé que, dans le sang humain, les DC et leurs précurseurs représentent 0,1 à 1% des leucocytes. Les différentes populations de DC présentes dans le sang sont caractérisées par une morphologie particulière leur donnant un aspect de cellules voilées et par l'expression des molécules de classe II. Des cellules se différenciant spontanément en DC après simple culture *in vitro*, en absence de cytokine, sont identifiées sur la base de leur phénotype CD33+, CD14faible, CD13+ (Thomas et al., 1993). Elles pourraient correspondre à des DC, proches des monocytes, en route vers les tissus périphériques. Le groupe de Ralph Steinman a mis en évidence deux populations de DC. L'une, majoritaire et immature (CD11c-, CD4+, CD45RA+, CD45RO-, CD5-) pourrait être assimilée à celle décrite par Rüdiger Sorg (CD11c-, CD4+, CD45RA+, CD123+) (Sorg et al., 1999) qui ressemble aux cellules plasmacytoïdes (préDC2) capable de se différencier en DC. L'autre, plus mature, (CD11c+,

CD4-, CD45RA+, CD45RO+, CD5+) (O'Doherty et al., 1994; O'Doherty et al., 1993), pourrait correspondre à la population de DC mature décrite par le groupe de Peter Lipsky (CD11c+, CD33+++ et CD14faible, CD45RA+, CD45RO+) (Thomas and Lipsky, 1994). Il est intéressant de remarquer que certaines populations de DC immatures sont capables de devenir complètement matures en absence de cytokines suggérant qu'elles ont peut-être déjà engagé leur programme de maturation (Thomas et al., 1993). D'autres populations de DC immatures ont besoin d'un surnageant de culture de monocytes, suggérant qu'elles n'avaient pas jusqu'alors reçu les signaux nécessaires à leur maturation (O'Doherty et al., 1993).

En résumé, il semble exister au moins deux populations de DC dans le sang. Elles diffèrent par leur état de maturation mais aussi par leur phénotype et pourraient correspondre à des populations d'origine distincte (Kohrgruber et al., 1999). Schématiquement, les DC circulant dans le sang correspondraient : 1) à des DC immatures, quittant la moelle osseuse en direction des tissus périphériques, comme les précurseurs des cellules de Langerhans (CD11c+, CD1a+) qui ont été identifiées dans le sang (Gothelf et al., 1986; Ito et al., 1999), 2) à des DC tissulaires activées en route vers la rate ou les ganglions. Le rôle de DC matures (ayant rencontré un antigène ?), dans le sang reste encore à définir, ainsi que leur potentiel à activer des lymphocytes T, si elles entrent dans les organes lymphoïdes par les HEV.

2.2.2)- Les cellules dendritiques de la lymphe afférente

La lymphe est un système de circulation qui draine les tissus interstitiels. Les vaisseaux lymphatiques, au sein des tissus, sont constitués d'un endothélium très fin. Grâce aux jonctions intercellulaires, ce dernier permet le passage du liquide interstitiel contenant des macromolécules (protéines), ainsi que des cellules. C'est également une voie d'entrée utilisée par les cellules tumorales, les pathogènes, tels que bactéries et virus.

La majorité des études concernant les cellules circulant dans le système lymphatique ont été faites chez les ruminants (Haig et al., 1999) et chez le rat (MacPherson, 1989). Les ganglions sont en contact avec les tissus périphériques car ils sont drainés par la lymphe. En effet, ce qui vient de la périphérie entre par les vaisseaux lymphatiques afférents (6 à 12) dans le sinus souscapsulaire des ganglions. Il n'existe qu'une voie de sortie par les vaisseaux lymphatiques efférents (1 à 2).

Les compositions cellulaires de la lymphe afférente, et de la lymphe efférente, sont très différentes (Young, 1999). La lymphe afférente ne rend compte que de 10% des cellules qui atteignent le ganglion, (la voie majoritaire étant la voie sanguine via les HEV). Elle est principalement composée de lymphocytes T (90%), lymphocytes B (10%). Les DC et les macrophages représentent 10% des cellules circulant dans la lymphe afférente et elles ont, tout comme celles du sang, une morphologie de cellules voilées (Howard and Hope, 2000). La lymphe efférente ne contient que des lymphocytes T et B et pas de DC, ce qui suggère que ces dernières restent dans les ganglions et probablement y meurent.

Les diverses études sur les DC de la lymphe afférente ont montré que les populations circulantes ne sont pas homogènes, tant par leurs phénotypes que leur état de maturation ou leurs fonctions. Deux populations différentes ont été mises en évidence dans la lymphe afférente chez la vache (CD11a+/CD5+/CD21- et CD11a-/CD5-/CD21+/-) (Howard et al., 1997) et chez le rat (CD4+ et CD4-) (Liu et al., 1998). Ces populations possèdent des propriétés de capture et de présentation d'antigènes, mais diffèrent sur le temps pendant lequel elles les possèdent *in vitro* ainsi que sur l'expression de récepteurs permettant la capture d'antigène (FcR et le récepteur au mannose). Elles diffèrent également par leur capacité à stimuler des lymphocytes T en réactions allogéniques. Cependant, ces deux populations semblent être bien distinctes et ne reflètent pas deux états de maturation séquentiels.

L'existence de ces deux populations ne peut pas s'expliquer par le modèle simple, où elles ont reçu un stimulus de migration en périphérie, et sont en route vers les organes lymphoïdes. Il est proposé que ces populations représentent des DC d'origine différentes, par exemple issues de différents tissus ou de microenvironnement, ayant stimulé la migration. La différenciation de monocytes en DC, lors de leur transmigration sur monocouche de cellules endothéliales recouvertes d'une matrice de collagène, est un modèle permettant de mimer le mouvement de monocytes de la périphérie vers la lymphe afférente (Randolph et al., 1998). Cette approche, ainsi que l'identification des populations de DC, responsables de la capture des antigènes *in vivo*, sont extrêmement intéressantes afin de comprendre la physiologie et les processus de migration de ces cellules.

2.3)- Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes

Le rôle majeur des organes lymphoïdes lors de l'initiation d'une réponse primaire, nécessite une analyse précise des populations de DC qui les colonisent. Ces organes sont extrêmement structurés. Ils contiennent des zones bien distinctes, comme les régions marginales entourant les follicules B et les zones T, au travers desquelles recirculent continuellement les lymphocytes B et les lymphocytes T respectivement. Différents noms sont attribués aux zones T dans ces différents organes. Les plus communément utilisés sont les régions lymphoïdes périartériolaires dans la rate, le paracortex dans les ganglions, les zones interfolliculaires dans les plaques de Peyer. L'anatomie de la rate, et celle des ganglions lymphatiques, sont schématisées dans les [figures 4 et 5](#) respectivement.

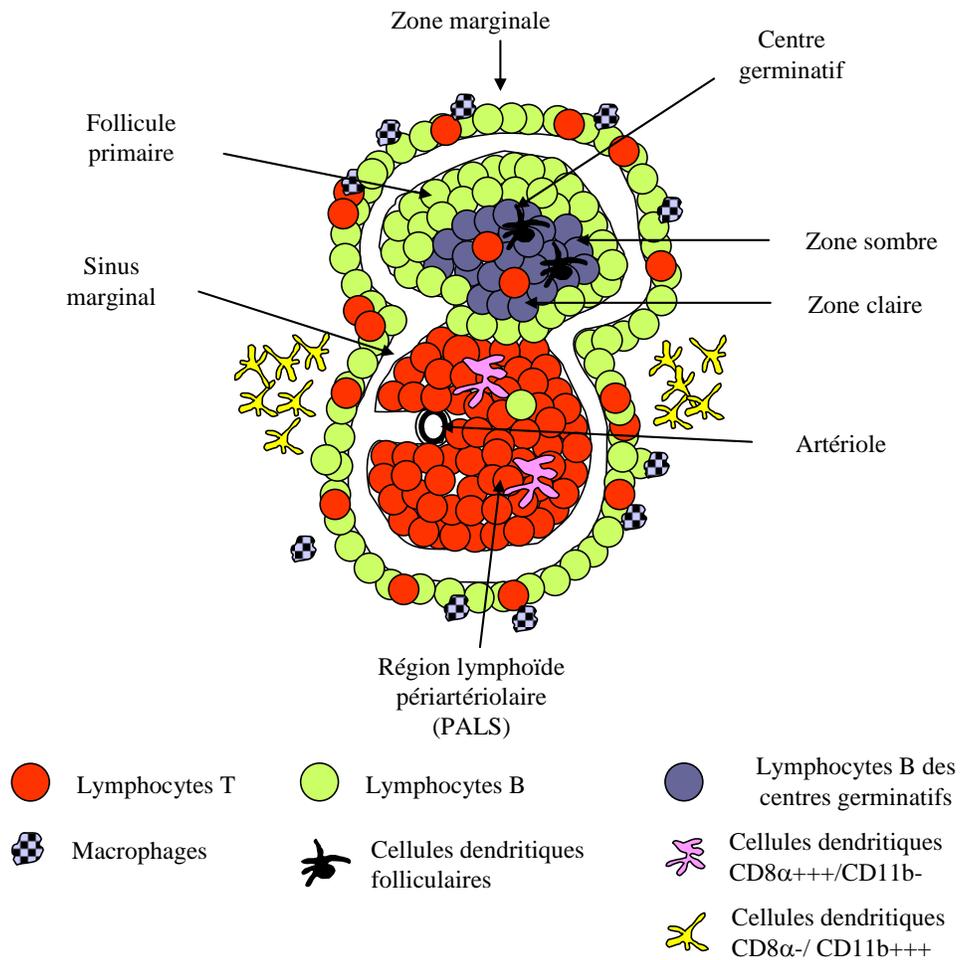


Figure 4 : Anatomie de la pulpe blanche de la rate.

La rate est un organe lymphoïde secondaire composé de la pulpe rouge parsemée de petites zones blanches : la pulpe blanche.

La pulpe rouge comprend les sinusoides où circule le sang et, les cordons de Billroth qui contiennent notamment des plasmocytes et des macrophages.

La pulpe blanche, encadrée par une zone marginale, est constituée des artérioles entourées d'une région lymphoïde périartériolaire, contenant en majorité des lymphocytes T et des follicules B primaires ou secondaires (souvent excentrés par rapport à l'axe artériolaire).

PALS : Periarteriolar Lymphoid Sheaths

Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

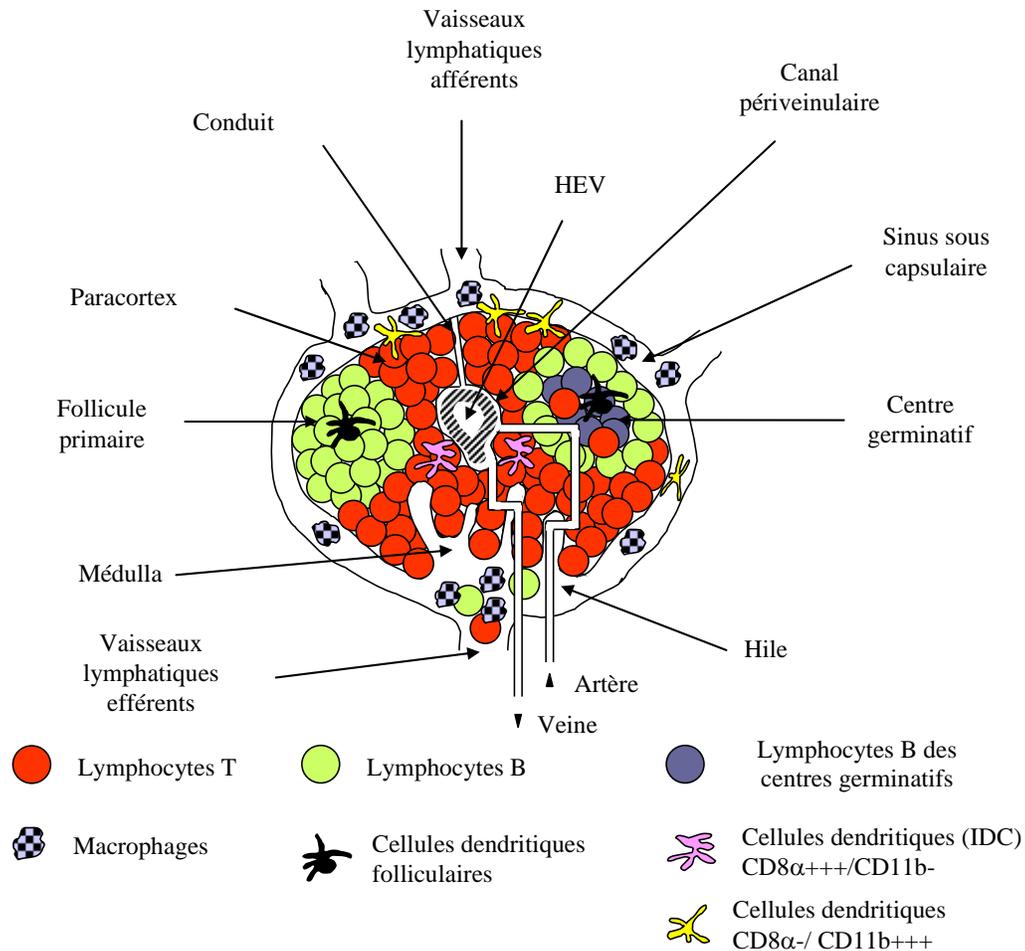


Figure 5 : Anatomie des ganglions lymphatiques.

Ce sont des organes lymphoïdes secondaires, situés sur le trajet des vaisseaux lymphatiques. En absence d'infection, ils sont de très petite taille (de l'ordre du millimètre de diamètre chez la souris). Les vaisseaux lymphatiques afférents se déversent dans la convexité qui longe toute la face interne de la capsule (appelée sinus marginal ou sinus sous capsulaire).

La lymphe circule ensuite dans les sinus interfolliculaires jusque dans le hile où elle est reprise par le lymphatique efférent. Le hile est un point de dépression du ganglion, d'où pénètrent les vaisseaux sanguins qui l'irriguent.

Le parenchyme ganglionnaire comprend le cortex, constitué de follicules B primaires ou secondaires, le paracortex ou territoire inter-folliculaire comprenant une majorité de lymphocytes T, et la médulla. La médulla est faite principalement de cordons lymphoïdes séparés par des sinus lymphatiques, entourés d'une capsule conjonctive et contenant notamment des plasmocytes.

Les ganglions sont groupés dans différentes régions (cervicale, axillaire, brachiale, mésentérique, abdominale, inguinale et poplitéeale).

IDC : cellules dendritiques interdigitées

Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

Les organes lymphoïdes secondaires, comme la rate, les ganglions lymphatiques sous cutanés ou méésentériques, ou encore les plaques de Peyer, ont des fonctions différentes dans l'initiation des réponses immunes. En effet, ils reçoivent des informations de tissus différents et sont probablement confrontés à des pathogènes différents. Par exemple, la rate draine le sang, les ganglions sous cutanés drainent essentiellement la peau grâce à la lymphe, les méésentériques drainent le sang et les muqueuses intestinales. Ainsi, chaque organe est constitué de populations de DC différentes, et celles originaires des cellules de la peau ne sont présentes que dans les ganglions lymphatiques sous cutanés.

À l'heure actuelle, deux populations de DC ont été décrites dans le thymus (Salomon et al., 1994; Vremec et al., 2000), trois dans la rate (Kamath et al., 2000; Maraskovsky et al., 1996; Pulendran et al., 1997; Salomon et al., 1998; Vremec et al., 2000; Vremec and Shortman, 1997; Vremec et al., 1992), cinq dans les ganglions lymphatiques sous cutanés (Anjuere et al., 1999; Henri et al., 2001; Salomon et al., 1998), et deux dans les plaques de Peyer (Anjuere et al., 1999; Iwasaki and Kelsall, 2000; Kelsall and Strober, 1996). Les caractéristiques phénotypiques de ces diverses populations sont présentées dans la [Table 2](#). Il est à présent important de définir, le phénotype, la localisation et surtout les fonctions de capture d'antigène, d'activation des lymphocytes T, de production de cytokines, et de mouvements en réponse à des agents infectieux, de chacune de ces populations de DC.

L'étude de la localisation des DC, au sein des organes lymphoïdes secondaires, en absence de processus inflammatoire, a révélé, notamment dans la rate (Agger et al., 1992), deux régions privilégiées riches en DC (Witmer and Steinman, 1984). Tout d'abord, la zone marginale, adjacente à la zone T, qui contient la majorité des DC (CD11b⁺⁺⁺, CD8 α ⁻, DEC-205⁻, 33D1⁺⁺⁺). Ensuite, la zone T qui contient une population moins importante, mais présentant une morphologie particulière, qui leur valu le nom de DC interdigitées (CD11b⁻, CD8 α ⁺⁺⁺, DEC-205⁺⁺⁺, 33D1⁻). Cette distribution des DC en deux localisations distinctes, a pu être largement confirmée dans la rate (Crowley et al., 1999; Leenen et al., 1998; Pulendran et al., 1997) et dans les plaques de Peyer (Iwasaki and Kelsall, 2000; Kelsall and Strober, 1996).

Thymus	CD8 α +		CD8 α +++		
0,1 à 0,3%	CD4+/-		CD4+/-		
	CD11b+/-		CD11b+/-		
	DEC-205+++		DEC-205+++		
	HSA+++		HSA+++		
	CD8 β +		CD8 β +		
(Salomon et al., 1994; Vremec et al., 2000)					
Rate	CD8 α -	CD8 α -	CD8 α +++		
0,5-1,2%	CD4++	CD4-	CD4-		
	CD11b+++	CD11b+++	CD11b+/-		
	DEC-205-	DEC-205-	DEC-205+++		
	HSA+/-	HSA+/-	HSA+++		
	α 4 intégrine+++	α 4 intégrine+++	α 4 intégrine++		
	α 6 intégrine++	α 6 intégrine++	α 6 intégrine+++		
(Kamath et al., 2000; Maraskovsky et al., 1996; Pulendran et al., 1997; Salomon et al., 1998; Vremec et al., 2000; Vremec and Shortman, 1997; Vremec et al., 1992)					
Ganglion lymphatique	CD8 α -	CD8 α -	CD8 α -	CD8 α +	CD8 α +++
0,5-1%	CD4++	CD4-	CD4-	CD4-	CD4-
	CD11b+++	CD11b+++	CD11b+/-	CD11b-	CD11b-
	DEC-205-	DEC-205-	DEC-205+	DEC-205+++	DEC-205+++
	33D1+	33D1+		33D1-	33D1-
				Lag+++	
			Cellules interstitielles	Cellules de Langerhans	
(Anjuere et al., 1999; Henri et al., 2001; Salomon et al., 1998)					
Plaque de Peyer	CD8 α +		CD8 α +++		
0,1-0,5%	CD11b+++		CD11b-		
	DEC-205+		DEC-205+++		
	2A1+		2A1+		
	M342-		M342+		
	(ARNm) CCR6+		(ARNm) CCR6-		
	(ARNm) CCR7+		(ARNm) CCR7+		
(Anjuere et al., 1999; Iwasaki and Kelsall, 2000; Kelsall and Strober, 1996)					

Table 2 : Description des diverses populations de DC murines présentes dans les organes lymphoïdes. Toutes ces cellules sont positives pour CD11c et pour les molécules du CMH de classe II. Les pourcentages exprimés dans la première colonne, représentent la proportion de DC parmi la totalité des cellules, dans chaque type d'organe.

Chez l'homme, les études sont moins nombreuses que chez la souris, néanmoins plusieurs populations ont été caractérisées. Deux laboratoires ont localisé différentes populations de DC dans la rate (McIlroy et al., 2001) et dans les amygdales (Summers et al., 2001) (Figure 6). Des DC CD11c⁻ sont présentes dans la rate et, bien que leur localisation ne soit pas encore établie, elles pourraient être assimilées aux cellules plasmacytoïdes présentes dans le sang (Cella et al., 1999a; Siegal et al., 1999). Dans la rate, trois populations sont identifiées et expriment CD11c⁺, HLA-DR⁺, CD33⁺. La majorité exprime CD4⁺ dont la moitié est CD32⁺ (FcγRII). L'expression de certains marqueurs, comme CD33, est parfois contradictoire d'une étude à l'autre, probablement à cause des protocoles d'isolation des DC. Ces populations de DC se localisent en trois zones distinctes au sein de la rate.

La première (CD11c⁺, CD11b⁻, CD14⁻, CD83⁻, CD86⁻, CD32⁺, CD64^{+/-}), majoritaire, se situe dans zone marginale vers la pulpe blanche. Bien que chez la souris les DC de la zone marginale soient proches des zones T, chez l'homme, les DC qui semblent équivalentes, sont réparties à la fois autour des zones T et aussi des zones B. Ces cellules semblent être immatures car elles n'expriment pas ou peu CD86 et CD83, contrairement aux DC des zones T.

En effet, une seconde population, est présente au sein des zones T. Ces cellules, les DC interdigitées (IDC), ont un phénotype beaucoup plus mature. Elles expriment toutes CD86⁺ et certaines sont aussi CD83⁺. Une question à présent peut être posée : existe-il des profils linéaires séquentiels d'activation où la population CD86⁻/CD83⁻ se différencierait en CD86⁺/CD83⁻ puis en CD86⁺/CD83⁺ durant le processus de maturation qui s'accompagne de leur relocalisation au sein de la rate ? Dans les amygdales, l'expression du récepteur à l'IL-3, a révélé deux populations CD11c⁻, qui se situent toutes deux autour des veinules endothéliales et qui sont HLA-DR^{mod}, CD123⁻, CD4⁻ et, HLA-DR^{mod}, CD123⁺, CD4⁺, cette dernière étant la population majoritaire (60% de la totalité des DC). La localisation de ces cellules autour des HEV suggère qu'elles entrent dans les amygdales via le sang, probablement en absence de stimulus inflammatoire. Deux autres populations se situent dans les zones T, et sont caractérisées par l'expression des molécules de classe II et de CD13. Ces deux populations CD11c⁺ sont, HLA-DR^{fort}, la plus mature, et HLA-DR^{mod}, CD4⁺, CD13^{fort}, CD45RA⁻, CD45RO⁺ (Summers et al., 2001).

La dernière population de DC (CD11c⁺, CD4⁺, CD14^{-/+}, CD11b⁺), distinctes des cellules dendritiques folliculaires (FDC), est présente dans les centres germinatifs (GCDC). Les auteurs émettent l'hypothèse que ces DC pourraient être différentes de celles des zones marginales ou des zones T, et, du fait de l'expression de CD11b, les assimilent à des cellules proches des monocytes. L'absence de CD86 et CD83 même dans les donneurs ayant une forte proportion de DC indique que ces DC nécessitent probablement des signaux d'activation différents de celles des zones marginales ou des zones T. Ces résultats diffèrent de ceux du groupe de Yong-Jun Liu qui avait déjà mis en évidence de telles cellules. Elles se

caractérisent par l'expression de CD11c+, CD4+, CD45RA+, CD45RO-, et se situent à la fois dans les zones sombres et les zones claires des centres germinatifs des amygdales, de la rate et des ganglions (Grouard et al., 1996). Ces cellules pourraient être proches des DC du sang CD11c+, CD4+, (O'Doherty et al., 1994) et pourraient générer les GCDC. Ces GCDC sont à un état de maturation intermédiaire. D'une part, parce qu'elles ont de faibles propriétés de capture d'antigène soluble (dextran-FITC) en comparaison aux DC dérivées à partir de monocytes. D'autre part, bien qu'elles expriment peu CD86 et CD83, elles activent efficacement les lymphocytes T en réaction mixte allogénique, comparé aux lymphocytes B issus des centres germinatifs, suggérant qu'elles acquièrent ces molécules de costimulation rapidement lors de culture *in vitro*. Ces cellules sont donc extrêmement intéressantes car elles semblent participer à la formation et au maintien des centres germinatifs, non pas directement en interagissant avec les lymphocytes B, mais par l'activation des lymphocytes T CD4 nécessaires à la prolifération et la différenciation des lymphocytes B.

Non seulement les organes lymphoïdes contiennent des DC à un stade vraisemblablement immature, mais également des précurseurs, puisqu'il est possible de générer de grandes quantités de DC à partir de cellules de la rate de souris en présence de GM-CSF (Lu et al., 1995). Des cellules exprimant faiblement CD11c et fortement Gr-1 et CD11b, se localisent dans la pulpe rouge au bord des zones marginales, et pourraient être des précurseurs capables de se différencier en présence d'une infection et des multiples signaux de l'inflammation (Pulendran et al., 1997).

Toutes ces études sont très descriptives et, finalement, les mécanismes par lesquels les DC entrent dans les organes lymphoïdes pour initier la réponse, sont mal connus. Il est très intéressant de comparer les mouvements de DC entre les tissus, ainsi qu'au sein même des organes lymphoïdes. Lors d'une infection cutanée, par exemple, quelles sont les DC recrutées au sein des ganglions ? Quelle est la participation des DC immatures déjà présentes dans les ganglions, par rapport à celles qui entrent via la lymphe afférente en provenance de la peau ? Quelle est la proportion de DC recrutées au niveau sanguin dans ce même organe et quel est leur rôle ? Comment ces populations de DC se relocalisent-elles en présence d'une infection ? Autant de questions qui sont toujours en suspens et dont les réponses permettront de mieux comprendre la physiologie des DC *in vivo*. Néanmoins, maintenant que nous avons décrit les diverses origines des DC et les populations présentes *in vivo*, nous allons tenter de détailler leur rôle dans l'initiation de l'immunité et de comprendre pourquoi les DC sont si efficaces pour détecter et présenter, aux lymphocytes T, des antigènes dérivés de pathogènes.

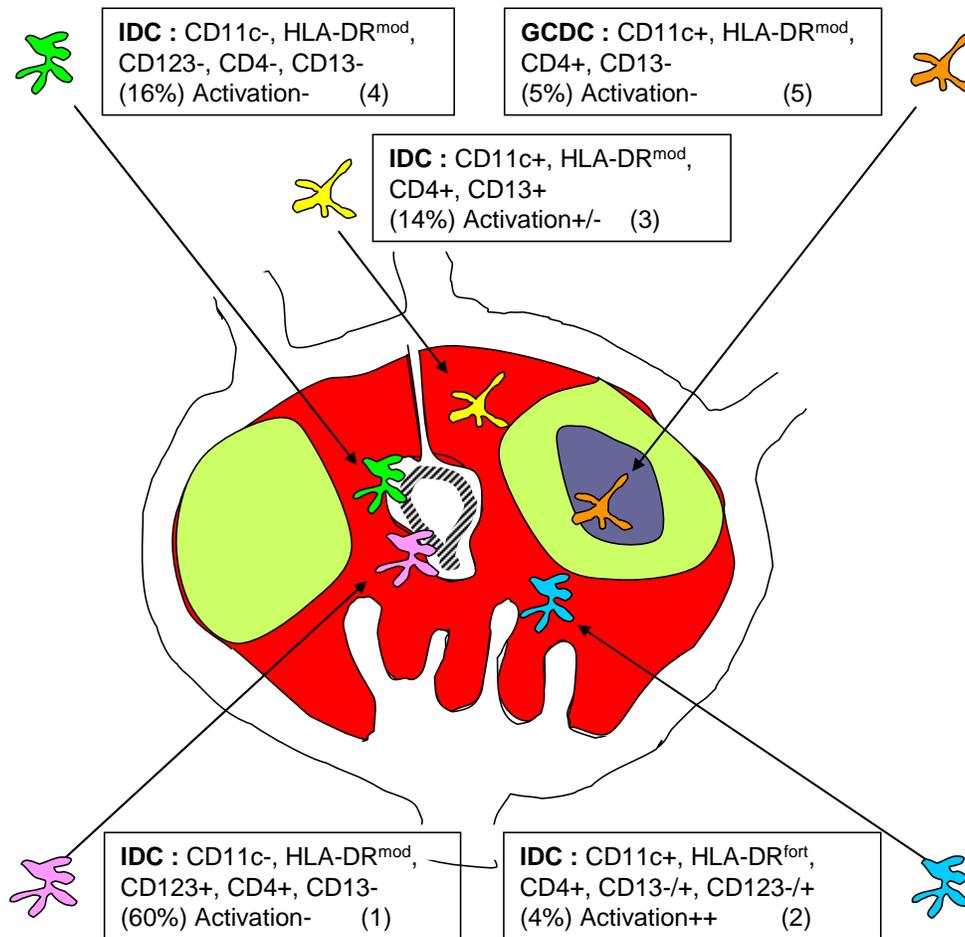


Figure 6 : Cinq populations de cellules dendritiques caractérisées et localisées dans les amygdales humaines.

La localisation *in situ* a permis d'identifier quatre populations de DC interdigitées au niveau des zones T :

1) les DC dérivées des cellules plasmacytoïdes (CD11c-, HLA-DR^{mod}, CD123+) et trois populations de DC, 2) (CD11c+, HLA-DR^{fort}), 3) (CD11c+, HLA-DR^{mod}, CD13+) et 4) (CD11c-, HLA-DR^{mod}, CD123-).

Une dernière population a été définie au sein des centres germinatifs (CD11c+, HLA-DR^{mod}, CD13-).

Les trois populations de DC exprimant CD11c+ sont supposées représenter des états d'activation différents. Par contre, les populations CD11c+ et CD11c- semblent être dérivées de précurseurs différents, probablement myéloïde et lymphoïde respectivement.

Les pourcentages représentent la proportion de chaque population parmi la totalité des DC. Leur état d'activation est schématiquement représenté par les signes -, +/-, ++.

IDC : cellules dendritiques interdigitées, GCDC : cellules dendritiques des centres germinatifs

Adapté de Summers, K. et al., American Journal of Pathology. 2001, 159: 285-295

Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

3)- Les cellules dendritiques : un lien majeur entre l'immunité innée et l'immunité acquise

3.1)- Les cellules dendritiques et leurs fonctions dans l'immunité innée

Le premier obstacle à l'entrée des pathogènes dans l'organisme est une barrière physique : la peau ou les muqueuses. Si ces dernières sont franchies, le système immunitaire inné met en place un processus actif de protection, où des cellules effectrices contrôlent l'infection. Les macrophages, DC, cellules NK, granulocytes, neutrophiles constituent cette première ligne de défense. Ces cellules ont un rôle de surveillance et doivent être capables de discriminer les cellules de l'hôte et les pathogènes. Leur fonction est de répondre immédiatement en limitant l'invasion (Clark et al., 2000).

Lorsqu'un pathogène pénètre dans la peau par exemple, le microenvironnement local (les cellules de Langerhans, les cellules épithéliales et les kératinocytes) est modifié par le pathogène lui-même et par les produits qu'il délivre (LPS, endotoxines, double brin d'ARN viral, ADN bactérien...). Les cellules qui forment le derme et l'épiderme sont sensibles à ces changements et sécrètent, entre autres, des cytokines (IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IFN, TNF, TGF, GM-CSF). Les DC sont, non seulement sensibles, mais participent également à ces modifications qui témoignent d'un "danger". En effet, elles ont une activité importante de production de chimiokines (MIP-1 α , IL-8, MCP-1, RANTES (Regulated Upon Activation, normal T-cell Expressed and Secreted), MDC (Macrophage-derived chemokine)), qu'elles déposent sur le site infectieux, afin d'attirer d'autres cellules (Foti et al., 1999; Rescigno et al., 1999; Sallusto et al., 1999). Elles déclenchent ainsi sur le site une réaction inflammatoire. Cette dernière se caractérise par le développement des capillaires sanguins, grâce à la sécrétion de facteurs d'angiogénèse, ce qui permet le recrutement massif de cellules de l'immunité innée comme des monocytes. Ces derniers produisent alors des enzymes capables de s'attaquer au pathogène (lipoprotéinelipase, lysozyme, élastase, radicaux oxygénés libres, molécules du complément...).

Les DC ont développé des mécanismes de protection afin de contourner les mécanismes d'échappement des pathogènes et permettre ainsi, la mise en place d'une réponse immune adaptée. Par exemple, en présence du virus de l'influenza, les DC, dérivées des monocytes humains, produisent de l'IFN- α et expriment une protéine qui leur permet de se protéger contre la réplication virale : la MxA (Cella et al., 1999b). Elles expriment également des molécules qui les protègent contre la destruction par le complément, comme CD46, CD55 et CD59. Cette survie des DC en cas d'agression est importante à ce stade, car elles doivent recueillir toutes les informations délivrées par le pathogène et par le microenvironnement, afin de les transporter jusqu'aux lymphocytes T dans les organes lymphoïdes.

Si les macrophages sont des cellules extrêmement actives dans la phagocytose et l'élimination des corps étrangers, en revanche, elles ne sont pas capables d'activer des lymphocytes T naïfs.

Cette fonction est en majeure partie réalisée par les DC qui, non seulement, peuvent détecter les pathogènes et les molécules qui sont libérées dans leur environnement, mais peuvent aussi initier une réponse immune primaire spécifique. Elles transportent, aux lymphocytes T, des informations concernant la structure antigénique du pathogène (présentation de peptides dérivés de protéines en association avec les molécules du CMH), et des informations sur la capacité du pathogène et du microenvironnement à activer les DC (expression de molécules de costimulation). Elles sont donc à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité acquise puisque, sans elles, les lymphocytes de l'immunité acquise ne pourraient être activés (Palucka and Banchereau, 1999a).

3.2)- Les cellules dendritiques et leurs fonctions dans l'immunité acquise

Diverses expériences ont démontré le rôle des DC dans l'initiation de réponses immunes. Tout d'abord *in vitro* ce sont les seules cellules à posséder le potentiel à stimuler efficacement les lymphocytes T dans des réactions mixtes lymphocytaires (Steinman and Witmer, 1978), mais aussi à présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T (De Bruijn et al., 1992; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). De plus, la réinjection de DC purifiées et chargées en antigène permet, non seulement, l'activation des lymphocytes T *in vivo* (Inaba et al., 1990) mais également l'induction de réponses spécifiques de cet antigène, humorales (Sornasse et al., 1992) et cytotoxiques (Boog et al., 1985). Enfin, les DC jouent un rôle important dans l'initiation d'une grande variété de réponse des lymphocytes T, telles que les réactions de sensibilité de contact (Aiba and Katz, 1990; Macatonia et al., 1987), et les rejets d'allogreffes (Faustman et al., 1984; Larsen et al., 1990).

Ces DC sont très efficaces car elles expriment des complexes constitués des molécules du CMH et de peptides antigéniques, qui sont reconnus par le complexe récepteur T (TCR) des lymphocytes T. C'est le "signal 1" dépendant des antigènes. L'activation par le TCR est stabilisée par des molécules d'adhésion (LFA-1/ICAM-1,-2,-3, CD2/LFA-3, et ICAM-3/DC-SIGN) et amplifiée par des signaux venant de molécules de costimulation, (CD80, CD86, CD40), ainsi que par des cytokines (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12,). C'est le "signal 2" dit de costimulation ([Figure 7](#)). L'activation d'un lymphocyte T ne se fait qu'au terme d'une balance sensible entre ces deux types de signaux. Lorsque ces signaux sont adéquats, ils sont intégrés par les lymphocytes T pour entraîner les évènements biochimiques puis génétiques permettant leur activation, leur prolifération et leur différenciation.

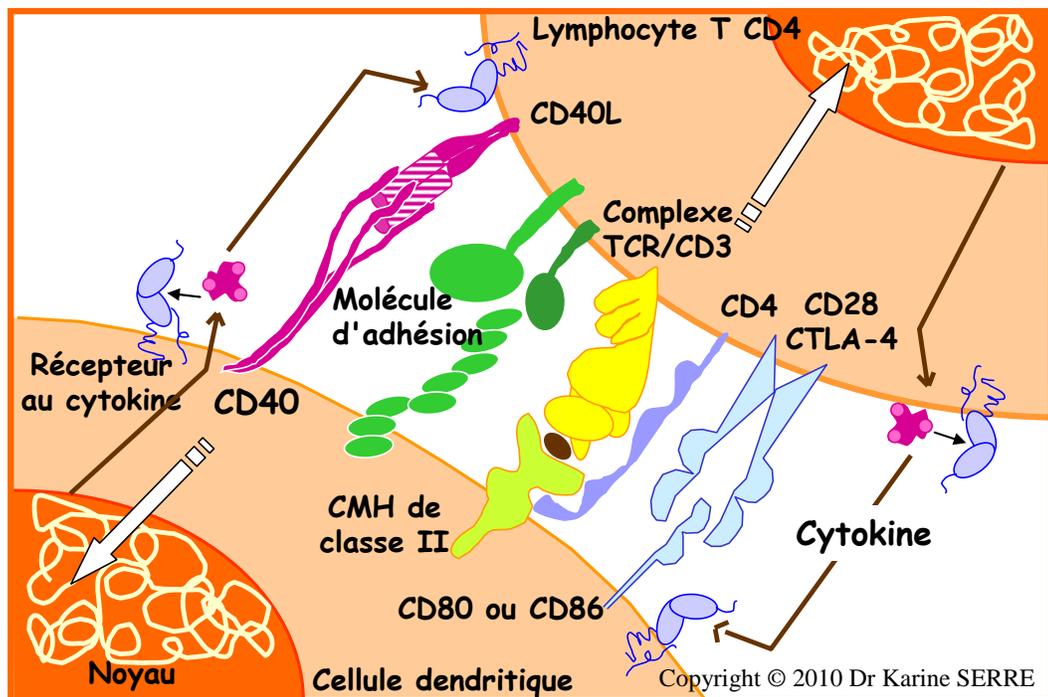


Figure 7 : Dialogue entre une cellule dendritique et un lymphocyte T CD4.

Les lymphocytes T CD4 reconnaissent les peptides présentés en association avec les molécules du CMH, par les DC. Cette interaction est renforcée par des molécules d'adhésion (LFA-1, CD2, ICAM-1, DC-SIGN) et induit l'expression de CD40L sur les lymphocytes T. L'engagement de CD40 sur les DC provoque la sécrétion de cytokines et l'augmentation de l'expression de molécules de costimulation, (CD80/CD86), ce qui permet de soutenir l'activation et la prolifération des lymphocytes T. L'expression de CD80/CD86 sur les DC engage CD28 et/ou CTLA-4 sur les lymphocytes T. Ces derniers sécrètent alors des cytokines (IL-2 précocement, IFN- γ (Th1) ou IL-4 (Th2) tardivement) qui vont maintenir l'activation des DC, et agir également en boucle autocrine sur la prolifération des lymphocytes T.

Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

La physiologie des DC pourrait se résumer en trois phénomènes, 1) capture et apprêtement des antigènes entraînant la formation et l'expression de complexes formés des molécules du CMH en association avec des peptides, 2) expression de molécules membranaires (ICAM-1, LFA-3, CD80, CD86, CD40) et sécrétion de cytokines (IL-12) participant à la stimulation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T, 3) *in vivo*, leur localisation en périphérie s'accompagne d'un processus de migration jusqu'aux zones T des organes lymphoïdes secondaires.

Nous décrirons, à présent dans cette introduction, les propriétés fascinantes de ces cellules telles que : exprimer des récepteurs reconnaissant les pathogènes, répondre aux changements de leur microenvironnement, migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, présenter les antigènes capturés, et interagir avec des lymphocytes et activer les rares qui sont spécifiques de ces antigènes.

4)- Différents mécanismes de capture des pathogènes et des antigènes

Le rôle initial des DC est de reconnaître immédiatement un pathogène entrant dans l'organisme. Elles doivent donc réagir très rapidement et ce, pour des doses d'antigènes ou un nombre de pathogènes très faibles. Pour cela, les DC immatures doivent capturer et internaliser très efficacement une grande variété d'antigènes. Pourtant elles n'expriment pas des récepteurs spécifiques aux antigènes comme le TCR des lymphocytes T, et de façon très comparative le BCR des lymphocytes B. Les DC possèdent d'autres mécanismes responsables de la capture antigénique, 1) la macropinocytose, 2) la reconnaissance par des récepteurs (PRR : Pattern Recognition Receptors, par exemple TLR : Toll Like Receptor, MMR, DEC-205...), spécifiques de molécules invariables exprimées par les pathogènes et absentes des cellules de vertébrés (PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns), 3) la reconnaissance par des récepteurs utilisant des produits de l'immunité acquise (CR, FcR...), 4) la phagocytose des corps apoptotiques.

In vivo, les DC sont, vraisemblablement, confrontées à de très faibles concentrations d'antigènes ou à un petit nombre de pathogènes. Il faut donc supposer que ces cellules ont les moyens d'être extrêmement efficaces. Divers récepteurs assurant l'internalisation d'antigènes exogènes ont été décrits. La notion de récepteurs est importante car ils sont impliqués dans deux fonctions essentielles : d'une part, la reconnaissance, la capture et l'internalisation des antigènes et d'autre part, l'activation cellulaire. Il faut donc tenir compte de deux aspects fondamentaux dans l'efficacité des récepteurs : l'un est quantitatif (une plus grande quantité d'antigène est internalisée), l'autre est qualitatif (lié à la fois au devenir intracellulaire de l'antigène et au potentiel de certains de ces récepteurs à activer les cellules). Différents récepteurs reconnaissent les antigènes à de très faibles concentrations (de l'ordre du nanomolaire) et semblent influencer le processus de leur présentation en les concentrant dans

certaines compartiments cellulaires favorisant leur dégradation et/ou leur rencontre avec les molécules du CMH de classe II et/ou de classe I. Ainsi, la reconnaissance des antigènes par différents récepteurs peut influencer : 1) la quantité d'antigène internalisé, 2) le compartiment intracellulaire dans lequel l'antigène est dégradé, 3) le répertoire des peptides produits, 4) l'efficacité de chargement des peptides dans les molécules du CMH de classe II ou de classe I, 5) l'état d'activation de la DC. Ce sont tous ces paramètres qui contrôlent l'amplitude de l'activation des lymphocytes T et le type de réponse qui va être initié. Nous tenterons de décrire les récepteurs connus, et responsables de l'une ou des deux de ces propriétés (quantitative ou qualitative), essentielles à l'efficacité des DC dans leur fonction de présentation.

4.1)- Reconnaissance non spécifique

La macropinocytose, est un processus par lequel les DC internalisent de grandes quantités de liquide extracellulaire en absence de récepteur. Ce processus peut être efficace pour la présentation de très fortes concentrations d'antigènes solubles. Cette ingestion, indépendante des vésicules recouvertes de clathrine, s'effectue par des invaginations de la membrane sous la dépendance de l'actine. Les DC dérivées de monocytes criblent ainsi les molécules de leur environnement au rythme du volume d'une cellule par heure (Sallusto et al., 1995). Elles présentent les antigènes, acquis à de fortes concentrations, par macropinocytose aux lymphocytes T.

Cependant, la réalité physiologique de ce mécanisme n'est pas démontrée. En d'autres termes, les DC sont-elles soumises à de fortes concentrations d'antigènes solubles, à la phase initiale, dans l'environnement d'infections ou de tumeurs ? De plus, ce mécanisme se fait en absence de reconnaissance spécifique des antigènes et semble être basé plus sur le principe quantitatif que qualitatif. Comment les DC, dans de telles conditions, reçoivent-elles les signaux nécessaires à leur activation ?

Les DC sont également capables de phagocytose même si elles sont moins efficaces que les macrophages (Matsuno et al., 1996). Ce phénomène nécessite la polymérisation de l'actine qui initie la formation de pseudopodes, qui vont "engloutir" la particule dans des structures vésiculaires appelées phagosomes. Les cellules de Langerhans immatures ont aussi des propriétés de phagocytose comme cela a été montré pour des pathogènes (*Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium parvum*, *Staphylococcus aureus*), pour le zymosan, ou pour des billes de latex (Reis e Sousa et al., 1993). La phagocytose d'une particule est un processus important dans l'activité des DC, qui leur permet d'internaliser des corps étrangers de grande taille (de l'ordre du micromètre). C'est un processus à deux étapes, la première est l'attachement sur un récepteur qui est suivi par l'ingestion. Ceci nécessite donc, au préalable, l'engagement d'un récepteur (bien que les récepteurs permettant la phagocytose de pathogènes ne soient pas toujours identifiés).

4.2)- Reconnaissance directe des pathogènes par des récepteurs

Nous avons défini précédemment deux types d'immunité, innée ou acquise. Si l'immunité innée peut lutter directement contre des infections, l'immunité acquise, quant à elle, doit être éduquée et les lymphocytes T et B capables de reconnaître le pathogène doivent être activés. Ces deux bras de l'immunité possèdent des récepteurs dont les codes génétiques sont basés sur des stratégies fondamentalement différentes. Les récepteurs exprimés par les cellules de l'immunité innée (PRR) ont émergé tôt dans l'évolution pour reconnaître des motifs communs exprimés uniquement sur les pathogènes. Leur spécificité est identique quelque soit le type cellulaire qui l'exprime. Ces récepteurs n'ont pas besoin d'être sélectionnés par l'organisme, puisqu'ils l'ont été tout au long de l'évolution pour ne reconnaître que des motifs qui n'appartiennent pas à l'hôte.

Les premières fonctions associées à ces récepteurs devraient se placer dans la lutte directe contre les pathogènes comme la sécrétion de peptides anti-microbiens (criptidines), ou l'initiation de réponses inflammatoires. Puis, de nouvelles fonctions ont du apparaître, liées au rôle du système immunitaire inné dans l'activation des cellules de l'immunité acquise. Comme le suggère Charles Janeway, ces récepteurs régulent l'expression des molécules de costimulation, (CD80 et CD86), qui sont nécessaires à l'activation des lymphocytes (Janeway, 2001).

Des récepteurs de plus en plus spécifiques sont ensuite apparus, tels que les récepteurs des lymphocytes T et des lymphocytes B, les cellules de l'immunité acquise. Ces récepteurs, au contraire, nécessitent un réarrangement des segments géniques responsables de leur spécificité et de leur diversité. Chaque lymphocyte exprime un seul récepteur qui a une spécificité donnée. Dans le thymus pour les lymphocytes T, ou la moelle osseuse pour les lymphocytes B, dès qu'un lymphocyte exprime un récepteur fonctionnel, il est sélectionné. Leur différenciation, au terme de laquelle ils rejoignent la périphérie, est extrêmement régulée, et ceux qui reconnaissent trop fortement des molécules de l'organisme sont éliminés. Une fois en périphérie pour survivre, ces lymphocytes T naïfs ont besoin d'engager faiblement leur TCR sur des complexes CMH/peptide du soi. Cet engagement est faible puisqu'il n'entraîne leur activation optimale, mais maintient l'homéostasie des lymphocytes T.

Lorsqu'un pathogène pénètre dans l'organisme et stimule les cellules de l'immunité innée, ces dernières présentent alors des peptides en association avec les molécules du CMH et augmentent l'expression des molécules de costimulation. C'est à la fois la présentation de complexes CMH/peptides étrangers qui sont reconnus par de rares lymphocytes T avec une très fortes affinité, et la présence de molécules de costimulation, qui permettent l'activation et la prolifération de ces lymphocytes T.

On peut imaginer deux modèles, qui ne sont probablement pas exclusifs, d'ailleurs. Le premier, où tout est basé sur le répertoire des lymphocytes T qui ne doivent reconnaître, avec une forte affinité, que des complexes CMH/peptides étrangers, et où les molécules de costimulation auraient un rôle important, mais pas décisionnel. Le second, où les lymphocytes T seraient tout à fait capables de reconnaître des complexes CMH/peptides étrangers et des complexes CMH/peptides du soi, mais qui ne seraient activés qu'en présence de molécules de costimulation qui auraient dans ce cas un rôle régulateur primordial. Dans ce second cas néanmoins, les cellules de l'immunité innée (et nous parlons là des DC) qui régulent subtilement leurs molécules de costimulation, joueraient alors un rôle prépondérant dans le contrôle des réponses immunes. Il faut alors supposer que les DC possèdent des moyens très spécifiques pour être activées préférentiellement en présence de pathogènes. Nous allons détailler les récepteurs impliqués dans la reconnaissance et la capture des pathogènes qui sont exprimés par ces cellules.

4.2.1)- Les récepteurs de la famille Toll

Lors d'infections par des bactéries Gram-négatives, du lipopolysaccharide (LPS, endotoxine) est libéré dans le microenvironnement du foyer infectieux. Un des mécanismes, servant à activer et recruter les monocytes et les macrophages, utilise une protéine circulante, la LBP (lipopolysaccharide binding protein) qui lie le LPS. Ce complexe est ensuite reconnu par les monocytes via CD14. Bien que les DC n'expriment pas CD14, elles peuvent d'une part, être dérivées des monocytes CD14+ et d'autre part elles sont extrêmement sensibles à la présence de LPS. En effet, ce dernier induit efficacement leur maturation *in vitro* et *in vivo*, la sécrétion de cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ), et l'augmentation des molécules de classe II et de costimulation (CD80, CD86, CD40). Un mécanisme a été proposé afin d'expliquer comment, en absence de CD14, les DC pouvaient être activées par le LPS. CD14 est une glycoprotéine ancrée dans la membrane plasmique des cellules par un motif glycoposphatidylinositol (GPI). Une forme soluble existe dans le sérum et pourrait rendre compte de l'effet du LPS sur les DC (Verhasselt et al., 1997). La découverte chez les vertébrés, de récepteurs homologues aux molécules de la famille Toll, les TLR (Toll-Like Receptors) (Aderem and Ulevitch, 2000; Anderson, 2000) a permis de mieux comprendre les mécanismes d'action du LPS. Ce dernier est retenu par la LBP et CD14 soluble, ce complexe s'associe alors au TLR4 pour transmettre un signal intracellulaire (Yang et al., 1998).

Les molécules Toll ont été originellement découvertes chez la *Drosophile*. Ces molécules extrêmement intéressantes sont des médiateurs de l'embryogenèse, mais surtout sont impliquées dans le déclenchement d'une immunité innée que l'on pourrait considérer comme "primitive", car elles contrôlent la sécrétion de peptides à activité anti-microbienne (Lemaitre et al., 1997; Meister et al., 1997). Le laboratoire de Charles Janeway, a le premier caractérisé un homologue de ces molécules Toll chez l'homme (Medzhitov et al., 1997). Ces TLR, dont

on compte pour l'instant une dizaine de membres, pourraient représenter un des plus anciens systèmes de défenses contre les pathogènes trouvés chez les vertébrés, les insectes et les plantes. Ces récepteurs TLR confèrent aux cellules qui les expriment deux propriétés impliquées dans la mise en place d'une réponse immune.

La première, est de détecter une grande variété de pathogènes (des bactéries Gram-négatives ou Gram-positives, des mycobactéries, des champignons...), car les ligands reconnus sont ceux hautement conservés chez les pathogènes, les PAMP, par exemple le LPS, des carbohydrates, des peptidoglycanes, les acides nucléiques bactériens (caractérisés par des motifs non méthylés de CpG) et les acides nucléiques viraux (caractérisés par des doubles brins d'ARN) (Figure 8A). Chaque TLR pouvant reconnaître plusieurs ligands qui ne sont pas forcément partagés par les autres récepteurs. Par exemple, TLR2 reconnaît entre autres des peptidoglycanes et des lipoprotéines, TLR4 est sensible au LPS et aux acides lipoteichoïque, TLR9 interagit avec les ADN CpG des bactéries.

La seconde, est leur capacité à transduire des signaux d'activation intracellulaire. Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I, contenant plusieurs domaines extracellulaires riches en leucines, un domaine intracellulaire très similaire à la portion cytoplasmique du récepteur à l'IL-1. Ce domaine est responsable des signaux d'activation intracellulaire capable de lier les molécules adaptatrices MyD88 ou TIRAP (Hornig et al., 2001) qui permettent le recrutement de kinases comme IRAK qui sont ensuite associées à des facteurs de transcription, notamment de la famille de NF- κ B (Medzhitov et al., 1997) et des MAP-kinases (Muzio et al., 1998) (Figure 8B). Les ligands reconnus par ces TLR témoignent tous de la présence de pathogènes dans l'environnement. Ce sont donc des récepteurs extrêmement importants qu'il est logique de trouver exprimés par les DC (Kaisho and Akira, 2001; Pulendran et al., 2001b).

L'engagement des TLR induit la maturation des DC qui augmentent leur molécules de costimulation et produisent des cytokines pro-inflammatoires (Hertz et al., 2001; Krug et al., 2001; Re and Strominger, 2001; Thoma-Uszynski et al., 2000). L'analyse des profils d'expression des ARNm des dix TLR, sur trois populations de DC humaines, ont montré de grandes différences d'expression selon l'origine des DC (Kadowaki et al., 2001). Les DC CD11c+ immatures du sang expriment les ARNm des TLR1, 2, 3 >> 5, 6, 8 et 10. En réponse aux peptidoglycanes des ligands de TLR2 ces DC produisent du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-12. Des DC immatures dérivées à partir de monocytes (les DC1) ont des ARNm spécifiques de TLR1, 2, 4, 5, 8 >> 6. La stimulation de ces DC1 par des peptidoglycanes provoque la sécrétion de TNF- α et d'IL-6. Enfin, les DC plasmacytoïdes (les DC2) expriment les ARNm des TLR7, 9 >> 1, 6 et 10. Les cytokines produites par ces DC2 sont l'IFN- α en présence CpG et l'IL-12 en présence d'ARN double brin.

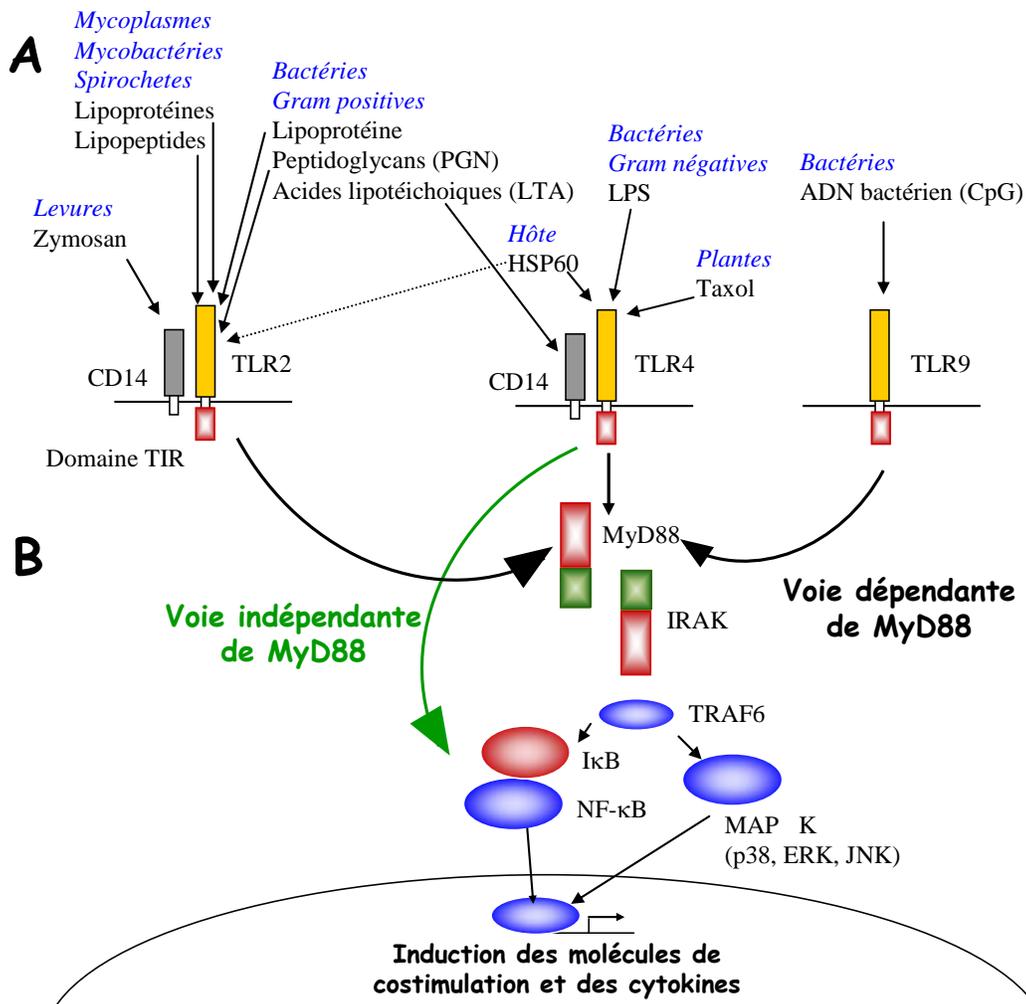


Figure 8 : Ligand et signalisation intracellulaire des récepteurs de la famille Toll.

A) Jusqu'à présent, certains ligands de trois TLR (TLR2, 4, 9) ont pu être identifiés. L'origine de ces ligands est spécifiée en *italique*. CD14 retient le ligand et facilite l'interaction avec les TLR.

B) La portion intracellulaire des récepteurs de la famille Toll (Domaine TIR) est homologue à la région intracellulaire des récepteurs à l'IL-1. Ces trois récepteurs empruntent une voie de signalisation intracellulaire dépendante de MyD88 qui active séquentiellement NF-κB et les MAPK grâce à IRAK et TRAF6. Seul le TLR4 possède aussi une voie d'activation, indépendante de MyD88, qui conduit également à l'activation de NF-κB et des MAPK mais avec une cinétique ralentie.

MAPK : mitogen-activated protein kinase, IRAK : IL-1 receptor associated kinase, MyD88 : myeloid differentiation factor 88, TRAF : tumor necrosis factor associated factor, ERK : extracellular signal-regulated kinase, JNK : Jun N-terminal kinase

Adapté de Kaisho, T. et Akira, S., Trends in Immunology. 2001, 22: 78-83
Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

Il y a deux notions importantes à souligner dans ces résultats. La première, est que le profil d'expression des TLR par une population de DC est directement corrélé à la capacité de réponse à un certain type de stimulus microbien (LPS, ou peptidoglycanes, ou CpG, ou d'ARN double brin). Un ligand néanmoins, provenant de l'organisme a été montré capable d'activer des cellules de l'immunité innée via TLR2 et TLR4, la protéine HSP60 (Heat Shock Protein) (Ohashi et al., 2000; Vabulas et al., 2001). Les protéines HSP, qui contrôlent la conformation des protéines et préviennent leur agrégation, peuvent être libérées par les cellules endogènes lors d'un stress qui témoigne d'une situation de "danger".

La seconde, est que l'engagement d'un TLR est associé à un type de réponse particulier, c'est-à-dire à la sécrétion de certaines cytokines (TNF- α , ou IFN- α , ou IL-6, ou IL-12). Ces deux notions suggèrent que l'efficacité des DC à induire un type de réponse pourrait dépendre des informations reçues du pathogène et de l'environnement, mais aussi de leur profil d'expression en TLR.

Ces récepteurs Toll sont extrêmement intéressants car ils sont dédiés à la détection de la présence de pathogènes en induisant l'activation des DC. Cependant, leurs fonctions ne semblent pas directement associées à la présentation d'antigènes. Ce qui peut s'expliquer (outre l'absence d'études concernant les propriétés de présentation antigénique par ces récepteurs), par la nature des ligands reconnus qui sont essentiellement solubles et plutôt des sucres, des glycoprotéines ou des lipides. Le récepteur TLR2 néanmoins, est efficace pour présenter, dans le contexte des molécules de classe I, un antigène formé d'une protéine (OmpA) composante de la membrane externe de bactéries Gram-négatives (*Klebsiella pneumoniae*) couplée à de l'ovalbumine (OVA) (Jeannin et al., 2000).

L'activation cellulaire et l'internalisation des pathogènes afin de présenter des peptides aux lymphocytes T, pourraient être deux fonctions séparées, qui se sont associées au cours de l'évolution. Les TLR correspondraient aux premiers récepteurs apparus dans l'évolution, et destinés à induire une immunité. Ils ne nécessitent pas la capture des pathogènes, mais étaient responsables de l'activation des cellules. Ils induisent des fonctions effectrices, comme la sécrétion de peptides bactéricides, qui a évolué vers la production de cytokines (entre autres). L'évolution du système immunitaire a permis l'apparition de lymphocytes T ayant une reconnaissance de plus en plus spécifique des agents pathogènes, via leur TCR. L'ingestion est une fonction très ancienne, impliquée dans la nutrition des cellules. La nécessité de stimuler ces lymphocytes a généré de nouvelles fonctions, comme l'internalisation des pathogènes, mais associée au processus de présentation de peptides en association avec les molécules du CMH.

4.2.2)- Les récepteurs au mannose

Le récepteur au mannose (MMR) est spécifique de glycoprotéines, ayant des résidus mannose, fucose, N-acetyl-glucosamine ou glucose terminaux (Stahl and Ezekowitz, 1998). Ces résidus sont rarement trouvés à la surface des cellules de vertébrés mais ce sont des composants de la surface de bactéries, de levures ou de parasites. C'est un récepteur transmembranaire, de la famille des lectines de type I, contenant un domaine riche en cystéine en NH₂ terminal, un domaine fibronectine de type II, huit domaines de reconnaissance aux carbohydrates, un domaine transmembranaire et un petit domaine intracellulaire. Ce dernier contient des motifs d'endocytose.

Ce récepteur au mannose est principalement exprimé par les macrophages et les cellules endothéliales du foie. Peu de DC l'expriment, si ce n'est celles dérivées des monocytes à un stade immature (Sallusto et al., 1995) ainsi qu'une population présente dans le sang (CD4+, CD11b-), car elles présentent des antigènes mannosilés dans le contexte des molécules de classe II (Tan et al., 1997) mais aussi par les molécules de classe I non classiques CD1b (Prigozy et al., 1997). Il a même été suggéré que le récepteur au mannose pourrait participer à la capture de virus et à la production d'IFN- α par cette population de DC sanguine (Milone and Fitzgerald-Bocarsly, 1998). Bien que les cellules de Langerhans internalisent le zymosan, de manière dépendante du mannane, ces cellules ne semblent pas exprimer le récepteur au mannose. Ceci suggère qu'elles expriment un autre récepteur rendant compte de l'endocytose de résidus mannosilés. Un bon candidat, DEC-205, est une protéine appartenant à la famille du récepteur au mannose.

DEC-205 est une protéine très proche du récepteur au mannose bien qu'elle contienne dix domaines lectine de reconnaissance aux carbohydrates. DEC-205 a été cloné chez l'homme et chez la souris et présentent 77% d'homologie sur la séquence d'acides aminés, suggérant une forte conservation au cours de l'évolution (Kato et al., 1998). Cependant, il n'y a que 30% d'homologie sur la séquence d'acides aminés entre DEC-205 et le récepteur au mannose, laissant supposer que les fonctions précises de ces deux molécules sont peut-être différentes.

Initialement mis en évidence chez la souris dans les tissus périphériques grâce à un anticorps monoclonal (NLDC-145 pour : Non Lymphoid Dendritic Cells) reconnaissant les cellules de Langerhans (Kraal et al., 1986), la molécule a été trouvée plus tard et nommée DEC-205 (Swiggard et al., 1995). Puis il s'est avéré que les DC dérivées de la moelle osseuse, celles du sang et de la lymphe étaient capables d'exprimer cette molécule, et même au sein des organes lymphoïdes (rate, ganglions, thymus) où deux populations ont émergé sur la base de DEC-205 positive et DEC-205 négative (Inaba et al., 1995; Witmer-Pack et al., 1995). Dans les organes lymphoïdes, l'expression de DEC-205, bien que ce ne soit pas systématique, est généralement associée à l'expression de CD8 α . Les cellules se localisent au niveau des zones T et sont dites DC interdigitées.

Même si le ligand de DEC-205 n'est pas encore identifié, cette molécule semble intervenir dans la capture et la présentation d'antigènes. En effet, des DC dérivées de la moelle osseuse présentent des anticorps de lapin spécifiques de DEC-205 à des hybridomes T CD4, reconnaissant des peptides issus de la dégradation des IgG de lapin (Jiang et al., 1995). DEC-205 est un récepteur d'endocytose qui recycle, et délivre les antigènes dans les endosomes tardifs et lysosomes, riches en molécules de classe II et en LAMP-1 (Lysosomal Associated Membrane Proteins) (Mahnke et al., 2000). Il semblerait cependant, que le récepteur au mannose ne délivre pas son ligand dans ces mêmes compartiments.

In vivo, une protéine chimérique, faite de la partie spécifique de l'anticorps NLDC-145 et du peptide issu du HEL (46-61) a été utilisée, pour délivrer le peptide sur le DEC-205 exprimé par les DC. Une injection, par voie sous cutanée ou dans le sang, permet de diriger l'antigène sur les DC des zones T des organes lymphoïdes. Elles induisent ensuite l'activation et la prolifération de lymphocytes T CD4 spécifiques de ce peptide, préalablement transférés dans ces souris (Hawiger et al., 2001). Cependant, même si cette activation est plus efficace qu'après immunisation avec le peptide en présence de CFA, le nombre de lymphocytes T CD4 produits décroît rapidement et les cellules restantes ne répondent plus à une nouvelle immunisation. Néanmoins, la coinjection de cette protéine chimérique avec l'anticorps agoniste spécifique de CD40, permet de soutenir l'activation des lymphocytes T CD4 et de prolonger l'immunité.

Ces résultats posent différentes questions. Le domaine intracellulaire de DEC-205 ne possède pas de motifs capables de transduire une cascade d'activation et il n'a jamais été démontré que l'engagement de ce récepteur induisait la maturation des DC. Ceci est surprenant pour un récepteur qui devrait être impliqué dans la reconnaissance de pathogène et donc capable d'activer les cellules. Est ce que la fonction de DEC-205 se limite à délivrer les antigènes dans les bons compartiments de présentation, riches en molécules de classe II ? Lors de l'injection de la protéine chimérique par voie sous cutanée cette dernière est-elle prise en charge au site d'injection par des cellules de Langerhans par exemple, ou directement par les DC au sein des zones T des ganglions ? Enfin dans ces organes lymphoïdes les DC semblent avoir différents niveaux de maturation où, celles qui sont dans la zone marginale de la rate sont plus immatures que celles localisées dans les zones T. Les DC présentes dans les zones T semblent avoir atteint un stade terminal de maturation qui s'accompagne généralement (tout du moins *in vitro*) d'une diminution des capacités de capture antigénique. Pourquoi, alors, ces DC expriment-elles toujours DEC-205, et, quel est son rôle ?

Enfin, d'autres molécules appartenant à la famille des lectines de type C ont été identifiées : la langérine, DCIR (Bates et al., 1999), NKRP1A (Poggi et al., 1997). La langérine contient un domaine de reconnaissance aux carbohydrates (Valladeau et al., 2000). Elle possède, de plus, dans sa région intracellulaire un domaine riche en proline qui pourrait participer à la

transduction d'un signal, bien qu'il n'ait pas été démontré qu'elle puisse induire la maturation outre la formation des granules de Birbeck. La langérine est en effet, exprimée exclusivement à la surface des cellules de Langerhans et semble participer à la reconnaissance d'antigènes qui sont ensuite concentrés directement dans ces granules. Cependant, ces granules ne sont pas des compartiments riches en molécules de classe II. Ce qui suggère que le devenir de l'antigène, reconnu par la langérine serait différent du routage classique de la voie d'endocytose dédiée à la présentation aux lymphocytes T CD4. Le ligand de la langérine n'a pas été précisément identifié bien que cette molécule possède la séquence potentielle de liaison au mannose et que la fixation de l'anticorps reconnaissant la langérine, soit inhibée en présence de mannane. Le rôle de cette molécule reste donc encore à éclaircir.

4.2.3)- Les récepteurs aux cellules nécrotiques ou apoptotiques

Les DC doivent induire une immunité. Elles sont très sensibles à des signaux exogènes produits par des pathogènes. Néanmoins, elles sont aussi capables de répondre à des signaux endogènes, délivrés par des cellules soumises à un fort stress qui peut induire la mort par nécrose (comme lors d'une blessure ou d'une infection). La mort par apoptose (mort cellulaire programmée), en revanche, est un évènement "naturel" qui se produit tout au long de la vie d'un organisme. Il existe actuellement une controverse afin de savoir lesquelles, des cellules nécrotiques ou apoptotiques, sont les plus efficaces pour activer les DC. L'intérêt de cette question se situe dans le cadre du développement de nouvelles immunothérapies anti-tumorales.

Les cellules nécrotiques libèrent dans le milieu des produits témoignant d'un stress, comme les protéines de choc thermique : les HSP (Palliser, 2001). Ces protéines ont deux propriétés, elles jouent un rôle dans l'activation du système immunitaire inné et dans l'induction de réponses cytotoxiques. Tout d'abord, ces protéines provoquent la maturation des DC (Singh-Jasuja et al., 2000) HSP60 par exemple, est reconnu par le TLR2 (Vabulas et al., 2001). Ensuite, elles possèdent des sites de liaisons à des peptides. Elles peuvent être purifiées et chargées en peptides synthétiques *in vitro*, et délivrer ces derniers très efficacement dans les compartiments appropriés à la présentation dans le contexte des molécules de classe I (Castellino et al., 2000). Il a donc été intéressant de tirer profit de ces complexes, HSP associées à des peptides immunogéniques endogènes, qui peuvent également être relargués par les cellules tumorales nécrotiques, dans le cadre de la lutte anti-tumorale (Wells and Malkovsky, 2000).

La capture de cellules apoptotiques peut aussi être importante, lors de la mise en place d'une immunité contre des infections ou des tumeurs, qui dans certains cas peuvent induire l'apoptose. Il peut donc être favorable au système immunitaire de présenter des antigènes exprimés par ces cellules apoptotiques. Les DC sont capables de phagocyter des cellules nécrotiques et apoptotiques ainsi que d'en présenter des antigènes (Albert et al., 1998b;

Ferlazzo et al., 2000). Ces dernières sont reconnues par des intégrines exprimées par les DC comme $\alpha\beta3$ (Rubartelli et al., 1997), $\alpha\beta5$, mais aussi par des récepteurs comme CD36 (Albert et al., 1998a). CD14 et le récepteur au complément peuvent également intervenir dans la capture des corps apoptotiques (Gregory, 2000). Néanmoins, des études comparatives ont montré que les cellules nécrotiques libéraient plus de protéines HSP que les cellules apoptotiques (Basu et al., 2000) et que des cellules tumorales nécrotiques étaient plus immunogènes que les mêmes cellules rendues apoptotiques (Melcher et al., 1998; Sauter et al., 2000).

L'hypothèse actuelle suggère que la mort par apoptose n'est pas un signal de danger, contrairement à la nécrose, et que non seulement les cellules apoptotiques seules ne peuvent activer efficacement le système immunitaire mais qu'en plus, elles induiraient plutôt un état de non réponse (Gallucci et al., 1999; Steinman et al., 2000). En effet, il a été démontré, au niveau de l'intestin, que les DC pouvaient transporter des corps apoptotiques jusqu'aux ganglions mésentériques et qu'elles étaient peu efficaces à activer des lymphocytes T (Huang et al., 2000a). Dans le cas d'infections virales, les DC pourraient capturer des cellules infectées apoptotiques. Leur immunogénicité pourrait alors être favorisée par la présentation d'antigènes exogènes dérivés des protéines virales et, par des facteurs d'activation (IFN- α) produits par microenvironnement local soumis à l'infection.

4.3)- Reconnaissance indirecte des pathogènes par des récepteurs

Les cellules de l'immunité innée sont également capables de profiter des produits de l'immunité acquise comme les anticorps, pour reconnaître les pathogènes. Il existe différents systèmes pouvant interagir avec les immunoglobulines et les trois majeurs sont : 1) les récepteurs aux fragments cristallisables (Fc) des immunoglobulines (FcR), 2) le récepteur au complément (CR), 3) les transporteurs d'immunoglobulines. Nous ne détaillerons ici que les FcR et les CR (les transporteurs d'immunoglobulines étant impliqués dans le passage des immunoglobulines au travers des muqueuses).

4.3.1)- Les récepteurs au complément

Le complément est un ensemble d'une trentaine de protéines à la fois sériques, et présentes à la surface cellulaire. Il fait partie de l'immunité innée et a de nombreux rôles dans l'établissement de réponses effectrices comme l'éradication de pathogènes et le déclenchement des réactions inflammatoires (Carroll, 1998; Carroll and Fischer, 1997). Les composants du complément interagissent, par exemple, avec les IgM et les IgG de complexes immuns par la fixation de C1q. Ceci déclenche la cascade d'activation classique du complément, générant les unités C3 et les composants protéolytiques qui peuvent alors détruire la particule (pathogènes ou cellules) sur laquelle ils sont fixés. Les récepteurs au complément participent également

dans la mise en place d'une réponse contre un antigène. Il a été montré que du HEL, couplé au composant C3d, était beaucoup plus immunogène que du HEL libre, suggérant un rôle de ce récepteur dans la capture d'antigènes et la présentation de peptides antigéniques (Dempsey et al., 1996).

Des populations de DC expriment un certain nombre de récepteurs au complément, bien que les fonctions de ces récepteurs ne soient pas toujours identifiées sur ces cellules. Les DC du sang expriment MAC-1 (CR3 : CD11b/CD18) (Thomas et al., 1993). Dans la rate et les ganglions, certaines populations expriment également CD11b. Les DC interstitielles et les cellules de Langerhans expriment le récepteur pour le composant C5a (CD88) et répondent à cette stimulation en déclenchant les processus de migration (Yang et al., 2000).

4.3.2)- Les récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines

Les FcR permettent la capture et l'internalisation des antigènes opsonisés. Ils combinent, en plus à cette propriété, la capacité d'activation de la cellule qui les expriment et d'acquisition de fonctions effectrices. Le potentiel extraordinaire de ces récepteurs est de conférer aux DC, grâce à une famille d'une dizaine de membres, la possibilité de reconnaître plusieurs milliers de formes antigéniques différentes.

Les récepteurs spécifiques des fragments Fc des immunoglobulines (Daeron, 1997; Ravetch, 1997) ont une distribution cellulaire variée (macrophages, DC, cellules NK, neutrophiles, mastocytes, lymphocytes B...). Ils sont responsables d'une grande diversité de fonctions effectrices telles que la phagocytose par les macrophages, l'ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) par les cellules NK, l'activation des neutrophiles, la dégranulation des mastocytes, la sécrétion de médiateurs de l'inflammation, l'inhibition des lymphocytes B, et la capture et la présentation d'antigène par les DC qui s'accompagne de leur activation. Il existe des récepteurs Fc μ R, Fc α R, Fc ϵ R, Fc γ R, pour chaque classe d'immunoglobuline, IgM, IgA, IgE, IgG, respectivement. À l'exception du récepteur de faible affinité aux IgE, Fc ϵ RII (CD23) qui est une lectine, tous ont des motifs extracellulaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Les récepteurs les plus étudiés sont les Fc ϵ R et Fc γ R. Nous développerons plus précisément les Fc γ R (Ravetch and Bolland, 2001) et leur participation dans la reconnaissance antigénique par les DC.

La famille des Fc γ R peut être divisée en trois classes : les Fc γ RI (CD64) de forte affinité ($K_a=10^{-9}M^{-1}$) qui peuvent lier des anticorps solubles, les Fc γ RII (CD32) et Fc γ RIII (CD16) de faible affinité ($K_a=10^{-7}M^{-1}$), ne fixant les anticorps que lorsqu'ils sont engagés en réseau avec des antigènes (les complexes immuns) (Bonnerot and Daeron, 1994; Capel et al., 1994). Chaque classe comprend plusieurs représentants (Fc γ RIa, b, c, Fc γ RIIa, b, c, Fc γ RIIIa, b chez l'homme). Chaque récepteur est composé d'une chaîne α qui assure la spécificité de la classe et de l'isotype des immunoglobulines reconnues. En effet, il semblerait que chez la souris les

IgG1 et IgG2b soient reconnues par les Fc γ RII et Fc γ RIII alors que les IgG2a sont reconnues par les trois types de récepteurs (Hazenbos et al., 1998; Meyer et al., 1998).

4.3.2.1)- Structure des Fc γ R et signalisation intracellulaire

La transduction des signaux sous ces récepteurs est assurée soit directement par la chaîne α (Fc γ RIIa et Fc γ RIIc), soit indirectement grâce à des sous unités accessoires. Trois chaînes accessoires ont été décrites (la chaîne γ , la chaîne β et la chaîne ζ), qui peuvent être partagées par les récepteurs, Fc γ RIa et Fc γ RIIIa. Elles sont responsables de l'assemblage et de la signalisation intracellulaire de ces récepteurs. Par exemple, les Fc γ RIa, Fc γ RIIIa, et Fc ϵ RI sont couplés à la chaîne γ et les souris déficientes en chaîne γ n'expriment aucun de ces récepteurs (Takai et al., 1994). La chaîne β est associée avec les Fc γ RIIIa et Fc ϵ RI. La chaîne ζ , qui est associée avec Fc γ RIIIa, est également présente dans le complexe multicaténaire du TCR. La chaîne γ et la chaîne ζ sont homodimériques (γ - γ et ζ - ζ), mais elles peuvent s'associer pour donner un complexe hétérodimérique (γ - ζ). Enfin, la chaîne β est une protéine à quatre domaines transmembranaires qui ne se dimérise pas. Les structures des différents Fc γ R humains sont représentées dans la [figure 9](#).

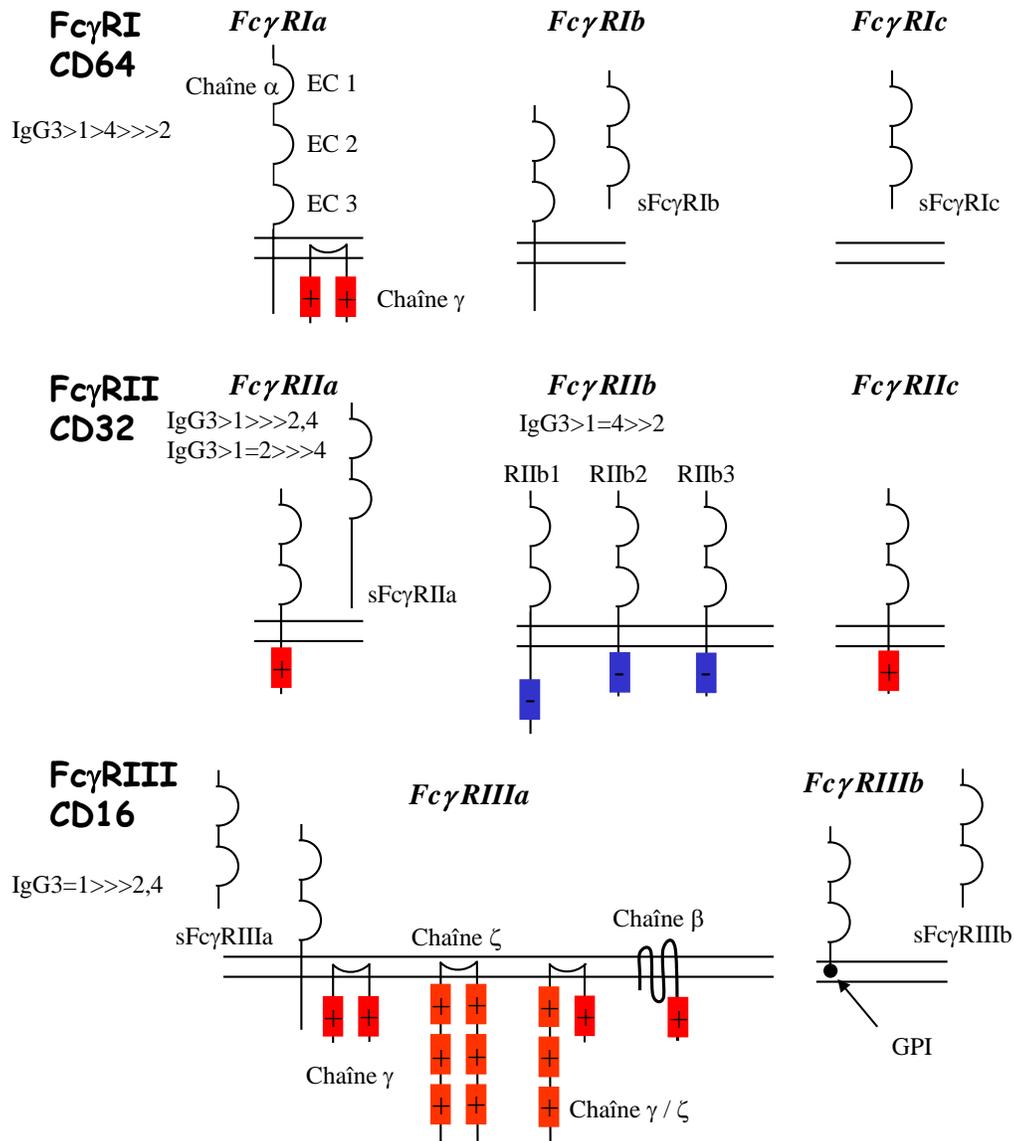


Figure 9 : Représentation schématique des récepteurs aux fragments Fc des IgG chez l'homme.

Chez l'homme, chaque classe de FcγR est représentée par deux ou trois gènes.

Les formes solubles connues pour chaque sous classe sont également représentées par sFcγRIb, par exemple.

EC : Domaine extracellulaire comportant les motifs appartenant à la superfamille des immunoglobulines, GPI : Glycosyl phosphatidyl inositol, IgG3=1>>>2,4 : ordre de spécificité de FcγR en fonction de la sous classe d'IgG, ■ ITAM, ■ ITIM

Adapté de Capel, P. et al., Immunomethods. 1994, 4: 25-34

Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

La voie de signalisation intracellulaire de beaucoup de Fc γ R est semblable à celle des récepteurs à l'antigène : le TCR des lymphocytes T, et le BCR des lymphocytes B. Ceci s'explique par la présence de motifs ITAM (Immune Receptor Tyrosine Activation Motif), communs aux FcR, BCR et TCR, dans les régions intracytoplasmiques (Cambier, 1995). Ces motifs sont présents directement sur la chaîne α ou sur les sous unités. Ce sont des séquences consensus composées de six acides aminés conservés dans une séquence longue d'environ 26 acides aminés (D/EX₇D/EX₂YX₂LX₇YX₂L). Les chaînes γ et β contiennent un motif ITAM alors que la chaîne ζ en contient trois. Lors de l'agrégation de ces récepteurs, ces motifs sont tout d'abord phosphorylés ce qui provoque alors le recrutement et l'activation de tyrosines kinases de la famille Src (lyn, lck, hck, Fgr) puis de tyrosines kinases de la famille Syk (syk, ZAP-70, btk, emt). Ces protéines phosphorylent et activent ensuite de nombreux substrats intracellulaires tels que PI3K et les PLC- γ ce qui résulte en l'augmentation du calcium intracellulaire. Ces événements conduisent à l'activation des petites protéines G, comme ras, qui phosphorylent les MEK kinases, qui peuvent ensuite activer les MAP kinases. Une fois dans le noyau, ces MAP kinases activent les facteurs de transcription (NF- κ B, c-fos, c-jun) qui induisent les fonctions effectrices correspondant à la fois au type de FcR engagé et au type cellulaire qui l'exprime. Cette description du processus d'activation intracellulaire, qui est schématique et brève, ne rend pas compte de la spécificité d'activation de telle ou telle tyrosine kinase qui est très dépendante du type cellulaire et des FcR étudiés.

Nous noterons également l'existence d'autres FcR qui ne contiennent pas de motifs d'activation mais, des motifs d'inhibition : les ITIM (Immune Receptor Tyrosine Inhibitor Motif). Ces motifs sont des séquences consensus composées de trois acides aminés conservés dans une séquence longue d'environ six acides aminés (I/V/L/SXYX₂L/V). Un seul gène est présent chez l'homme et chez la souris; c'est le récepteur inhibiteur Fc γ RIIb qui est une glycoprotéine caractérisée par un domaine extracellulaire très similaire aux récepteurs activateurs, mais qui contient dans son domaine intracellulaire un motif ITIM. Il est principalement exprimé sur les lymphocytes B, macrophages, neutrophiles et les mastocytes.

Enfin, il est important de souligner que, contrairement aux récepteurs à l'antigène comme le TCR et le BCR, les FcR ne sont pas exprimés de manière clonale et la plupart des cellules expriment plus d'un type de FcR. Ainsi, dans les processus d'engagement des FcR, l'agrégation de FcR identiques est un événement qui doit être rare. La coagrégation de différents FcR ou même avec d'autres type de récepteurs est plus probable. Par exemple, le Fc γ RIIb coagrège avec le BCR des lymphocytes B, et inhibe la signalisation intracellulaire de ce récepteur (Daeron et al., 1995).

4.3.2.2)- Expression des FcR par les cellules dendritiques

Les DC semblent exprimer différents récepteurs Fc (Fc α R, Fc ϵ RI, Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII ?) qui permettent la capture d'antigènes opsonisés par des anticorps. Néanmoins, à l'heure

actuelle le descriptif complet des différents FcR exprimés par les différentes populations de DC n'est pas précisément établi. Les anticorps qui jouent un rôle dans l'immunité innée, lors de la première rencontre avec un pathogène, sont probablement de faible affinité et déjà présents dans le sérum.

Bien que les IgM soient les premiers anticorps produits et qu'ils jouent un rôle important dans les premières étapes de la réponse immune, peu d'éléments sont connus concernant les caractéristiques structurales et fonctionnelles d'un Fc μ R. L'existence d'un récepteur spécifique aux IgM a pourtant été suggérée sur les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK (Mathur et al., 1988; Nakamura et al., 1993; Pricop et al., 1993). Récemment, un récepteur (Fc α / μ R), capable de fixer des IgA et des IgM, a été cloné chez la souris et son homologue a été trouvé chez l'homme (Shibuya et al., 2000). Bien que, ces études n'aient pas encore été réalisées sur les DC on peut pourtant penser qu'elles devraient exprimer un tel récepteur. Un mécanisme indirect existe néanmoins, pour reconnaître les IgM via le récepteur au complément.

Le récepteur, Fc α R (CD89), aux IgA1 et IgA2 est exprimé, *in vivo*, par les DC interstitielles humaines (Geissmann et al., 2001).

Le récepteur de forte affinité aux IgE, Fc ϵ RI, est exprimé par les cellules de Langerhans (Bieber et al., 1992) ainsi que par les DC du sang humain (Maurer et al., 1996).

Les récepteurs Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa sont exprimés sur les cellules de Langerhans, chez la souris, (Esposito-Farese et al., 1995). Les DC du sang humain exprimeraient plutôt les Fc γ RI et Fc γ RII (Fanger et al., 1996). Bien que les DC humaines ne semblent pas exprimer Fc γ RIII, il a été démontré que la forme soluble de ce récepteur pouvait activer les DC, suggérant même qu'elles pourraient l'utiliser par un mécanisme dépendant de CR3 (MAC-1) et de CR4 (de la Salle et al., 1997). L'expression de Fc γ RI sur ces cellules est, de plus, augmentée en présence des cytokines IFN- γ et IL-10 (Fanger et al., 1997). Les DC dérivées de la moelle osseuse de souris, quant à elles, pourraient exprimer les trois classes Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII (Regnault et al., 1999).

4.3.2.3)- Fonctions de présentation d'antigène des FcR

Au delà de leur rôle dans l'activation cellulaire, les FcR jouent un rôle prépondérant dans l'internalisation ([Figure 10](#)) (Amigorena and Bonnerot, 1999a; Amigorena and Bonnerot, 1999b). Les complexes immuns solubles sont internalisés par endocytose et les grosses particules sont internalisées par phagocytose. Ces deux processus d'internalisation requièrent les motifs ITAM (bien que leur rôle soit peu clair). L'internalisation par ces FcR permet la présentation des antigènes à des lymphocytes T CD4. Nous avons pu mettre en évidence que lorsque l'antigène est encapsulé dans des liposomes opsonisés, des concentrations 1000 à 10000 fois inférieures sont alors suffisantes, comparé au même antigène soluble. Nous montrerons, dans les articles 1 et 2, que les FcR permettent de délivrer les antigènes efficacement pour qu'ils soient présentés en association avec les molécules de classe II (Serre

et al., 1998) mais aussi de classe I (Machy et al., 2000). La présentation dans le contexte classe II est acquise très précocement lors de la différenciation en DC, alors que la présentation dans le contexte classe I nécessite un stade développemental plus tardif.

L'efficacité de ces récepteurs s'explique de manière quantitative. Pour internaliser la même quantité d'antigène, la cellule nécessite 1000 fois plus d'antigène lorsque celui-ci est soluble et capturé par macropinocytose, que lorsqu'il est endocyté grâce à un récepteur. De plus, il y a un aspect qualitatif. En effet, les épitopes produits dans ces deux cas, ne sont pas identiques. L'endocytose par un récepteur favorise l'émergence de peptides dits cryptiques, c'est à dire profondément enfouis dans les repliements de la protéine et dont l'apparition nécessite une dégradation importante. Il a été démontré que l'endocytose par des récepteurs permettait la concentration des antigènes dans des compartiments profonds de la voie d'endocytose où les processus de dégradation protéique sont les plus drastiques (Forquet et al., 1999; Zimmermann et al., 1999).

Des DC dérivées des monocytes du sang humains présentent à des lymphocytes T CD4, de faibles concentrations d'un antigène opsonisé avec des IgG (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Ces Fc γ R jouent un rôle prépondérant dans la présentation des antigènes dans le contexte des molécules de classe II. Il a également été montré qu'ils étaient capables de délivrer les antigènes pour qu'ils soient présentés dans le contexte des molécules de classe I (Guyre et al., 2001; Regnault et al., 1999). Le récepteur de forte affinité aux IgE, Fc ϵ RI, est responsable de la présentation d'antigène et ceci de manière dépendante d'une protéase, la cathepsine S (une protéase à cystéine) (Maurer et al., 1997; Maurer et al., 1998).

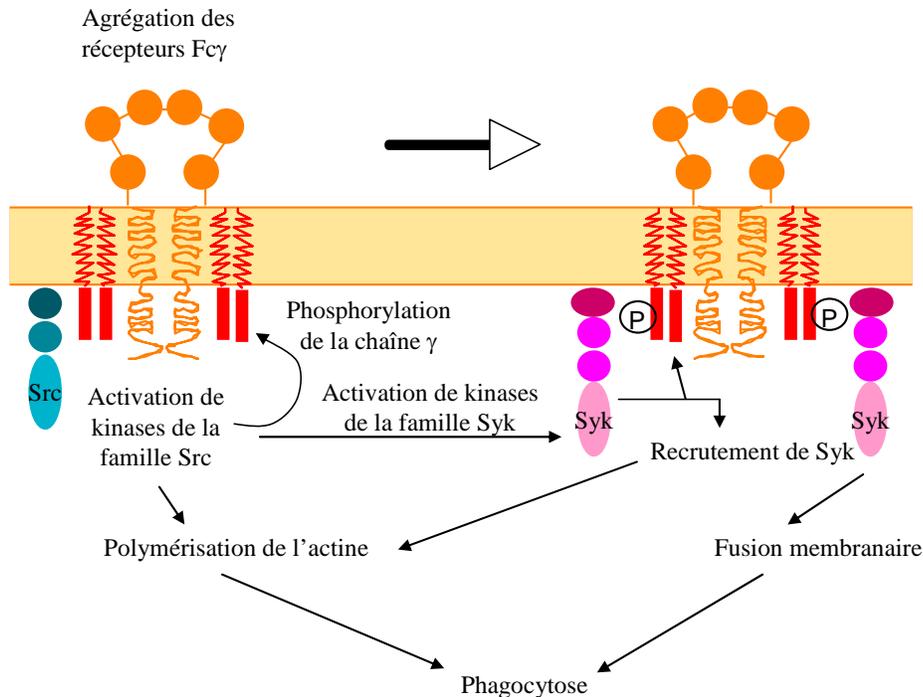


Figure 10 : Signalisation intracellulaire et internalisation sous le récepteur aux fragments Fc des IgG humaines.

Lors de l'agrégation de FcγR par des particules opsonisées, les kinases de la famille Src sont responsables de la phosphorylation de la chaîne γ des FcγR, ce qui entraîne le recrutement et l'activation de kinases de la famille Syk qui induisent l'internalisation des particules. Les kinases de la famille Src ont également une fonction dans l'induction de la polymérisation de l'actine, événement essentiel pour la phagocytose de la particule.

Adapté de Fitzer-Attas, C. J. et al., J. Exp. Med. 2000, 191, 4: 669-82
Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

4.3.2.4)- Rôles des FcR *in vivo*

L'efficacité démontrée *in vitro* a suggéré que ces récepteurs pouvaient être de bonnes cibles pour délivrer des antigènes *in vivo* aux DC et pourraient permettre de réduire la quantité requise d'antigène pour induire une réponse immune (Guyre et al., 1997). L'injection d'anticorps couplés à des peptides, permet d'augmenter la demi-vie de ces peptides, de les cibler sur des cellules exprimant les FcR, de réduire de 100 à 1000 fois la quantité de peptides nécessaires pour activer des lymphocytes T (Zanetti, 1992). *In vivo*, la participation de FcR a été montrée sur des DC circulant dans la lymphe afférente. Pour cela, des moutons sont immunisés avec de l'OVA afin d'induire la production d'anticorps anti-OVA endogènes. De l'OVA fluorescente est ensuite injectée dans le derme, et la lymphe afférente de ces animaux est recueillie par cannulation. Dès 40 minutes, 50% des DC sont fluorescentes (indiquant qu'elles ont capturé l'OVA) (Harkiss et al., 1990). L'immunisation de souris avec des complexes immuns permet d'augmenter la réponse humorale contre l'antigène (Heijnen et al.,

1996; Wernersson et al., 1999). L'influence des FcR a été plus précisément démontrée par l'utilisation de souris déficientes en chaîne γ et donc n'exprimant ni les Fc γ RIa, Fc γ RIIIa, ni les Fc ϵ RI. La génération de lymphocytes T CD4 spécifiques de l'OVA est moins importante chez les souris déficientes en chaîne γ que chez les souris normales. Les réponses d'hypersensibilité sont abolies, suggérant que les FcR sont importants pour la capture d'antigènes par les DC, et par conséquent pour l'activation des lymphocytes T (Hamano et al., 2000). Pour toutes ces raisons, les FcR sont des candidats potentiels pour délivrer des antigènes dans les DC *in vivo* (Deo et al., 1997).

Lors d'une infection primaire, toutefois, deux scénarios pouvant expliquer le rôle des anticorps, sont probables. Des anticorps peuvent pré-exister et reconnaître les agents infectieux. Néanmoins, en absence d'anticorps, les FcR ne sont peut-être pas les premiers récepteurs qui interviennent lors d'une réponse primaire. Ils pourraient être impliqués plus tardivement, dès que des anticorps spécifiques sont produits ou lors d'une réponse secondaire.

En conclusion, on peut maintenant mieux comprendre pourquoi les DC sont si peu représentées dans l'organisme puisqu'elles ont déployé des moyens extraordinairement efficaces pour reconnaître et capturer les antigènes. Les DC emploient une grande diversité de récepteurs pour détecter et/ou capturer les pathogènes (Figure 11). C'est une tout autre stratégie que celle utilisée par les lymphocytes, où la diversité repose sur la clonalité des récepteurs exprimés. Il est donc nécessaire de produire un grand nombre de lymphocytes pour reconnaître le maximum d'antigènes.

Les DC ont une grande plasticité pour reconnaître des antigènes et les présenter en association avec les molécules de classe II. Nous avons montré, dans les articles 1 et 2, que les contraintes imposées pour la présentation aux lymphocytes T CD4 sont beaucoup moins drastiques que celles imposées pour la présentation aux lymphocytes T CD8 (Machy et al., 2000). En effet, un antigène encapsulé dans des liposomes dirigés sur les molécules du CMH (non restreintes) est aussi bien présenté aux lymphocytes T CD4 que lorsque que ces mêmes liposomes sont opsonisés. En revanche, seul le FcR permet la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD8.

L'expression de plusieurs combinaisons de récepteurs confère, aux diverses populations de DC, des propriétés différentes de reconnaissance de certains types d'antigènes. Il est encore important de déterminer, *ex vivo*, le potentiel des populations de DC à capturer des formes variées d'antigènes, reconnus par divers récepteurs et en présence de divers stimuli inflammatoires, et d'analyser leur capacité à présenter ces antigènes aux lymphocytes T et à induire une réponse immune.

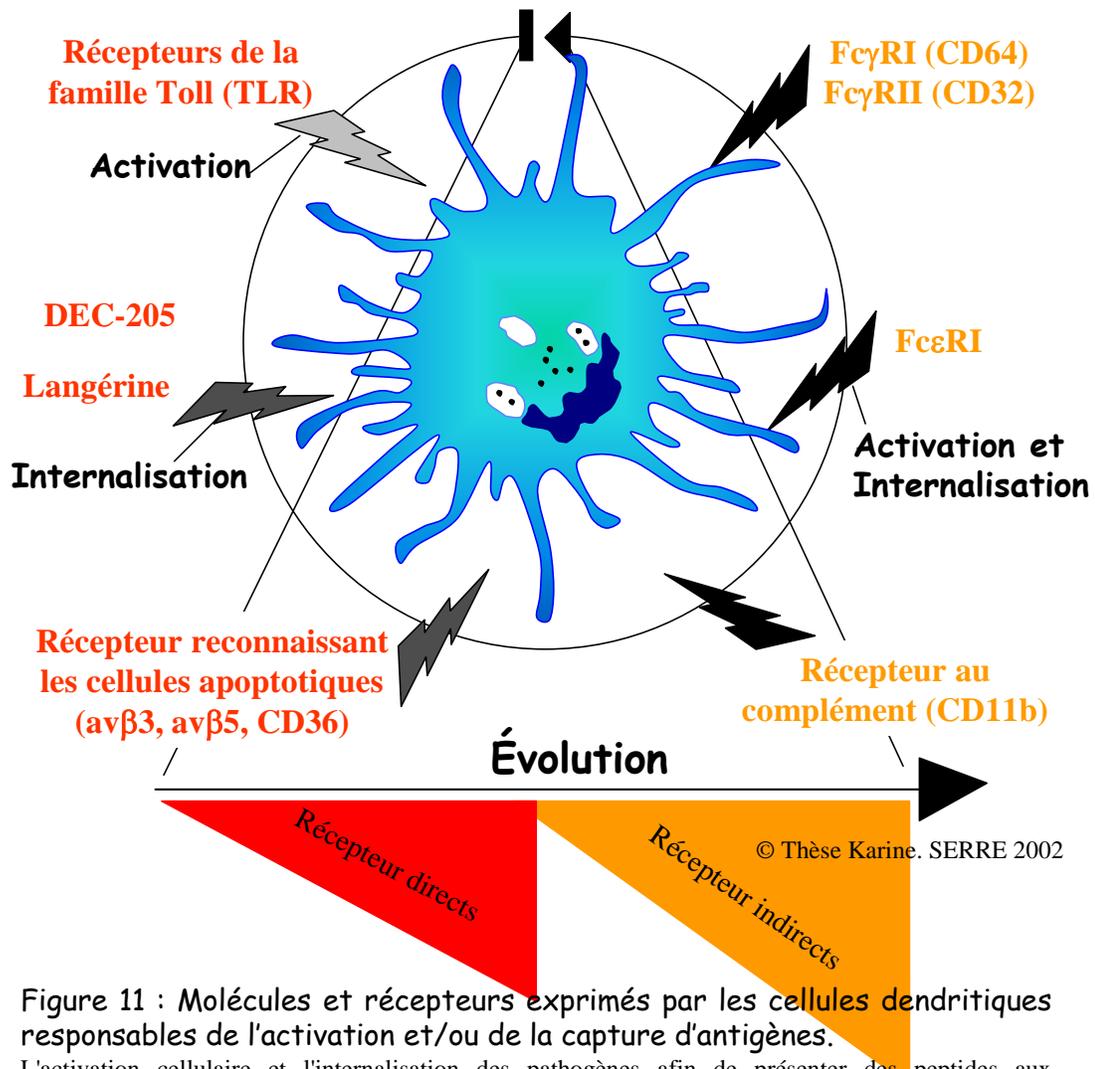


Figure 11 : Molécules et récepteurs exprimés par les cellules dendritiques responsables de l'activation et/ou de la capture d'antigènes.

L'activation cellulaire et l'internalisation des pathogènes afin de présenter des peptides aux lymphocytes T, pourraient être deux fonctions séparées qui se sont associées au cours de l'évolution. Les premiers récepteurs apparus dans l'évolution (les TLR) ne nécessitent pas la capture des pathogènes. Les fonctions qui sont couplées à ces récepteurs sont des fonctions effectrices comme la sécrétion de peptides bactéricides par exemple, qui a évolué vers la production de cytokines (entre autres). L'évolution du système immunitaire a permis l'apparition de lymphocytes ayant une reconnaissance de plus en plus spécifique des agents infectieux. La nécessité de stimuler ces lymphocytes a généré de nouvelles fonctions, comme l'internalisation des pathogènes dans le but d'en présenter des peptides, en association avec les molécules du CMH. Dans ce schéma, les FcR sont présentés comme des récepteurs qui seraient apparus plus tard dans l'évolution, capables de fixer et d'internaliser les complexes immuns tout en activant les DC. Si les FcR ne fixent que les immunoglobulines, on peut penser qu'ils sont apparus après ces dernières. S'ils sont, en revanche, capables de fixer la protéine C réactive, alors leur fonction pourrait être plus ancienne. Néanmoins, il existe actuellement une controverse sur le rôle des FcR dans la reconnaissance de cette protéine.

Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

5)- La maturation des cellules dendritiques

L'efficacité des DC, lors de l'initiation des réponses immunes, peut s'expliquer par l'existence de deux phases régulées de leur état d'activation : c'est la maturation. Elles perdent certaines fonctions au profit de nouvelles, dans un ordre séquentiel et irréversible, qui leur permet d'avoir deux états ségrégués, dans le temps et dans l'espace, où leurs fonctions sont différentes. Tout d'abord en périphérie, au stade immature, elles jouent leur rôle de sentinelle. Un signal de "danger" (Matzinger, 1994; Matzinger, 1998) initie leur activation, qui se traduit par l'attraction de précurseurs ou de DC immatures sur le site d'infection, par l'augmentation transitoire des capacités de capture antigénique, par des changements d'expression des récepteurs aux chimiokines orchestrant la migration vers les organes lymphoïdes.

Puis, dans les organes lymphoïdes secondaires, au stade mature, elles possèdent la propriété de présenter efficacement les antigènes aux lymphocytes T. Elles ont augmenté leurs molécules du CMH et de costimulation. Durant cette seconde phase, elles dirigent les interactions entre les lymphocytes T et les lymphocytes B, permettant l'établissement de la réponse immune.

Ces changements fonctionnels se corrélaient étroitement avec des modifications morphologiques et phénotypiques (Figure 12).

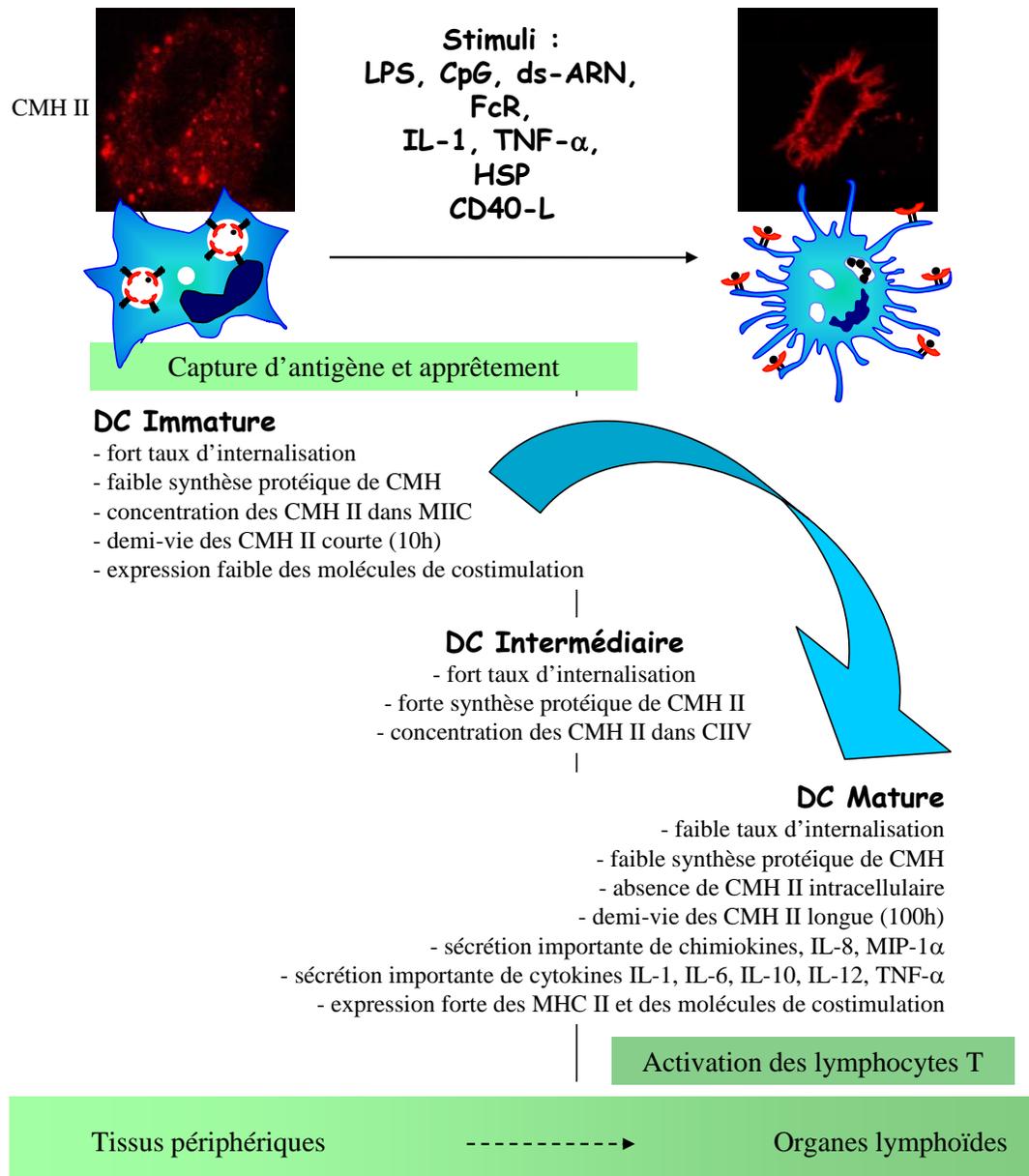


Figure 12 : Programme de maturation et de présentation antigénique des cellules dendritiques.

Représentation schématique des fonctions perdues et acquises lors de la maturation des DC. Les photos représentent la localisation des molécules de classe II révélées grâce à des anticorps spécifiques des molécules de classe II couplés au Texas Red.

CMH II : molécules de classe II du CMH

Adapté de Watts, C. et Amigorena, S., Traffic. 2000, 1: 312-317

Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

5.1)- Les changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels

Lorsqu'elles sont activées par un agent infectieux, les DC augmentent transitoirement la capture d'antigènes. Elles diminuent aussi transitoirement, leurs β 2-intégrines (ICAM-1, LFA-1) afin de rester sur le site et de recruter d'autres cellules de l'immunité innée (Rescigno et al., 1999). Elles produisent alors de grandes quantités de cytokines comme l'IL-12, IFN- γ , IL-1, TNF- α , IL-6, et des chimiokines IL-8 et MIP-1 α . Puis, elles perdent leur activité d'endocytose et de manière conjointe l'expression de récepteurs responsables de la capture d'antigène. Le remodelage de l'expression, des intégrines et des récepteurs aux chimiokines, permet aux DC de migrer des tissus périphériques jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires à la rencontre des rares lymphocytes T spécifiques des antigènes. Les DC changent ensuite de morphologie. Elles réorganisent leur cytosquelette et développent de longues dendrites, ce qui augmente leur surface membranaire et ainsi leur chance d'interagir avec les lymphocytes T. Ces phénomènes aboutissent à la présentation avec des molécules de classe II qui sont alors, très fortement exprimées à la surface cellulaire. Elles ont également de profondes modifications de leur phénotype, puisqu'elles augmentent dans ce même temps l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, LFA-3) et de costimulation (CD80, CD86, CD40) nécessaires à l'amplification de l'activation des lymphocytes T. Les modifications résultant de la maturation des DC sont présentées dans la [table 3](#).

Immature

Mature

+	Molécules présentatrice d'antigène : CMH de classe I et de classe II, CD1	+++
++	Récepteurs à l'antigène : Récepteur au mannose, DEC-205, FcγR	+/-
++	<i>Activité endocytique</i>	+/-
+/-	Mobilité	++
+	Molécules d'adhésion : CD11a, b, c, CD50, CD54, CD58, DC-SIGN	+++
+	Molécules de costimulation : CD80, CD86, CD40	+++
-	Sécrétions : Interleukines : IL-1, IL-6, IL-12, TNF, IFN-α... Chimiokines : TARC...	+++
+++	Récepteurs aux chimiokines : CCR1 -> MIP1-α, RANTES, MCP-3, MIP-5 CCR2 -> MCPs CCR4 -> TARC, MDC CCR5 -> MIP-1α, MIP-1β, RANTES, CCR6 -> MIP-3α CXCR1 -> IL-8 CXCR2 -> CXCR4 -> SDF-1	-
-	CCR7 -> ELC (MIP-3β), SLC (6Ckine)	+++
+	Enzymes protéolytiques : Cystatine C (inhibiteur de la cathepsine S)	-
-	Immunoprotéasome	+

Table 3 : Description des modifications apparaissant lors de la maturation des DC.

5.2)- Induction de la maturation des cellules dendritiques par différents stimuli

L'essentiel de la physiologie des DC a pu être appréhendé à partir du moment où il a été possible de générer ces cellules à un stade immature *in vitro*. Ceci a permis l'analyse précise de l'influence de divers stimuli sur leur état de maturation. Les DC sont sensibles à leur environnement, soit directement par la présence de pathogène, soit par les informations délivrées par les cellules de l'hôte, soit enfin par leur interaction avec des lymphocytes T (Figure 13). Il faut probablement considérer le programme de maturation des DC comme une succession de stades séquentiels irréversibles où l'état terminal est la mort par apoptose (Winzler et al., 1997).

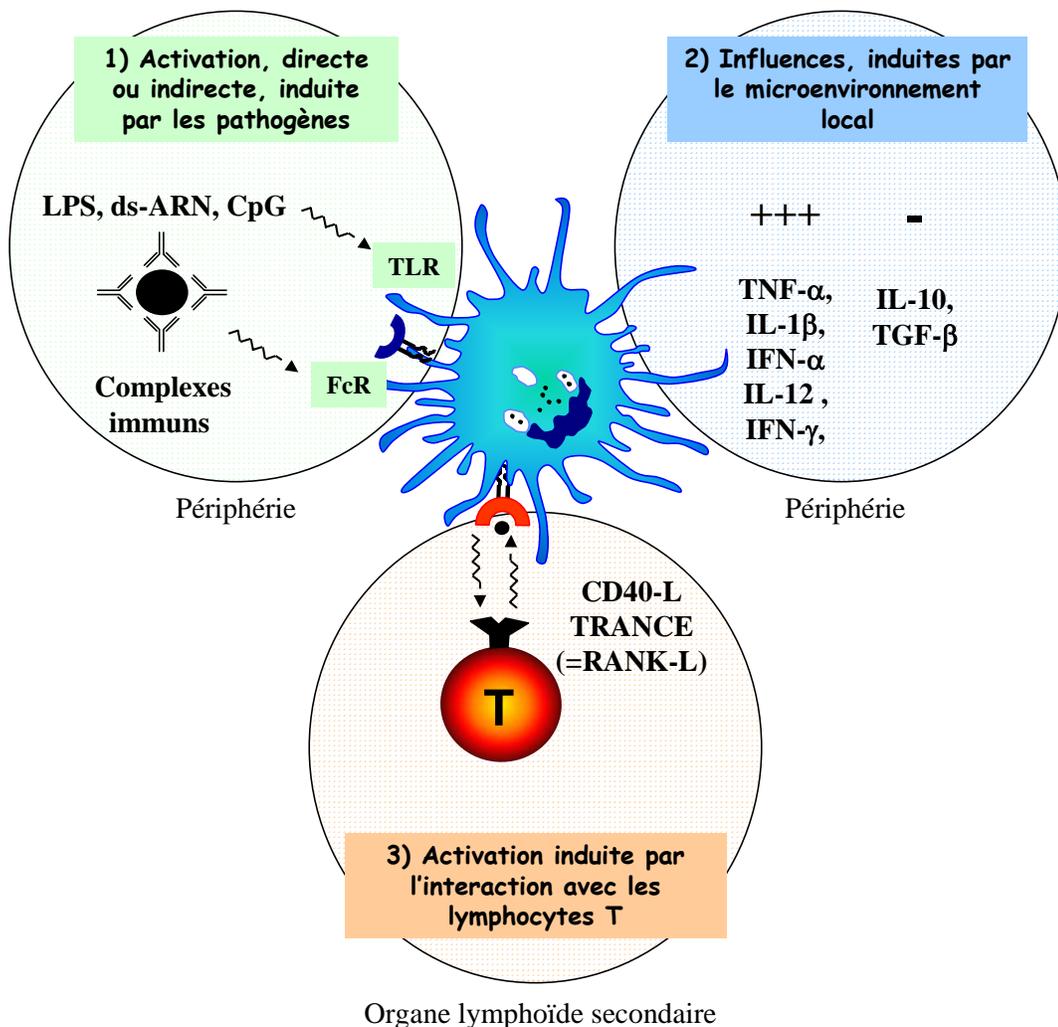


Figure 13 : Les cellules dendritiques sont sensibles à de nombreux stimuli.

Tout au long de leur vie, les DC vont rencontrer une multitude de stimuli qui vont contrôler leur état de maturation.

En périphérie, elles sont sensibles à la présence d'agents infectieux, mais elles recueillent également des informations délivrées dans le microenvironnement local par les cellules de l'hôte. C'est ensuite, lors de leur interaction avec des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes, qu'elles reçoivent les derniers signaux d'activation.

On peut penser que les DC compilent toutes ces informations afin de réguler la réponse qui se met en place.

Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

Comme nous l'avons vu précédemment les DC expriment des TLR et sont typiquement sensibles aux produits libérés par les pathogènes bactériens ou viraux (LPS, ARN double brin, ADN CpG...) (Rescigno et al., 1999). D'autres récepteurs responsables de la capture d'antigènes, sont capables d'induire l'activation des DC dès qu'ils sont engagés (FcR).

Les produits bactériens ont un effet important *in vivo*, sur les DC présentes dans les organes lymphoïdes secondaires. L'injection de LPS ou de STAg (fraction soluble de *Toxoplasma gondii*) dans le sang chez la souris, provoque en 4h, la disparition des DC (CD8 α -/CD11b+) de la zone marginale au profit de l'augmentation de celles des zones T (CD8 α + /CD11b-) de la rate (De Smedt et al., 1996; Reis e Sousa and Germain, 1999; Reis e Sousa et al., 1997) et aussi des plaques de Peyer (Iwasaki and Kelsall, 2000). Ce mouvement des DC pourrait suggérer que les DC CD8 α -/CD11b+ se différencient en CD8 α + /CD11b-. Les différentes populations représenteraient les mêmes cellules prises à différents stades d'activation s'achevant par leur apoptose. Pourtant les relations entre les DC CD8 α + et CD8 α - sont peu définies. Il semble que l'expression de CD8 α soit extrêmement stable dans le temps, et qu'elle permette de distinguer deux populations différentes et, non pas, deux stades séquentiels de maturation (De Smedt et al., 2001). Des phénomènes similaires ont également été mis en évidence au sein de la rate chez l'homme (McIlroy et al., 2001). Ce mouvement très transitoire s'accompagne de leur maturation puisque les DC stimulées par le LPS perdent leurs propriétés de capture et de présentation d'antigènes *ex vivo*, mais augmentent leur expression des molécules du CMH et de costimulation, telles de CD80 et CD86, et sécrètent de l'IL-12 (De Smedt et al., 1996). Il est difficile de discriminer un effet direct du LPS sur les DC *in vivo*, et un effet indirect via les cytokines et les médiateurs de l'inflammation qui sont induits, comme le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et le GM-CSF.

Les DC sont également très sensibles au microenvironnement local et peuvent être activées par des cytokines. Par exemple, les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 induisent *in vitro* leur maturation (Sallusto et al., 1995). Les interférons de type I peuvent également promouvoir la maturation des DC (Luft et al., 1998). En revanche, des cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10, sont capables d'inhiber les fonctions des DC (Allavena et al., 1998; Steinbrink et al., 1997). Nous avons précédemment décrit que des produits endogènes pouvaient aussi être à l'origine de la maturation des DC, comme les HSP. *In vivo*, une injection systémique de TNF- α ou d'IL-1 β induit une forte accumulation des DC dans les organes lymphoïdes (Roake et al., 1995), et une injection par voie sous cutanée provoque la migration des cellules de Langerhans vers les ganglions drainants (Cumberbatch et al., 1997b).

Une fois dans les ganglions, les DC doivent interagir avec des lymphocytes et vraisemblablement des molécules, appartenant à la famille des TNF/TNF-R, telles que CD40/CD40L, Fas/FasL, TRANCE (TNF-Related Activation-Induced Cytokine)/RANK (Receptor Activator of NF- κ B), jouent un rôle très important dans la physiologie des DC

(pour revues voir (van Kooten and Banchereau, 1997; van Kooten and Banchereau, 2000; Vogel and Noelle, 1998)). La molécule CD40 est exprimée faiblement de façon constitutive (elle peut être fortement augmentée en présence de divers stimuli) sur les DC, les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages, les précurseurs hématopoïétiques, les cellules épithéliales et endothéliales. CD40L, par contre, est majoritairement exprimé sur les lymphocytes T CD4 activés, mais aussi sur les basophiles, éosinophiles, cellules NK et sur une sous population de lymphocytes T CD8. *In vitro*, l'engagement de CD40 provoque l'augmentation des molécules du CMH et de costimulation CD80, CD86, ICAM-1, LFA-3, 4-1BBL, ainsi que des enzymes telles que des métalloprotéinases, mais aussi la sécrétion d'IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α et de MIP-1 α (Caux et al., 1994), et augmente la survie des DC (Ludewig et al., 1995). Les résultats obtenus *in vivo* suggèrent également un rôle important de CD40 pour la sécrétion d'IL-12 (Schulz et al., 2000), et aussi en termes de survie (Miga et al., 2001), ce qui a pour conséquences de maintenir l'immunité.

L'injection systémique de LPS entraîne, au bout de deux jours, la déplétion complète des DC de la rate. Néanmoins, un signal de survie peut être délivré par des lymphocytes T CD4 reconnaissant un peptide présenté par ces DC, retardant ainsi leur apoptose de quelques heures (De Smedt et al., 1998). CD40 semble être, en partie, responsable de ce signal car l'injection d'un anticorps spécifique de CD40 peut remplacer l'interaction avec des lymphocytes T CD4. Cependant, en présence de lymphocytes T CD4 l'injection d'un anticorps reconnaissant cette fois-ci CD40L, afin de bloquer CD40, n'inhibe pas la protection des DC. D'autres molécules ont pu être mises en évidence comme Fas/Fas-L (Rescigno et al., 2000), TRANCE/RANK (Anderson et al., 1997; Josien et al., 2000; Josien et al., 1999) qui activent efficacement les DC.

Enfin, LAG-3 (Lymphocyte Activated Gene-3), une protéine très proche de la molécule CD4, qui est exprimée par les lymphocytes T CD4 et CD8 activés, se fixe sur les molécules de classe II et induit, en combinaison avec CD40, la production d'IL-12 et de TNF- α par des DC dérivées des monocytes (Avicé et al., 1999). Il a également été montré que l'engagement des molécules de classe II par des anticorps provoque la sécrétion d'IL-12 par des DC murines issues de la rate (Koch et al., 1996). Il semblerait qu'outre leur rôle dans la présentation antigénique, les molécules de classe II pourraient aussi induire une cascade d'activation intracellulaire, par l'intermédiaire des PKC (Mourad et al., 1993).

L'interaction entre une DC et un lymphocyte T CD4 est donc un dialogue bidirectionnel et dynamique qui, via CD40 (entre autres) provoque l'activation des DC et leur survie, ce qui maintient et prolonge leur potentiel à stimuler les lymphocytes T et à soutenir leur différenciation en cellules effectrices.

Le couple CD40/CD40L aurait donc au moins deux fonctions : l'une qui est de protéger ces DC de la mort par apoptose et l'autre qui est d'induire l'état terminal de maturation afin qu'elles puissent accomplir leurs fonctions. En effet, l'engagement de CD40 a été montré

important pour l'acquisition, par les DC, des propriétés de stimulation des lymphocytes T CD8. Nous nous sommes intéressés aux propriétés de présentation dans le contexte des molécules de classe II et de classe I, et nous discuterons ce point dans le paragraphe 8.3). Dans le cadre de la vaccination, il est important de caractériser les mécanismes par lesquels les DC acquièrent pleinement leurs fonctions de stimulation des lymphocytes T.

6)- Les propriétés de migration des cellules dendritiques

Actuellement deux processus de migration des DC sont proposés : l'un constitutif qui permettrait le maintien de la tolérance périphérique et de l'homéostasie des lymphocytes T, et l'autre, induit (lors d'infection ?), qui permettrait la mise en place d'une réponse immune.

Pour exercer leur fonction de surveillance et de défense contre les agents pathogènes, les cellules du système immunitaire, et particulièrement les DC, doivent en permanence circuler dans l'organisme. Ce trafic est très finement contrôlé, car aux phénomènes migratoires constitutifs chez le sujet sain, s'additionne le recrutement massif de cellules mobilisées en un site donné pour faire face à une agression. La régulation de ces mouvements dépend en grande partie de la production de chimiokines et de l'expression de différents récepteurs aux chimiokines. Les migrations spontanées, qui ont lieu dans un sujet sain, permettent donc aux cellules de résider dans leur propre zone au sein des organes lymphoïdes secondaires, ainsi les participants majeurs de la réponse immune sont en place pour réagir à l'invasion d'un antigène étranger. Les lymphocytes T naïfs recirculent principalement au sein des organes lymphoïdes secondaires, mais une fois qu'ils ont été stimulés, ils quittent ces organes et migrent jusqu'au site d'infection où ils exercent leurs fonctions effectrices afin d'éliminer les pathogènes. Ainsi les lymphocytes et les DC restent compartimentalisés jusqu'à ce qu'ils aient besoin de coopérer pour initier une réponse immune. Chaque type cellulaire migrant au bon endroit et au bon moment pour exercer les fonctions de surveillance et de combat qui lui sont spécifiques. C'est la régulation conjointe de l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs qui guide les migrations des cellules dans les tissus.

Les chimiokines sont de petites molécules de moins de 100 acides aminés, qui favorisent le déplacement de diverses cellules vers leur site de production, au niveau des sites inflammatoires, ou au niveau des sites de l'établissement de la réponse immunitaire, dans les organes lymphoïdes. On distingue quatre familles, selon le nombre et l'espacement de leurs résidus cystéines dans leur région amino terminale, appelées C, CC (à 2 premières cystéines contiguës) type IL-8, CXC (où un acide aminé est intercalé entre les 2 premières cystéines), et CX3C. Les récepteurs aux chimiokines appartiennent à la famille des récepteurs ayant 7 domaines transmembranaires. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G hétérotrimériques (sensibles à la toxine de *Bordetella pertussis*). Les DC régulent finement l'expression des récepteurs aux chimiokines lors de leur programme de maturation, car leur physiologie repose en grande partie sur leur pouvoir de migration (Cyster, 1999; Dieu-Nosjean et al., 1999; Sallusto et al., 1999).

6.1)- Migration des cellules dendritiques de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires

Le recrutement des DC immatures et de leurs précurseurs, au sein des tissus enflammés, s'effectue grâce à l'expression d'une grande variété de récepteurs aux chimiokines de l'inflammation, tels que CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR2, et CXCR1. Les combinaisons de divers récepteurs aux chimiokines, peuvent contribuer grandement au recrutement sélectif de certaines populations de DC en certains sites particuliers. Par exemple, CCR6 (le récepteur à MIP-3 α) est exprimé à un fort niveau par les DC pulmonaires et par les DC dérivées *in vitro* des précurseurs CD34+ du sang de cordon, et non pas, par les DC dérivées des monocytes. Une hypothèse serait que le recrutement de DC immatures dans le foie et les poumons, se fasse grâce à la chimiokine MIP-3 α , qui est sécrétée constitutivement dans ces organes. Une autre chimiokine, MCP1, pourrait contribuer activement au processus constitutif, de migration des DC. En effet, MCP est sécrétée dans plusieurs tissus et, bien que son récepteur CCR2 ne soit pas exprimé par les DC immatures, il l'est, en revanche, fortement par les monocytes, qui peuvent se différencier en DC immatures lors de la diapédèse au travers des vaisseaux lymphatiques (Randolph et al., 1998).

Lorsqu'elles sont soumises à des stimuli inflammatoires ou à des endotoxines, les DC engagent un processus de maturation permettant leur migration jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires les plus proches. Durant cette maturation, elles perdent l'expression des récepteurs aux chimiokines de l'inflammation (CCR6) au profit des récepteurs aux chimiokines lymphoïdes (CCR7). Ces changements d'expression permettent aux DC activées, de trouver leur chemin jusqu'aux zones T des organes lymphoïdes secondaires (Dieu et al., 1998). De plus, les DC diminuent l'expression des molécules d'adhésion telle que E-cadherine. Les cellules de Langerhans qui augmentent l'expression de CCR7 deviennent ainsi sensibles à SLC (Secondary Lymphoid organ Chemokine = 6Ckine) (Chan et al., 1999) et ELC (EBV-induced molecule-1 ligand chemokine = MIP-3 β) (Dieu et al., 1998). Le rôle de SLC dans le processus de migration des DC et des lymphocytes T a été mis en évidence avec les souris *plt*, qui portent une mutation spontanée dans SLC, entraînant un défaut d'expression de la chimiokine (Gunn et al., 1999). Le nombre de DC dans les ganglions lymphatiques de ces souris est trois fois moins important que dans les souris normales. SLC semble permettre aux DC le passage dans les zones T des ganglions lymphatiques à partir des HEV et non pas l'entrée dans la circulation lymphatique elle-même. Néanmoins, il n'est pas exclu que le défaut d'entrée des DC puisse être dû, initialement, à l'absence de lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires de ces souris. SLC est tout particulièrement responsable de l'adhérence des lymphocytes T au niveau des HEV. Bien que CCR7 puisse reconnaître deux chimiokines, ELC et SLC, il semble que, seule cette dernière, rende compte de l'entrée des lymphocytes T et des DC dans les organes lymphoïdes secondaires.

Les mécanismes permettant aux DC d'entrer dans la circulation lymphatique et de pénétrer au sein des ganglions lymphatiques, via le sinus sous capsulaire, pour rejoindre les zones T sont présentés dans la [figure 14](#). Elles doivent alors interagir rapidement avec les lymphocytes spécifiques de l'antigène qu'elles présentent. Afin d'augmenter leur probabilité de rencontre avec les lymphocytes T elles sécrètent, elles aussi, des chimiokines capables de les attirer, telles que ELC (Ngo et al., 1998), et DC-CK-1 (Dendritic Cell-derived chemokine 1) (Adema et al., 1997). D'autres chimiokines, produites par les DC, sont capables d'attirer certaines sous populations de lymphocytes T activés (mais pas naïfs) comme, RANTES, IP-10 (Interferon-inducible Protein-10) (Foti et al., 1999), TARC (Thymus and Activation-Regulated Chemokine) (Lieberman and Forster, 1999), MDC (Tang and Cyster, 1999). Ces chimiokines qui jouent probablement un rôle dans la promotion des interactions entre DC et lymphocytes, sont produites après de longues périodes de maturation des DC *in vitro*. Toutefois, le rôle de ces chimiokines capables d'attirer des lymphocytes déjà activés est encore obscur pour la compréhension des mécanismes de mise en place de la réponse immune. Cependant, ceci pourrait s'expliquer grâce aux démonstrations récentes de la nécessité, tout au moins pour les lymphocytes T CD4, de réengager plusieurs fois leur TCR, afin de se différencier en effecteurs. De plus, ce mécanisme est aussi un moyen de ne laisser entrer en division que les lymphocytes fortement spécifiques des antigènes présentés. Les DC, elles aussi activées par la rencontre avec l'antigène et les premières interactions avec lymphocytes T, en partie via CD40L, sécrètent MDC et TARC. Ces chimiokines pourraient maintenir l'interaction des DC avec des lymphocytes T et soutenir ainsi leur activation mutuelle.

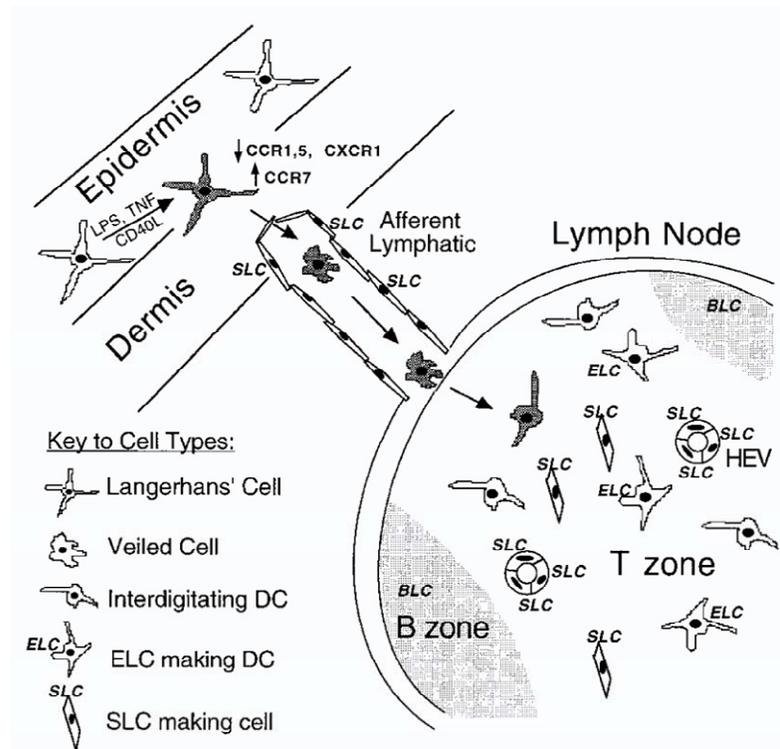


Figure 14 : Migration des cellules de Langerhans jusqu'aux zones T des ganglions.

De nombreux stimuli provoquent la diminution d'expression des récepteurs aux chimiokines de l'inflammation (CCR1, CCR5, CCR6, CXCR1) au profit de l'augmentation d'expression des récepteurs aux chimiokines sécrétées par les ganglions (CCR7).

SLC, un ligand de CCR7, est sécrété au niveau des HEV (par les cellules stromales dans le ganglion), et par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques. ELC, un autre ligand de CCR7, est produit par des DC de la zone T (et probablement aussi par des cellules stromales). Ces chimiokines semblent responsables de la migration des cellules de Langerhans de la peau jusqu'aux ganglions.

- La cellule foncée, migrant dans les vaisseaux lymphatiques afférents, représente une cellule de Langerhans quittant l'épiderme, pour devenir une cellule voilée de la lymphe, puis une DC interdigitée des zones T des ganglions.

- Les zones légèrement grisées représentent les follicules B où BLC est produit.

- De nombreuses cellules ne sont pas représentées sur ce schéma, telles que les DC dérivées des monocytes.

- Outre les chimiokines citées, d'autres paramètres influencent l'interaction entre les DC et les lymphocytes T, comme la matrice cellulaire, les fibres réticulaires ou les molécules d'adhésion.

SLC : Secondary Lymphoid organ Chemokine = 6CKine, ELC : EBV-induced molecule-1 ligand chemokine = MIP-3 β , BLC : B Lymphocyte Chemoattractant

Adapté de Cyster. J., J. Exp. Med. 1999, 189: 447-450 Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

6.2)- Circulation moléculaire de la peau vers les ganglions cutanés via la lymphe afférente

Il m'est apparu important de discuter les phénomènes rendant comptes de la circulation de molécules solubles (chimiokines, antigènes) dans les ganglions lymphatiques. Stephen Shaw a réalisé beaucoup d'études sur l'architecture des ganglions et sur la circulation de la lymphe (Gretz et al., 1997; Gretz et al., 1996; Gretz et al., 2000).

Les ganglions sont des structures très compartimentées que les molécules solubles ne traversent pas librement. Ceci signifie que les molécules solubles arrivant par les vaisseaux lymphatiques afférents n'ont pas accès à la zone T ou aux HEV de manière anarchique mais que leur distribution est très contrôlée. Il existe un système de circulation qui est régulé par l'infrastructure réticulaire à l'intérieur des ganglions. En effet, des fibres de collagène, se ramifient de façon très serrée, à partir du sinus sous capsulaire, au travers des zones T, jusqu'aux HEV. Ces fibres réticulaires sont formées de fibroblastes qui créent un conduit, réalisant un espace extracellulaire imperméable, séparé des lymphocytes T du cortex. Cette infrastructure réticulaire agit comme un conduit permettant aux molécules solubles de traverser le ganglion mais, a aussi un rôle de protection des lymphocytes vis-à-vis du milieu extérieur. Ces conduits pourraient, par exemple, expliquer comment les cellules endothéliales des HEV présentent des chimiokines à leur surface, permettant le recrutement des lymphocytes T de la circulation sanguine dans le ganglion, alors qu'elles ne les produisent pas. Les chimiokines ne sont pas nécessairement produites dans le ganglion, elles peuvent être synthétisées au site d'inflammation (comme MIP-1 β , IL-8), puis être acheminées par la lymphe afférente et se concentrer ensuite au niveau des HEV. Il semblerait donc que les HEV représentent un moyen de communication entre le tissu périphérique et les lymphocytes T circulants. Ainsi lorsque les vaisseaux lymphatiques afférents sont ligaturés ceci provoque une régression des HEV, une perte d'expression de la L-sélectine et une forte diminution des lymphocytes T colonisant le ganglion, soulignant l'importance du trafic moléculaire au sein des ganglions.

Stephen Shaw a démontré que le devenir, au niveau du ganglion, de molécules fluorescentes injectées par voie sous cutanée, était dépendant de leur poids moléculaire et de leur taille (Gretz et al., 2000). Les molécules solubles, injectées dans les coussinets plantaires, entrent dans les vaisseaux lymphatiques afférents et se déversent dans le sinus sous capsulaire. Les grosses molécules (supérieures à 10 nm) rejoignent la lymphe efférente via le sinus sous capsulaire et la medulla tandis que les petites molécules (inférieures à 10 nm) entrent dans les fibres réticulaires pour être délivrées dans les HEV (Figure 15). Néanmoins, cette ségrégation, dépendante de la taille des molécules, se visualise essentiellement trente minutes après injection puisque après 4h, même les grosses molécules sont retrouvées dans les zones T. L'hypothèse est que les protéines de haut poids moléculaires (ou les liposomes) s'accumulent dans le sinus sous capsulaire où elles sont capturées par des macrophages ou des DC, qui peuvent ensuite transporter l'information par leur redistribution au sein des zones T.

De même que, l'injection de LPS dans le sang, provoque la relocalisation des DC des zones marginales vers les zones T, on peut imaginer que la capture d'un antigène par les DC, des zones marginales de la rate (ou des sinus sous capsulaire des ganglions ?), peut induire l'activation de ces DC et provoquer leur redistribution.

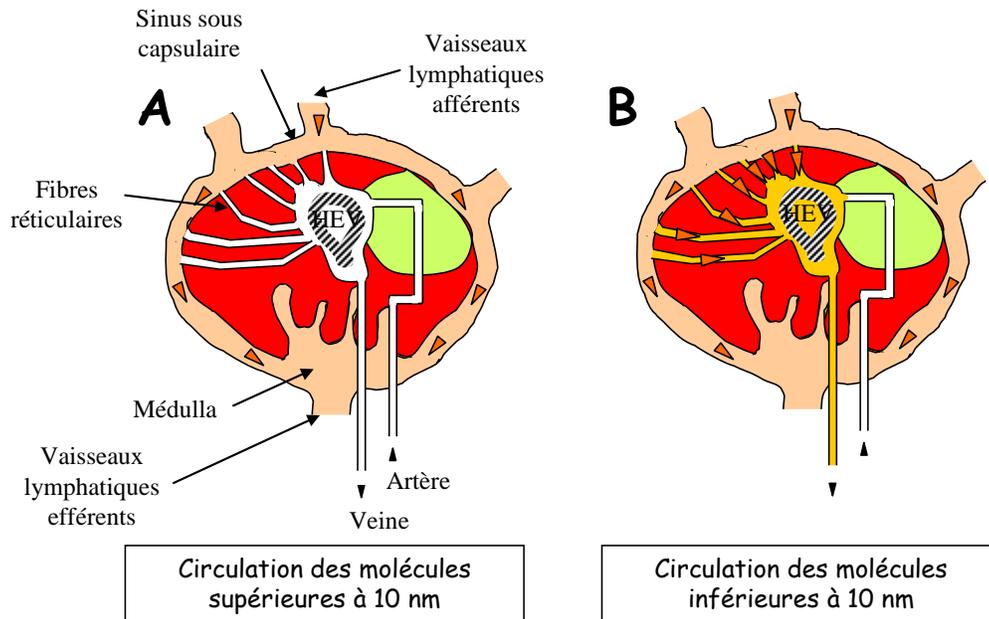


Figure 15 : Circulation des molécules dans le ganglion lymphatique en fonction de leur poids moléculaire et de leur taille.

La circulation des molécules au sein des ganglions est un processus extrêmement régulé. Les molécules injectées par voie sous cutanée parviennent, grâce à la lymphe, au sinus sous capsulaire en quelques minutes. Leur devenir dépend, ensuite, de leur poids moléculaire et de leur taille.

A) Les grosses molécules circulent dans le sinus sous capsulaire, d'où elles gagnent la médulla, pour atteindre la lymphe efférente. Ainsi les grosses molécules ne traversent jamais le cortex sous forme soluble. Il semblerait néanmoins, qu'après plusieurs heures, elles puissent atteindre la zone T. Elles sont, dans ce cas, transportées par des cellules capables de capturer ces molécules et de migrer à la rencontre des lymphocytes T. La migration à l'intérieur même du ganglion se fait le long des fibres réticulaires. Le devenir des liposomes, de 200 nm de diamètre, doit être le même que celui décrit ci-dessus.

B) Les petites molécules, quant à elles, vont avoir deux possibilités. Soit, comme les grosses molécules, suivre la voie externe dans le ganglion pour atteindre la médulla et la lymphe efférente. Soit traverser le cortex des ganglions, grâce aux fibres réticulaires constituées de fibroblastes formant un manchon et un espace extraganglionnaire imperméable, pour rejoindre les HEV.

Adapté de Gretz, E. et al., J. Exp. Med. 2000, 192: 1425-1439 Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

7)- Les propriétés de présentation antigénique dans le contexte des molécules du CMH par les cellules dendritiques

Nous nous sommes essentiellement intéressés à la présentation d'antigènes protéiques. Nous ne discuterons pas ici des capacités des DC à exprimer des molécules CD1, qui sont des molécules proches des molécules de classe I qui lie la β 2-microglobuline et qui jouent un rôle dans la présentation d'antigènes non peptidiques.

7.1)- Présentation d'antigènes exogènes par les molécules de classe II du CMH

Nous détaillerons, tout d'abord, la structure et le trafic intracellulaire normal des molécules de classe II dans les DC immatures. Puis, seront décrits les processus de régulation mis en évidence dans les DC lors de la maturation, afin de comprendre comment, les peptides dérivés des antigènes exogènes s'associent avec ces molécules avant d'être exportés en surface, afin de stimuler des lymphocytes T CD4.

7.1.1)- Structure et trafic intracellulaire des molécules de classe II

Les molécules de classe II H-2-IE et H-2-IA chez la souris, HLA-DR, HLA-DQ... chez l'homme, sont exprimées de façon constitutive sur les cellules présentatrices d'antigènes (DC, lymphocytes B, macrophages). Elles peuvent être induites par l'IFN- γ et l'IL-4 sur de nombreux types cellulaires tels que les cellules épithéliales, thyroïdiennes ou sur les lymphocytes T humains activés.

Les molécules de classe II appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ce sont des glycoprotéines membranaires constituées de deux chaînes, s'associant de façon non covalente, pour former des dimères : la chaîne α de 33kDa et la chaîne β de 28kDa ([Figure 16](#)). Chacune est composée, de deux domaines extracellulaires (α 1 et α 2, β 1 et β 2), d'un domaine transmembranaire, et d'une région intracytoplasmique très courte d'une quinzaine d'acides aminés. Des données cristallographiques ont démontré que les domaines extracellulaires α 1 et β 1 s'associent pour former une niche, ouverte à ses extrémités, dans laquelle peut se fixer un peptide de 10 à 20 acides aminés. Cette niche est formée de huit feuillets antiparallèles et de deux hélices α , chaque domaine α 1 et β 1 apportant quatre feuillets β et une hélice α . La spécificité de fixation entre les peptides et les molécules de classe II est dictée par des interactions entre la niche et les résidus d'ancrage des peptides. Les résidus les plus polymorphes sont localisés dans le sillon et sur les bords de la niche ordonnant ainsi, la fixation d'une seule famille de peptides.

Les molécules de classe II sont synthétisées dans le cytoplasme puis, assemblées dans le réticulum endoplasmique, et ensuite exportées vers la surface cellulaire. Le trafic intracellulaire des molécules de classe II est directement corrélé à leur fonction. En effet, pour

que des peptides, résultant de la dégradation protéolytique d'un antigène, puissent s'associer aux molécules de classe II, il faut d'une part, que les voies de transport de ces molécules croisent les compartiments d'endocytose et d'autre part que les molécules, H-2M et H-2O, interviennent pour permettre la régulation du chargement en peptides (Figure 17). Les chaînes α et β des molécules de classe II en cours de synthèse, sont adressées au réticulum endoplasmique où, grâce à des protéines chaperonnes, la calnexine et BiP (Immunoglobuline heavy chain Binding Protein), elles s'associent à la chaîne invariante (Ii) formant des complexes $(\alpha\beta)Ii$. C'est ensuite la trimérisation de ces complexes qui permet l'adressage de ces nonamères $(\alpha\beta)_3Ii_3$ vers les premiers compartiments de la voie d'endocytose, les endosomes précoces.

La chaîne invariante est une glycoprotéine membranaire de type II qui assure le transport intracellulaire des molécules de classe II. Elle s'associe de manière non covalente aux dimères $(\alpha\beta)$ et assure trois fonctions importantes. Tout d'abord, c'est une protéine chaperonne pour les molécules de classe II. Ensuite, elle protège le sillon de toute association de peptides endogènes au niveau du réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi. Enfin, elle porte des motifs d'adressage, dans sa partie intracellulaire, permettant de diriger les molécules de classe II, lors de leur exportation à la surface cellulaire, vers les compartiments d'endocytose où elle est progressivement dégradée, laissant libre le sillon pour le chargement avec des peptides exogènes.

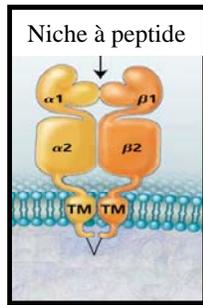


Figure 16 : Structure des molécules de classe II.

Les molécules de classe II sont composées de deux chaînes α et β . Chacune de ces chaînes est constituée de quatre domaines :

- la niche à peptide formée des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$,
- les domaines appartenant à la superfamille des immunoglobulines $\alpha 2$ et $\beta 2$,
- la région transmembranaire,
- la queue intracytoplasmique de quelques acides aminés

Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

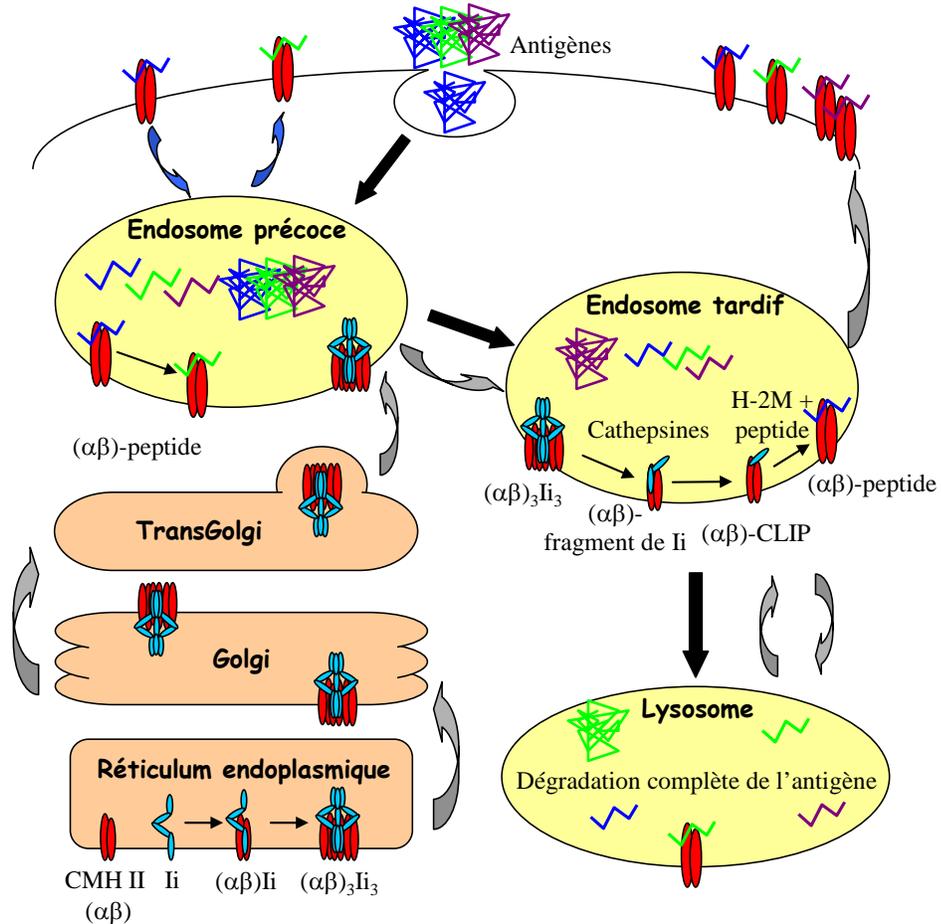


Figure 17 : Transport et chargement en peptides des molécules de classe II.

- Recyclage des classes II dans les endosomes précoces : voie de présentation alterne.
- Transport intracellulaire des classes II néosynthétisées : voie de présentation classique.
- Trajet suivi par l'antigène.

Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

7.1.2)- La voie d'endocytose et le chargement en peptides des molécules de classe II

La voie d'endocytose est composée de plusieurs compartiments vésiculaires qui diffèrent par leur acidité, leur densité, leur morphologie et leur contenu en protéines résidantes ou internalisées. Schématiquement, l'antigène internalisé est tout d'abord concentré dans les endosomes précoces qui sont situés sous la membrane plasmique. La dégradation protéolytique débute dans ces compartiments faiblement acides (pH de 6 à 6,5). Les endosomes précoces semblent avoir un rôle de dissociation et de tri des complexes récepteur/ligand, où les récepteurs sont recyclés vers la surface cellulaire et les ligands sont transportés par bourgeonnements vésiculaires vers les endosomes tardifs. Ces derniers, plus proches du noyau et plus acides (pH de 5,5 à 6), accumulent les structures internalisées qui sont ensuite entraînées vers le dernier compartiment : les lysosomes. Situés autour du noyau, ils sont caractérisés par un pH très acide (pH de 4,5 à 5,5), une opacité en microscopie électronique et par la présence de nombreuses enzymes protéolytiques.

Un transport vésiculaire, dirigé par les petites protéines G Rab, permet un échange abondant de matériel entre ces différents compartiments. Durant leur transport, des compartiments précoces vers les compartiments tardifs, les antigènes rencontrent un gradient croissant de protéases, et un gradient décroissant de pH. Diverses endopeptidases sont impliquées dans la dégradation séquentielle des antigènes, des cystéines-protéases telles que les cathepsines L, S, B et des aspartates protéases telles que les cathepsines D et H. De plus, l'acidification progressive de ces compartiments est nécessaire pour l'activation des enzymes protéolytiques telles que les hydrolases acides et les cystéines-protéases. Les régions les plus accessibles seront donc rapidement dégradées dans les endosomes précoces. Les régions plus internes dans la structure de la protéine nécessiteront, en revanche, un processus de dégradation plus intense.

C'est la dégradation simultanée des antigènes exogènes et de la chaîne invariante dans ces compartiments qui permet aux peptides antigéniques, produits grâce à l'action séquentielle de diverses endopeptidases et exopeptidases, de s'associer aux molécules de classe II s'ils répondent aux contraintes structurales ordonnées par la niche à peptide. Il est à noter que les molécules de classe II sont très résistantes à la protéolyse. La chaîne invariante est dégradée de façon séquentielle par diverses protéases. La dernière étape de dégradation, sous l'action des cathepsines S ou L, conduit à la formation d'un complexe (classeII/CLIP), formé des dimères $\alpha\beta$ de classe II et d'un peptide issu de la dégradation de la chaîne invariante, CLIP (pour : MHC class-II associated invariant chain peptide). Les échanges, entre le peptide CLIP et un peptide issu de la dégradation des antigènes exogènes, sont régulés par H-2M et H-2O (HLA-DM et HLA-DO chez l'homme) (Busch et al., 2000). H-2M est une molécule capable de s'associer aux complexes classe II/CLIP ou classe II/peptide de faible affinité. Une fois ces peptides libérés, H-2M stabilise les molécules de classe II vides, les protège d'une dégradation éventuelle, et catalyse leur association avec un peptide de forte affinité. H-2O régulerait la

fonction de H-2M. Pour que les molécules de classe II puissent présenter un répertoire peptidique, le plus large possible, dérivé de la dégradation superficielle mais aussi profonde, il faut qu'elles aient accès aux divers compartiments d'endocytose, des plus précoces aux plus tardifs.

Cependant, deux compartiments dédiés à la présentation antigénique, riches en molécules de classe II et en H-2M, mais distincts des endosomes précoces et des lysosomes, ont été mis en évidence : tout d'abord, des structures multivésiculaires semblant être apparentées aux endosomes tardifs, les MIIC (pour : MHC class II enriched compartments) où la chaîne invariante est dégradée et les molécules de classe II chargées en peptides; et, ensuite, un compartiment plus apparenté aux endosomes précoces, les CIIV (pour : Class II containing Vesicles). L'équipe de Hans Geuze a proposé un modèle, définissant les différents compartiments impliqués dans le chargement en peptides comme étant des compartiments classiques de la voie d'endocytose (Geuze, 1998) (Figure 18). D'après ce modèle, les molécules de classe II seraient adressées dans les MIIC où la chaîne invariante commencerait à y être dégradée. Les molécules de classe II seraient ensuite transportées de plus en plus profondément dans la voie d'endocytose, jusqu'à ce qu'elles s'associent avec un peptide de forte affinité.

Le transport des complexes classe II/peptide de ces compartiments à la surface cellulaire est encore mal connu. Cependant, deux hypothèses sont proposées. La première, suggère que les molécules de classe II transiteraient dans les MIIC puis dans les CIIV en direction de la surface. La seconde, propose une fusion directe des compartiments de chargement en peptides avec la membrane plasmique. Cette fusion entraînerait par la même occasion l'exocytose de vésicules riches en molécules de classe II dans le milieu extracellulaire. Ces vésicules, appelées exosomes, ont été décrites initialement dans les cellules B (Raposo et al., 1996) puis dans les DC (Thery et al., 1999) et pourraient jouer un rôle dans la génération de la réponse immune (Zitvogel et al., 1998). De plus, la fusion des compartiments de chargement en peptides avec la membrane plasmique aurait une autre conséquence importante sur la façon dont les molécules de classe II sont agencées à la surface cellulaire, provoquant probablement leur concentration dans des microdomaines.

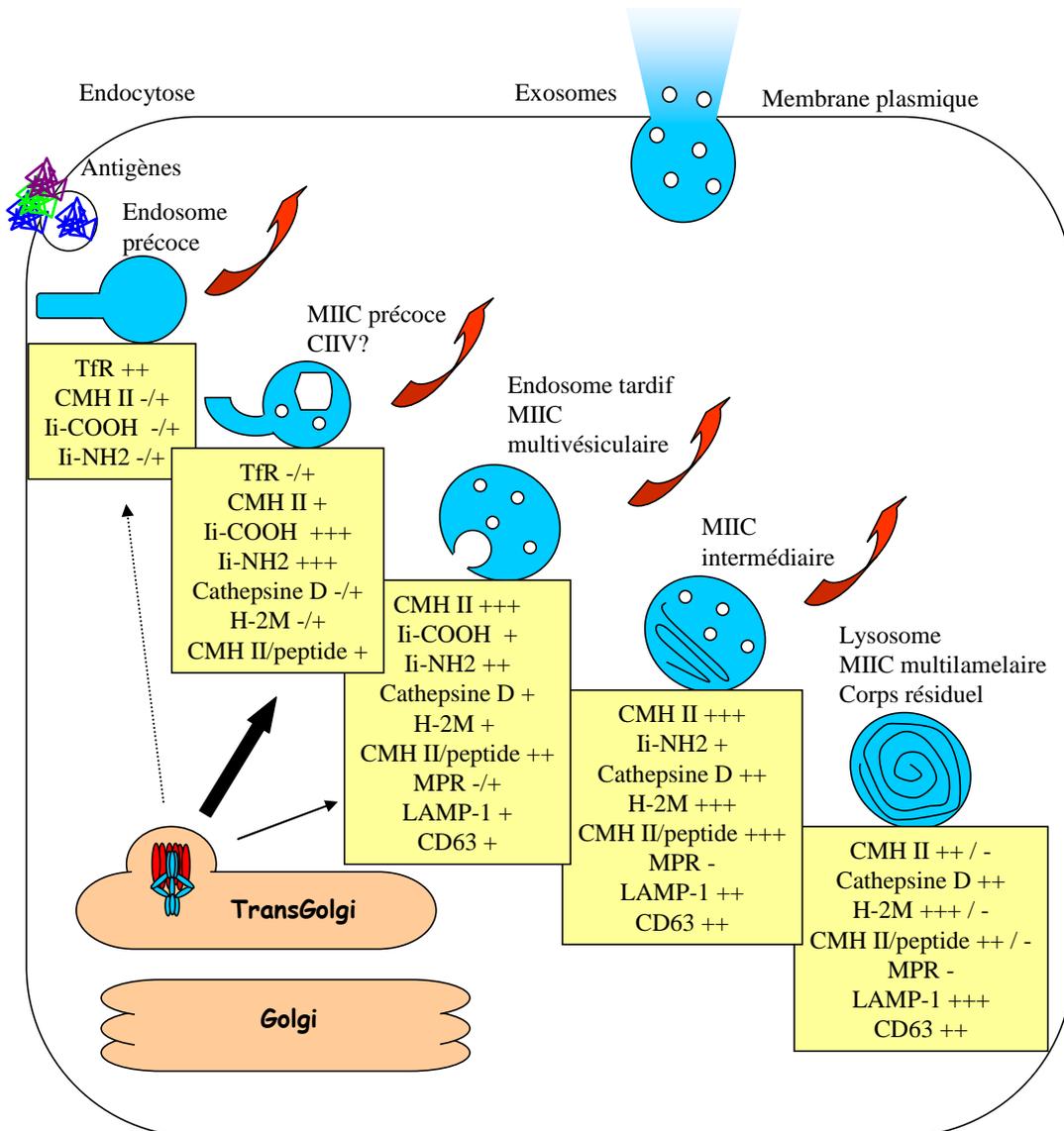


Figure 18 : Transport des molécules de classe II dans les différents compartiments de la voie d'endocytose.

Chaque compartiment est caractérisé par sa morphologie et par la présence (+++) ou l'absence (-) de certains marqueurs.

TfR : récepteur à la transférine, MPR : récepteur au mannose 6-phosphate, LAMP-1 : lysosomal associated membrane protein, CD63 : marqueur du lysosome, CMH II : molécules de classe II du CMH, CMH II/peptide : complexe molécule de classe II et peptide, Ii-COOH et Ii-NH2 : sont les formes de dégradation de la chaîne invariante où Ii-NH2 représente le peptide CLIP

Adapté de Geuze, H., Immunology Today. 1998, 19: 282-287 Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

7.1.3)- Les voies de présentation de l'antigène par les molécules de classe II dans les cellules dendritiques

Trois voies de présentation antigénique dans le contexte des molécules de classe II ont été décrites dans les DC (Davoust and Banchereau, 2000). La première, dite classique (**Figure 19A**), suit les différentes étapes décrites précédemment. Cette voie nécessite des molécules de classe II nouvellement synthétisées, et est dépendante de la chaîne invariante et de H-2M. La seconde voie de présentation dite alterne (**Figure 19B**) est indépendante de la chaîne invariante et de H-2M et ne nécessite pas les molécules de classe II nouvellement synthétisées. Elle requiert le recyclage des molécules de classe II de la membrane plasmique vers les compartiments de la voie d'endocytose précoces où s'effectue un échange de peptide avant réexpression en surface. Les peptides qui sont accessibles à ces molécules de classe II recyclées sont donc dérivés de domaines externes des antigènes qui sont libérés après une faible activité protéolytique. La troisième voie de présentation est la possibilité de chargement en peptide directement à la membrane plasmique (**Figure 19C**). En effet, les DC immatures expriment à leur surface des molécules de classe II vides et H-2M (Arndt et al., 2000). Des protéases extracellulaires peuvent dégrader des antigènes externes, générant ainsi des peptides pouvant être chargés sur les molécules de classe II vides directement à la surface cellulaire des DC (Santambrogio et al., 1999). Néanmoins, il semblerait que la voie la plus efficace dans le cadre de l'activation des lymphocytes T soit la voie classique.

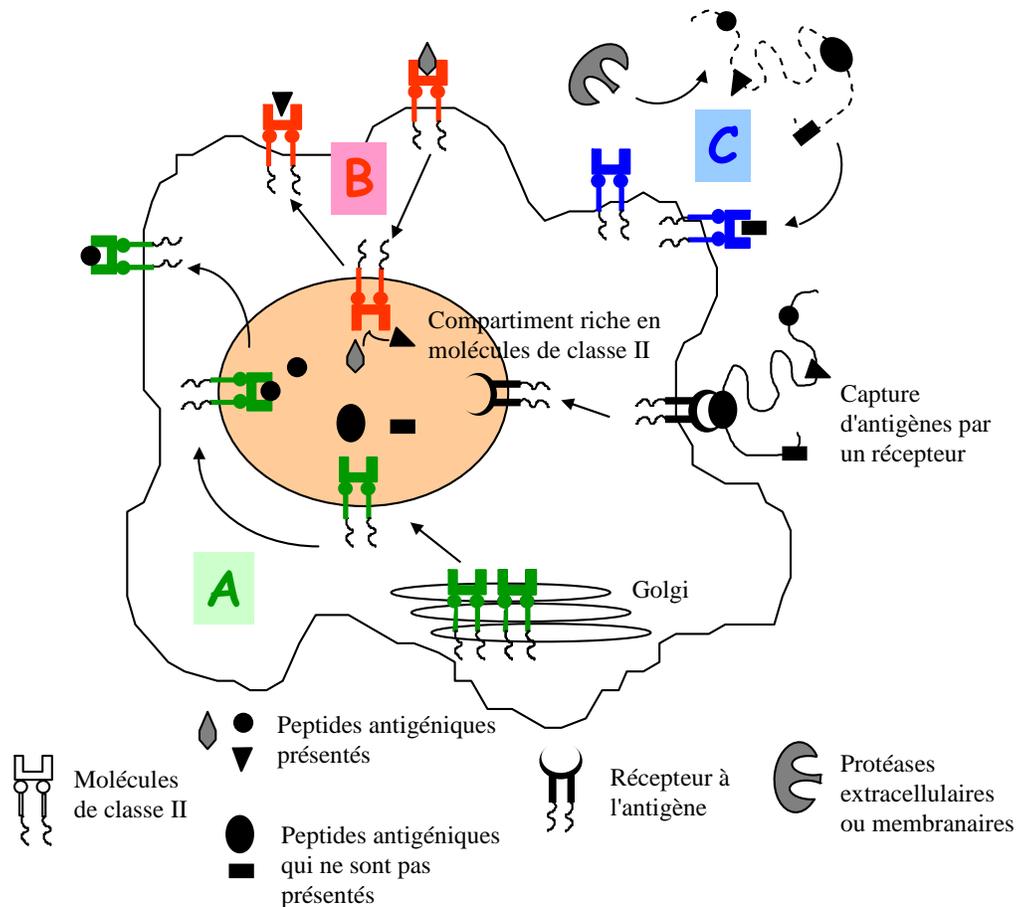


Figure 19 : Trois voies de chargement en peptides des molécules de classe II dans les cellules dendritiques.

A, B, L'antigène est capturé et internalisé par un récepteur, puis concentré dans un compartiment riche en molécules de classe II où il est dégradé en peptides parmi lesquels, certains, seront associés avec les molécules de classe II pour être présentés à la surface.

A, Les molécules de classe II, nouvellement synthétisées, sont transportées, de leur site de synthèse (le réticulum endoplasmique), au travers de l'appareil de Golgi vers les compartiments de chargements en peptides.

B, Les molécules de classe II peuvent être recyclées, de la surface cellulaire, vers les compartiments précoces de la voie d'endocytose où s'effectue un échange de peptides puis réexpression à la membrane plasmique.

C, Des protéases extracellulaires peuvent dégrader des antigènes externes, générant ainsi des peptides pouvant être chargés sur les molécules de classe II, directement à la surface cellulaire des DC.

Adapté de Davoust, J. et Banchereau, J., Nature cell biology. 2000, 2: 46-48
Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

7.1.4)- Régulation de la présentation antigénique lors de la maturation des cellules dendritiques

L'induction de la maturation induit de profonds changements dans le transport des molécules de classe II ainsi qu'une réorganisation drastique des compartiments endocytiques, provoquant l'augmentation des molécules de classe II à la surface (Mellman and Steinman, 2001; They and Amigorena, 2001). Elles sont exprimées à un taux, de cinq à vingt fois supérieur sur les DC matures que sur les DC immatures. Cette augmentation est due à trois phénomènes : 1) la redistribution des molécules de classe II accumulées dans les endosomes tardifs et les lysosomes (MIIC) vers les compartiments de charge en peptides exogènes (CIIV) avant leur réexpression en surface, 2) une augmentation transitoire du taux de synthèse des molécules de classe II, 3) une diminution du taux de dégradation et de recyclage de ces molécules.

Chez la souris, au stade immature, les molécules de classe II nouvellement synthétisées sont retenues dans les compartiments apparentés aux endosomes tardifs et aux lysosomes, les MIIC, et n'atteignent que très peu la surface cellulaire. D'après Ira Mellman et Philippe Pierre, dans les DC immatures, la chaîne invariante est faiblement dégradée et le fragment IiP10, contenant des motifs de rétention aux lysosomes, reste associé aux dimères de classe II accumulant ces molécules dans les MIIC. La dégradation de la chaîne invariante est en partie sous le contrôle d'une cystéine protéase, la cathepsine S, qui permet la génération du peptide CLIP à partir du fragment IiP10. L'activité de la cathepsine S est régulée par un inhibiteur de protéase, la cystatine C, dont la fonction est grandement réduite lors de la maturation des DC, ce qui permet la formation de complexes CMH/CLIP qui sont alors transportés dans les endosomes précoces, les CIIV, (Pierre and Mellman, 1998; Pierre et al., 1997). Une fois dans les CIIV, le peptide CLIP est échangé par H-2M avec un peptide exogène et les nouveaux complexes CMH/peptides sont alors exportés à la surface cellulaire.

Le trafic intracellulaire des molécules de classe II chez les DC humaines est différent, car les molécules nouvellement synthétisées et encore associées à la chaîne invariante, gagnent tout d'abord la membrane plasmique, puis sont internalisées afin que la cathepsine S dégrade Ii et permette le chargement en peptides exogènes (Cella et al., 1997). Les complexes CMH/peptides sont alors exprimés à la membrane puis recyclés et éventuellement dégradés dans les lysosomes. Lors de l'induction de la maturation des DC, le taux de synthèse et de formation des complexes, augmente transitoirement, et l'internalisation des molécules de classe II diminue, ce qui stabilise les complexes CMH/peptides en surface.

La formation de ces complexes a pu être plus finement étudiée grâce à des anticorps spécifiques des molécules IA^k associées au peptide dominant (46-61) issu de la dégradation du HEL (Hen Egg Lysozyme). Ainsi, il a été montré que les DC pouvaient internaliser du HEL soluble dans les endosomes tardifs et les lysosomes, jusqu'à ce qu'elles reçoivent un signal de maturation (LPS, TNF- α , CD40) qui initie la formation des complexes CMH/46-61

(Inaba et al., 2000). Des compartiments faiblement acides de rétention en antigènes ont été mis en évidence (Lutz et al., 1997).

La demi-vie des molécules de classe II, en surface dans les DC immatures, est environ de 10h, alors que dans les DC matures elle est environ de 100h (Cella et al., 1997; Rescigno et al., 1998). Enfin, les complexes CMH/peptides s'accumulent dans des vésicules spécialisées, avec des molécules de costimulation comme CD86, avant d'être exportés à la surface. Ces vésicules semblent fusionner avec la membrane plasmique retenant de façon juxtaposée les complexes CMH/peptides avec les molécules de costimulation (Turley et al., 2000). Cette réexpression, regroupant en microdomaines particuliers le signal 1 (présentation antigénique) et le signal 2 (costimulation), pourrait expliquer l'efficacité des DC pour stimuler des lymphocytes T CD4 naïfs.

7.1.5)- Agencement des complexes CMH/peptides à la surface des cellules dendritiques : la synapse immunologique

La membrane plasmique est de composition et de structure variées et elle contient des microdomaines qui sont essentiels aux fonctions cellulaires. Ces microdomaines sont composés de sphingolipides (sphingomyéline et glycosphingolipide) et de cholestérol, formant une phase rigide ordonnée, dans la matrice désordonnée de la bicouche membranaire. Leur taille est estimée à 50 nm de diamètre. Leur rôle est probablement dans le recrutement et la concentration de molécules impliquées dans la transduction de signal. En effet, les protéines présentes, et leur diffusion, sont extrêmement contrôlées. La zone d'interaction entre une cellule qui présente l'antigène et un lymphocyte T est appelée "synapse immunologique" ou SMAC (supramolecular activation cluster), et constitue un des ces microdomaines particulier (Figure 20).

Ces structures ont été principalement étudiées sur les lymphocytes T. L'activation optimale de ces cellules a été corrélée au recrutement du TCR avec CD4 ou CD8, CD2, et des molécules de costimulation (CD28), qui s'accompagne d'une concentration des composants cytoplasmiques de la cascade de signalisation intracellulaire (comme Lck, Fyn, ZAP-70, MEK2), au centre des microdomaines. Autour de cette structure, se trouvent des molécules d'adhésion comme LFA-1 et ICAM-1 puis, dans une zone plus périphérique encore, se trouve une phosphatase (CD45) (Lanzavecchia and Sallusto, 2001a; Xavier et al., 1998).

La zone d'interaction entre une APC et un lymphocyte T semble donc extrêmement compartimentalisée. Néanmoins, cette compartimentalisation des TCR, au sein de ces microdomaines, ne semble pas exister de manière constitutive. En effet, il a été montré sur des thymocytes ou des lymphocytes T du sang périphérique humain, que le recrutement des TCR dans les microdomaines, pouvait être induit par des anticorps monoclonaux dirigés contre le complexe TCR/CD3 (Montixi et al., 1998; Viola et al., 1999). De plus, des microdomaines contenant des molécules de classe II existent, sur les cellules qui présentent l'antigène, et participent à l'optimisation de la réponse des lymphocytes T (Anderson et al., 2000).

On peut donc imaginer deux modèles. Dans un premier cas, lors de l'interaction entre un lymphocyte T et une APC, où il y aurait recrutement dans des microdomaines, des TCR sur le lymphocyte T d'une part, et des complexes CMH/peptides sur l'APC, d'autre part. Dans un second cas, il y aurait une préformation des complexes CMH/peptides en microdomaines à la surface des APC, qui induirait, lors de l'interaction, la concentration des TCR dans des microdomaines à la surface du lymphocyte T. L'existence des complexes CMH/peptides dans des microdomaines, avec les molécules de costimulation (CD86), à la surface des DC, après activation, est un argument en faveur de ce second modèle (Turley et al., 2000).

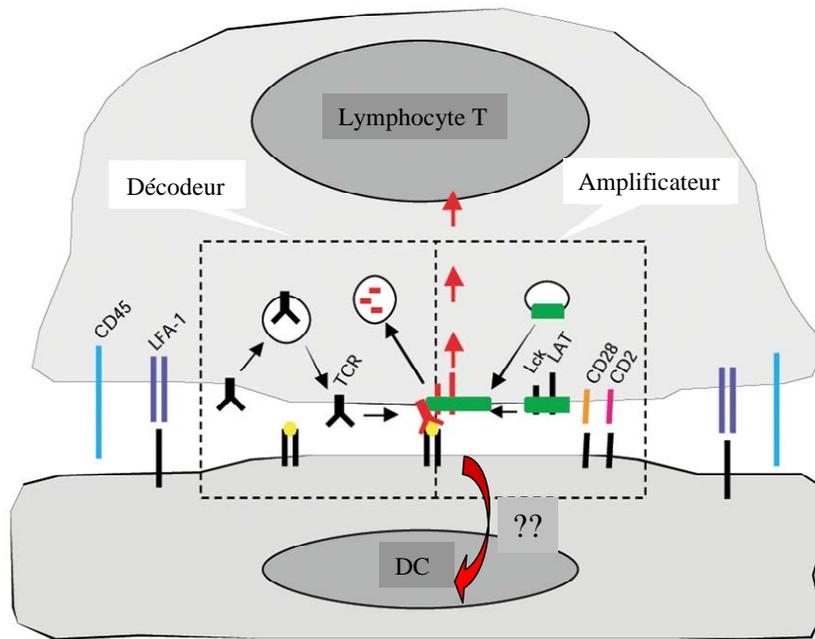


Figure 20 : La synapse immunologique.

La synapse immunologique est la zone d'interaction entre une cellule qui présente l'antigène et un lymphocyte T. C'est un microdomaine qui favorise la signalisation intracellulaire, où certaines molécules sont recrutées, concentrées, et organisées dans des structures membranaires plus rigides.

Il y a deux régions dans ces microdomaines au niveau des lymphocytes T :

- l'une centrale, contenant les complexes TCR/CD3, les molécules CD2 et CD28,
- l'autre plus périphérique, qui contient plutôt LFA-1 et la phosphatase CD45.

Les TCR (noir) sont continuellement internalisés et recyclés, jusqu'à ce qu'ils reconnaissent un complexe CMH/peptide (rouge) et soient alors concentrés dans la synapse (vert). La concentration des TCR permet le recrutement massif des molécules participant au signal intracellulaire, telles que les kinases Lck, ce qui initie la cascade d'activation.

La synapse a donc deux fonctions qui peuvent être représentées par deux modules :

- le "décodeur" qui est responsable du signal 1, de l'initiation du processus d'activation et de la maintenance de la signalisation,
- "l'amplificateur" qui est responsable du signal 2 et de l'amplitude du signal transmis.

Les mécanismes responsables de la formation de ces synapses sont encore mal connus. La concentration des TCR dans des microdomaines à la surface des lymphocytes T est-elle induite par l'agencement des complexes CMH/peptides des cellules présentatrices d'antigènes ? Ces dernières ont-elles les complexes CMH/peptides prélocalisés dans des microdomaines ?

Adapté de Lanzavecchia, A., et Sallusto, F., Nature Immunology. 2001, 2: 487-492
Copyright © 2010 Dr Karine SERRE

7.2)- Présentation d'antigènes par les molécules de classe I du CMH

La stimulation de lymphocytes T CD8 requiert la reconnaissance par le TCR, de l'antigène sous forme peptidique, en association avec les molécules du CMH de classe I. Cette présentation, a longtemps été associée aux antigènes endogènes, tumoraux ou viraux, exprimés par des cellules tumorales ou infectées. Néanmoins, il a ensuite été mis en évidence que les lymphocytes T CD8 ne sont pas stimulés directement par ces cellules mais, qu'ils le sont par des cellules spécialisées dans la présentation antigénique.

En effet, les cellules tumorales ne peuvent stimuler, elles mêmes, les lymphocytes T CD8 naïfs. Tout d'abord, même si les cellules tumorales expriment des molécules de classe I, elles ne possèdent pas les molécules adéquates pour l'activation des lymphocytes T, comme les molécules de classe II ou les molécules de costimulation, CD80 et CD86. Ensuite, elles se localisent souvent en périphérie, alors que les lymphocytes T CD8 naïfs, eux, sont concentrés dans les organes lymphoïdes secondaires. Il en est exactement de même en ce qui concerne les pathogènes intracellulaires, localisés en périphérie et qui n'infectent pas les cellules présentatrices d'antigènes. Il faut donc imaginer, qu'une autre cellule, est capable de capturer ces cellules (tumorales ou infectées) ou des produits de celles-ci, de migrer aux sites d'initiation de la réponse immune pour en "re-présenter" les antigènes majeurs qui permettront aux lymphocytes T CD8 de les reconnaître et d'éliminer ces cellules (Heath and Carbone, 1999).

Les cellules tumorales ou infectées, sont prises en charge par des cellules de l'hôte qui "re-présentent" les antigènes, anormaux ou viraux. Ces derniers deviennent alors, des antigènes exogènes, présentés dans le contexte des molécules de classe II et de classe I, pour activer des lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs. Ce phénomène, appelé présentation croisée ou "cross-presentation", est majoritairement réalisé par les DC (Heath and Carbone, 2001). La compréhension des mécanismes qui permettent aux DC de présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8 est très important dans le cadre du développement de vaccins contre des pathogènes intracellulaires, ou d'immunothérapies efficaces contre le cancer.

Nous détaillerons la structure et le trafic intracellulaire normal des molécules de classe I. Puis, nous décrirons les processus de régulation, mis en évidence dans les DC lors de la maturation afin de comprendre, comment, les peptides dérivés des antigènes exogènes, s'associent avec ces molécules avant d'être exportés en surface, afin de stimuler des lymphocytes T CD8.

7.2.1)- Structure et trafic intracellulaire des molécules de classe I

Les molécules de classe I sont exprimées de manière constitutive par la plupart des cellules de l'organisme. Elles appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ce sont des glycoprotéines membranaires, constituées de deux chaînes, s'associant de façon non covalente, pour former des dimères : la chaîne α de 44kDa et la β 2-microglobuline de

11,5kDa (Figure 21). La chaîne α , est une protéine glycosylée qui possède trois domaines, un domaine extracellulaire formé de trois sous-domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), un domaine transmembranaire et une région intracytoplasmique courte d'une trentaine d'acides aminés. La $\beta 2$ -microglobuline est une protéine non-glycosylée, soluble, très similaire au domaine $\alpha 3$, associée à la chaîne α . Des données cristallographiques ont montré que les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, sont structurellement très proches et symétriques. Les feuillets β des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ s'associent, par liaisons hydrogènes, pour former un unique feuillet β à huit brins, recouvert par des domaines hélicoïdaux. Cette dimérisation intra-moléculaire crée un sillon (longueur = 2,5 nm; largeur = 1 nm) entre les hélices α des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Ce sillon, fermé à ses deux extrémités, est la niche à peptide des molécules de classe I, qui ne favorise l'association que de peptides courts de 8 à 10 acides aminés.

Les molécules de classe I sont synthétisées dans le cytoplasme puis assemblées dans le réticulum endoplasmique et ensuite exportées vers la surface. Malgré ce cheminement, qui semble identique à celui des molécules de classe II, les mécanismes de chargement en peptides des molécules de classe I sont très différents. En effet, les peptides sont originaires de protéines localisées, non pas dans la voie d'endocytose, mais dans le cytoplasme. Durant leur trafic, les molécules de classe II vont à la rencontre des protéines internalisées alors, qu'inversement, ce sont les peptides qui rejoignent les molécules de classe I pour l'assemblage. Les processus d'association des molécules de classe I, et leur chargement en peptide, sont très complexes. Ils nécessitent un grand nombre de molécules chaperonnes, qui participent à l'acquisition de la bonne conformation, et au chargement en peptide des molécules de classe I dans le réticulum endoplasmique (Cresswell et al., 1999; Solheim, 1999). Le rôle précis de chacune, et l'ordre exact de leur interaction, ne sont pas encore pleinement élucidés (Figure 22).

Brièvement, la chaîne α , nouvellement synthétisée, est adressée au réticulum endoplasmique. Il semblerait que la première étape soit la formation de deux ponts disulfures (l'un dans le domaine $\alpha 2$ et un autre dans le domaine $\alpha 3$), grâce à une molécule chaperonne : ERp57. Cette dernière permet ensuite l'association avec la $\beta 2$ -microglobuline. Le rôle précis de la $\beta 2$ -microglobuline est encore incertain, cependant, elle semblerait stabiliser la chaîne α , maintenir le sillon pour l'accessibilité aux peptides, et permettre le recrutement d'autres molécules chaperonnes. Deux autres molécules chaperonnes viennent ensuite s'associer aux complexes : la calréticuline et la calnexine. Cette dernière semble plus importante, que la calréticuline, pour l'association entre ces complexes protéiques et le transporteur TAP (transporter associated with antigen processing). TAP est un complexe hétérodimérique, formé de TAP1 et TAP2, appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Il est essentiel pour le transport de peptides du cytoplasme dans le réticulum endoplasmique (Karttunen et al., 1999). Ce complexe TAP se lie aux molécules de classe I

vides, et participe au chargement en peptides. Néanmoins, à ce stade, une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines est nécessaire : la tapasine. Elle semble jouer deux rôles. Le premier, pour l'association entre les molécules de classe I et TAP, le second, pour la fixation de peptides au sein du sillon. Le rôle de la tapasine semble très similaire à celui de H-2M pour les molécules de classe II. L'association de TAP et de la tapasine semble préexister afin de mobiliser les molécules de classe I pour l'édition de différents peptides, jusqu'à trouver celui qui aura la plus forte affinité. La stabilisation des molécules de classe I entraîne leur dissociation du complexe multi-protéiques et leur expression en surface.

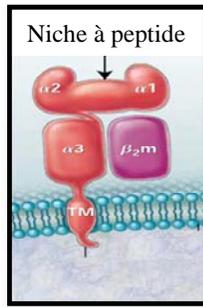


Figure 21 : Structure des molécules de classe I.

Les molécules de classe I sont des hétérodimères composés d'une chaîne α et de la β 2-microglobuline.

- la chaîne α est composée de trois domaines α 1, α 2 et α 3,
- la niche à peptide est formée des domaines α 1 et α 2,
- seule la chaîne α a une région transmembranaire et une queue intracytoplasmique de quelques acides aminés.

Copyright © 2002 Dr Karine SERRE

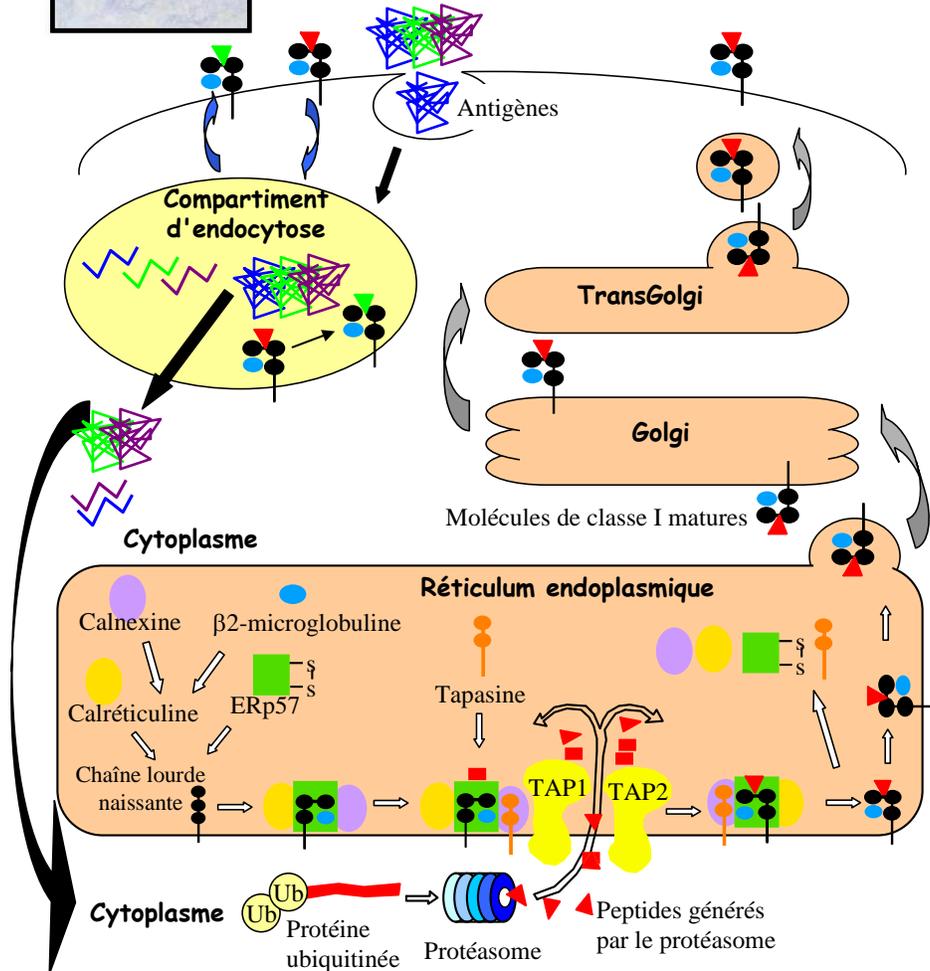


Figure 22 : Transport et chargement en peptides des molécules de classe I.

Les chaînes lourdes et naissantes des molécules de classe I s'associent avec la β 2-microglobuline, afin de former des dimères vides, dans le réticulum endoplasmique. Ces molécules de classe I vides se complexent avec de nombreuses molécules chaperonnes (calréticuline, calnexine, Erp57) et interagissent avec TAP grâce à la tapasine. TAP délivre des peptides générés, dans le cytoplasme par le protéasome, à ses molécules de classe I immatures. Dès qu'un peptide se fixe dans le sillon, les molécules de classe I acquièrent une conformation stable et peuvent se dissocier du complexe multiprotéique pour être exportées en surface.

Copyright © 2002 Dr Karine SERRE

7.2.2)- Le protéasome génère des peptides destinés à la présentation dans le contexte des molécules de classe I

La majorité des peptides associés aux molécules de classe I sont issus de protéines destinées à la dégradation. Les protéines sont renouvelées en permanence, et il existe d'une part, des processus de synthèse, et d'autre part, des processus de dégradation. Les vitesses de renouvellement sont très différentes selon les protéines (demi-vie allant de quelques minutes à quelques jours). La dégradation, des protéines endogènes intracellulaires, est assurée, pour l'essentiel, par un énorme complexe multi-protéique de forme cylindrique (10 nm de diamètre et 15 nm de long) : le protéasome. Sa localisation est cytoplasmique et nucléaire.

Ce protéasome, appelé 20S, est formé de quatre unités, une unité α à chaque extrémité et deux unités β au centre, chacune étant composée de 7 sous unités. L'activité protéolytique du protéasome 20S, est située à l'intérieur du cylindre dans lequel le substrat ubiquitiné entre, puis est dégradé en peptides. La protéine 19S (qui s'associe avec le protéasome 20S pour former le protéasome 26S), et la protéine 11S (PA28), régulent cette activité protéolytique. Une protéine doit être au préalable ubiquitinée pour être dégradée par le protéasome 26S. L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés, présente dans toutes les cellules (d'où son nom). En présence d'ATP et sous l'effet d'enzymes appelées E1 (activatrice), E2 (conjugase) et E3 (ligase), une chaîne poly-ubiquitine est synthétisée sur un résidu lysine de la protéine à dégrader. Cette dernière devient ainsi un substrat du protéasome 26S, qui la dégrade en peptides de 3 à 25 acides aminés qui seront partiellement hydrolysés en acides aminés (lesquels pourront être réutilisés par la cellule). Les molécules d'ubiquitine libérées par dé-ubiquitination seront également réutilisées.

Le protéasome dégrade, ainsi, un grand nombre de protéines, récepteurs, transporteurs, enzymes, facteurs transcriptionnels, cyclines. Il intervient également dans la dégradation d'antigènes d'origine endogène en fragments peptidiques qui seront présentés à la surface de la cellule en association avec les molécules de classe I. La spécificité du protéasome doit être caractérisée afin de définir les peptides qui vont permettre la génération de lymphocytes T CD8 effecteurs. Il semblerait que, de manière générale, le protéasome libère des peptides, de 5 à 11 acides aminés, capables d'être transportés par TAP dans le réticulum endoplasmique, puis de se fixer sur les molécules de classe I (Niedermann et al., 1999; Uebel and Tampe, 1999). Actuellement le processus par lequel les peptides, issus du protéasome, sont transportés jusqu'au TAP est encore à élucider. Néanmoins, des HSP cytoplasmiques ont été proposées pour servir de système de transport (Chen and Androlewicz, 2001).

Finalement, ce protéasome semble avoir deux fonctions. La première est le contrôle des protéines intracellulaires, par l'élimination des protéines ayant une mauvaise conformation ou, ayant été suffisamment recyclées. La seconde est la génération de peptides qui vont être présentés en association avec les molécules de classe I, à la surface cellulaire afin de stimuler des lymphocytes T CD8 (Tanaka and Kasahara, 1998).

L'activité protéolytique du protéasome est régulée dans les cellules. Un signal extracellulaire soluble, comme l'IFN- γ , a un rôle majeur dans l'induction d'unités importantes pour la réorganisation et l'augmentation de l'activité du protéasome. Ce dernier a une activité constitutive, mais l'IFN- γ permet la formation de "l'immunoprotéasome". Celui-ci se forme par l'échange de trois unités au profit de trois nouvelles, de type β (LMP2, LMP7 et MECL1). L'immunoprotéasome, qui en résulte, possède alors, de nouvelles activités protéolytiques, ce qui permet la génération d'une plus grande variété de peptides. L'IFN- γ permet aussi l'augmentation d'expression d'unités régulatrices de l'immunoprotéasome, la protéine 11S (ou PA28). PA28 est constitué de deux sous unités PA28 α et PA28 β , formant des complexes PA28($\alpha\beta$)₃, qui stimulent des activités protéolytiques de l'immunoprotéasome. Ainsi, son rôle a été confirmé chez des souris déficientes en PA28, qui développent des réponses cytotoxiques moins efficaces que les souris normales (Preckel et al., 1999).

Le protéasome joue un rôle important dans l'initiation d'une immunité cytotoxique. Il est donc essentiel de comprendre comment ces unités et sous unités sont régulées par les DC. Des DC, dérivées de monocytes du sang humain, dont la maturation est induite par du LPS, ou par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β + IL-6 + TNF- α), ou par l'engagement de CD40, augmentent l'expression des composants de l'immunoprotéasome (LMP2, LMP7 et MECL1) et des sous unités régulatrices (PA28) (Macagno et al., 1999). Des résultats identiques ont été proposés pour les cellules de Langerhans, dérivées des précurseurs CD34⁺, où la maturation induite par du LPS, provoque l'augmentation d'expression de nombreux composants impliqués dans la présentation par les molécules de classe I (TAP, ERp57, tapasin, LMP2, LMP7 et les molécules de classe I elles mêmes) (MacAry et al., 2001).

7.2.3)- Présentation d'antigènes exogènes dans le contexte des molécules de classe I par les cellules dendritiques

La présentation d'un antigène exogène, dans le contexte des molécules de classe I, nécessite un devenir intracellulaire de cet antigène différent de celui de la présentation dans le contexte classe II. En effet, l'antigène doit passer, des compartiments de la voie d'endocytose vers le cytosol, où il est alors ubiquitiné, puis dégradé en peptides par le protéasome. Ces peptides sont ensuite pris en charge par le transporteur TAP et accèdent au réticulum endoplasmique où ils sont enfin associés aux molécules de classe I (Pamer and Cresswell, 1998). Cependant, les mécanismes exacts de relocalisation de l'antigène des compartiments de dégradation de la voie d'endocytose, vers le cytoplasme, où ils sont alors accessibles aux processus classiques de chargements en peptides des molécules de classe I, sont mal connus.

Néanmoins, une étude a été réalisée, dans une lignée de DC (D1), sur le devenir intracellulaire de complexes immuns (OVA/anti-OVA ou HRP/anti-HRP). Elle met en évidence un transport sélectif de l'antigène, des endosomes vers le cytoplasme (Rodriguez et al., 1999). Ce

phénomène n'est pas observé dans les macrophages. C'est une forme légèrement dégradée de l'OVA (30kDa au lieu de 45kDa) qui est transportée dans le cytoplasme et qui subit, ensuite, une dégradation plus importante par le protéasome. Ce transport dépend de la température (inhibé à 20°C), de l'acidité des compartiments d'endocytose (inhibé en présence de NH₄Cl), de l'ATP, et de la taille de l'antigène (< à 500kDa). Les protéases, résidentes dans les endosomes ou lysosomes, comme les cathepsines, sont toujours localisées dans ces compartiments ce qui suggère un transport sélectif, et non pas une "dégranulation" non spécifique des compartiments endocytiques.

Des voies de présentation dans le contexte des molécules de classe I, dites alternes, existent (Reimann and Schirmbeck, 1999), tout comme d'ailleurs, pour la présentation dans le contexte des molécules de classe II. Nous pouvons en décrire au moins trois. La première est le recyclage des molécules de classe I, de la membrane plasmique vers les endosomes précoces. Un échange de peptide, provenant d'antigènes exogènes internalisés, s'effectue dans ces compartiments, avant réexpression des molécules de classe I en surface. Ce système de transport est utilisé par certaines toxines bactériennes (la toxine de *Pseudomonas exotoxin* couplée à un épitope de la protéine de la matrice du virus de l'influenza) (Ulmer et al., 1994) et certaines HSP (Castellino et al., 2000). La seconde suggère que les peptides, générés dans la voie d'endocytose, peuvent être directement dirigés dans le compartiment de chargement des molécules de classe I naissantes, c'est-à-dire, dans le réticulum endoplasmique. La troisième est la possibilité que des antigènes exogènes soient dégradés par des protéases extracellulaires, ou, que des peptides soient "régurgités" de sorte qu'ils aient accès aux molécules de classe I directement à la surface. Néanmoins, il semblerait que la voie la plus efficace dans le cadre de l'activation des lymphocytes T soit la voie classique.

7.2.4)- Les différentes formes d'antigènes permettant la présentation croisée

Délivrer un antigène, afin qu'il soit présenté dans le contexte des molécules de classe I, est d'un intérêt majeur pour induire une immunité cytotoxique.

7.2.4.1)- Présentation croisée *in vitro*

Comme nous l'avons souligné précédemment, les mécanismes de présentation dans le contexte des molécules de classe I sont peu connus. Les DC capturent des antigènes solubles par macropinocytose. Ces antigènes sont ensuite, libérés dans le cytoplasme puis, pris en charge par le protéasome et par TAP (Brossart and Bevan, 1997; Norbury et al., 1997). La phagocytose permet aussi de délivrer des antigènes couplés à des billes dans un phagolysosomes qui les délivrent, ensuite, dans le cytoplasme (Kovacsovic-Bankowski et al.,

1993; Shen et al., 1997). Néanmoins, de très fortes concentrations d'antigène sont nécessaires, pour ces processus.

Une approche efficace est de "forcer" les antigènes à rejoindre le cytoplasme des cellules. Il a été intéressant de tirer profit des pathogènes intracellulaires, comme les virus et leurs propriétés de libérer leur contenu génétique dans la cellule afin de pouvoir s'y répliquer. Ainsi, les virosomes sont des enveloppes virales reconstituées, où le matériel génétique a été substitué par un antigène. Les virosomes formés, à partir du virus de l'influenza par exemple, conservent les propriétés du virus natif, grâce à l'hémagglutinine, une glycoprotéine présente dans leur enveloppe. Ils se fixent puis entrent dans les cellules, et fusionnent avec les membranes des vésicules de la voie d'endocytose à pH acide, pour délivrer leur contenu dans le cytoplasme. Ils sont très efficaces pour délivrer un antigène à des DC afin qu'elles le présentent à des lymphocytes T CD8. La bactérie *Listeria monocytogenes* échappe à la dégradation dans les lysosomes, en gagnant le cytoplasme grâce à une protéine hémolytique : la listériolysine. Des liposomes, sensibles au pH et contenant cette listériolysine, sont efficaces pour délivrer de l'OVA dans le cytoplasme de macrophages (Lee et al., 1996).

Des récepteurs ont été mis en évidence permettant une présentation efficace, à de faibles concentrations d'antigènes. TLR2 reconnaissant OmpA, couplé de façon covalente à l'OVA, permet la présentation de peptides, de façon dépendante de TAP (Jeannin et al., 2000). D'autres récepteurs sont également responsables de cette présentation puisque les DC peuvent capturer des pathogènes viraux et en présenter des antigènes dans le contexte des molécules de classe I (Bachmann et al., 1996; Brossart and Bevan, 1997). Elles sont aussi capables de présenter des antigènes associés à des cellules apoptotiques (Albert et al., 1998b). Enfin, le récepteur Fc est un candidat potentiel intéressant, et nous analyserons les résultats obtenus, sur la présentation d'antigènes encapsulés dans des liposomes opsonisés grâce aux articles 2 et 3 (Machy et al., 2002; Machy et al., 2000).

7.2.4.1)- Présentation croisée *in vivo*

Différentes formulations vaccinales se sont révélées efficaces pour stimuler des réponses cytotoxiques *in vivo* contre des antigènes exogènes. Ainsi des formes d'OVA, agrégées par la chaleur (Speidel et al., 1997), ou couplée à des billes afin de faciliter leur phagocytose (Kovacs-Bankowski et al., 1993) peuvent générer des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Des systèmes de transport de l'antigène ont été testés comme les HSP (Suzue et al., 1997), ou des toxines bactériennes comme l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* (Fayolle et al., 2001). Mais aussi des formes plus particulières, comme des liposomes (Reddy et al., 1992; Zhou et al., 1992) ou des virosomes (Arkema et al., 2000), contenant des protéines ou des peptides, qui génèrent des réponses cytotoxiques.

8)- Les cellules dendritiques et leurs fonctions de régulation de l'immunité acquise

Dans cette dernière partie, nous allons discuter le rôle des DC dans l'induction, mais aussi dans la régulation de l'immunité acquise. Elles semblent être responsables de la tolérance centrale au sein du thymus, mais aussi du maintien de la tolérance périphérique. Elles peuvent activer des lymphocytes T CD4 et CD8, naïfs ou mémoires. Enfin, elles sont capables d'orienter les réponses T, vers Th1 ou Th2.

Comment les DC peuvent-elles être à l'origine de tant de fonctions à priori contradictoires ? Est ce que ces différentes fonctions doivent être attribuées à des populations de DC différentes ou à un type unique de DC qui pourrait être instruit, par le microenvironnement, pour réaliser telle ou telle fonction ? Comment sont contrôlés les mécanismes responsables de la présentation d'antigènes exogènes dans le contexte des molécules de classe I ? Voici autant de questions que nous allons tenter d'aborder dans cette fin d'introduction.

8.1)- Les cellules dendritiques sont impliquées dans la tolérance centrale et périphérique

8.1.1)- Les cellules dendritiques et la tolérance centrale

Les lymphocytes T sont produits dans le thymus. Durant leur développement, les thymocytes subissent une sélection très régulée, où ceux qui sont auto-réactifs ou non fonctionnels sont éliminés. En effet, lorsqu'un thymocyte reconnaît fortement un complexe CMH avec un peptide du soi (auto-réactif), le résultat est la mort par apoptose : c'est la sélection négative. Cependant, ils doivent être capables d'interagir avec les molécules du CMH de l'hôte (avec une moindre affinité); les molécules de classe II pour les lymphocytes T CD4, et les molécules de classe I pour les lymphocytes T CD8 : c'est la sélection positive. Dans le cas contraire, ils sont éliminés car ils sont non-réactifs. L'engagement du TCR de ces thymocytes immatures peut donc induire différents événements. Les cellules (DC, macrophages, lymphocytes B, stromales, épithéliales) responsables de la sélection négative et de la sélection positive, ne sont pas encore identifiées. Or, nous avons vu que le thymus contient deux populations de DC ($CD8\alpha+$ et $CD8\alpha+++$). Une étude, très élégante, a montré que ces DC thymiques sont impliquées dans les processus de sélection négative, mais qu'elles ne sont vraisemblablement pas responsables de la sélection positive (Brocker et al., 1997). Toutefois cette étude ne discrimine pas les fonctions des deux populations de DC présentes dans le thymus.

8.1.2)- Les cellules dendritiques et la tolérance périphérique

Il existe également des mécanismes de tolérance périphérique qui incluent soit, l'induction de la délétion en périphérie des clones autoréactifs, soit, le développement d'un état de non réponse (anergie) des lymphocytes T. De plus, des lymphocytes T régulateurs (CD4⁺/CD25⁺, ou produisant de l'IL-10), sont aussi impliqués dans le maintien de la tolérance périphérique. Chez la souris, les DC CD8 α ⁻ sont plus efficaces pour activer la production d'IL-2 et la prolifération de lymphocytes T allogéniques, que les DC CD8 α ⁺ (Kronin et al., 1996). La faible efficacité des CD8 α ⁺ semble être associée à l'induction d'apoptose sur les lymphocytes T, qui pourrait être due à l'expression de FasL par ces DC (Suss and Shortman, 1996). Ces résultats ont suggéré, pendant longtemps, que ces DC CD8 α ⁺ pouvaient être impliquées dans des mécanismes de retro contrôle négatif, capables de réguler une réponse immune se mettant en place. Il a même été postulé, que les DC CD8 α ⁻ auraient un rôle plutôt stimulateur, alors que les CD8 α ⁺ seraient plutôt impliquées dans la tolérance périphérique. Un argument en cette faveur a été d'ailleurs l'observation que les DC CD8 α ⁺ présentes au sein des zones T exprimaient fortement des complexes CMH/peptides du soi (Inaba et al., 1997). Des DC, ayant capturé des corps apoptotiques, ont aussi été mises en évidence dans les ganglions mésentériques (Huang et al., 2000a).

À l'heure actuelle, l'idée que les DC sont à la fois capables de stimuler, ou d'inhiber la réponse immune, semble être attribuée à leur état de maturation, plutôt qu'à l'existence de deux populations (Roncarolo et al., 2001) ([Figure 23](#)). Chez l'homme, des DC matures, dérivées des monocytes, induisent la sécrétion d'IFN- γ , par des lymphocytes T allogéniques, alors que des DC immatures induisent la production d'IL-10 (Jonuleit et al., 2000). De plus, l'injection de DC immatures, chargées en peptides issus d'une protéine du virus de l'influenza, contre lequel la plupart des individus ont une immunité pré-existante, provoque une diminution des lymphocytes T producteurs d'IFN- γ au profit de l'apparition de lymphocytes T producteurs d'IL-10 (Dhodapkar et al., 2001). Il faut noter qu'il n'y a pas de diminution de la population totale de lymphocytes T CD8 spécifiques du virus de l'influenza chez ces individus. Les DC immatures ne sont pas moins efficaces pour stimuler des lymphocytes T, mais, elles induisent ces derniers à produire de l'IL-10. Elles peuvent donc inverser une réponse immune, déjà en place. Ceci suggère qu'elles contrôlent l'immunité tant sur le plan de la stimulation que de la tolérance, en permettant l'expansion de lymphocytes T régulateurs produisant de l'IL-10. A l'équilibre un routage continu de DC immatures, qui capturent et présentent des antigènes du soi (cellules apoptotiques ?), en absence de signal d'inflammation, pourrait ainsi maintenir la tolérance périphérique contre le soi (Steinman et al., 2000).

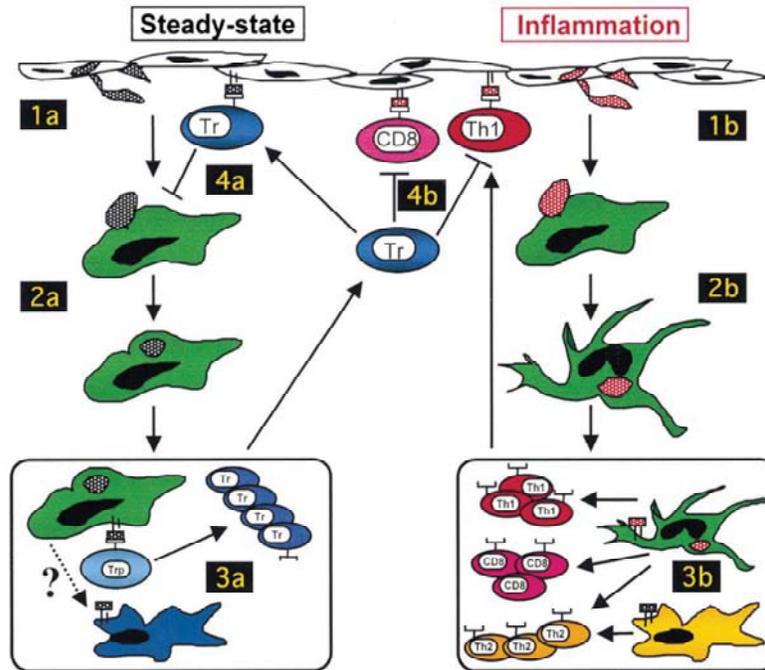


Figure 23 : Contrôle de la tolérance périphérique par les cellules dendritiques.

A l'équilibre, des DC immatures capturent des protéines de l'hôte et migrent jusqu'aux organes lymphoïdes, dans un processus normal de renouvellement cellulaire (1a). En absence de signaux inflammatoires, ces DC restent immatures mais peuvent tout de même coloniser les ganglions (2a). Des lymphocytes T peuvent interagir avec ces DC immatures et devenir des lymphocytes T régulateurs (3a). Cette étape pourrait nécessiter un transfert d'antigènes de ces DC nouvellement arrivées à des DC, responsables de la tolérance périphérique, déjà présentes dans le ganglion (en bleu) (3a). Ces lymphocytes T régulateurs, activés, pourraient migrer jusqu'au site périphérique, assurant ainsi un statut supprimeur sur le site, en sécrétant par exemple de l'IL-10 (4a).

En revanche, durant une inflammation, les DC immatures captureraient des antigènes de l'hôte en présence de signaux inflammatoires (1b). Ces DC, alors matures, migreraient jusqu'aux ganglions (2b) et activeraient des lymphocytes T et des lymphocytes B pour qu'ils deviennent effecteurs (3b). Sur ce schéma sont représentées deux types de DC : celles en vert pourraient polariser les lymphocytes T vers Th1, alors que les DC en jaune induiraient la différenciation des lymphocytes T vers Th2. Les lymphocytes T CD4 (Th1) et CD8 effecteurs pourraient alors migrer au site inflammatoire où leur activité serait contrôlée par les lymphocytes T régulateurs (4b),

Les lymphocytes T régulateurs spécifiques des antigènes de l'hôte, pourraient agir à différents niveaux (périphérie ou ganglion), en produisant des cytokines immunosuppressives (IL-10 et TGF- β). Ils pourraient également inhiber la différenciation vers Th1 des lymphocytes T activés par contact cellulaire.

Actuellement, il est postulé que le contrôle de la tolérance périphérique par les DC repose sur leur potentiel à induire l'activation de lymphocytes T régulateurs capables de produire de l'IL-10.

Adapté de Roncarolo, M. G. et al., J. Exp. Med. 2001, 193: 5-9

Copyright © 2002 Dr Karine SERRE

8.1.3)- Modulation de l'immunogénicité des cellules dendritiques par les tumeurs

Le microenvironnement local peut influencer, indirectement, le potentiel immunogénique des DC. En effet, contrairement aux situations d'infections virales ou bactériennes, l'émergence de tumeurs ne déclenche pas de réaction inflammatoire capable d'activer les DC endogènes locales. Le microenvironnement est contrôlé par les cellules cancéreuses, qui produisent ou induisent d'autres cellules à sécréter certaines cytokines. Par exemple, la production d'IL-10 par les cellules de mélanome inhibe la différenciation en DC des précurseurs circulants (Allavena et al., 1998; Buelens et al., 1997) et diminue ainsi leur accumulation au sein de la tumeur (Qin et al., 1997). De plus, l'IL-10 bloque la maturation des DC en inhibant l'expression des molécules de costimulation (De Smedt et al., 1997; Ding et al., 1993). L'IL-10 semble donc convertir les DC immuno-stimulatrices en cellules tolérogéniques (Enk et al., 1994; Steinbrink et al., 1999; Steinbrink et al., 1997). C'est donc en partie de manière indirecte, par leur action sur les DC, que les tumeurs pourraient inhiber la mise en place d'une réponse immune. Des lymphocytes T CD4 régulateurs, capables de produire de l'IL-10, pourraient également jouer un rôle inhibiteur important au niveau du site tumoral.

8.2)- Rôle des cellules dendritiques dans la polarisation des lymphocytes T CD4 vers Th1 et Th2

8.2.1)- Les lymphocytes T CD4 Th1 et Th2

Le système immunitaire a évolué afin d'adapter le type de réponse en fonction du type de pathogène à éliminer. Ainsi, deux catégories de réponses peuvent se mettre en place. Des réponses dites à médiation cellulaire, qui participent d'une part, à l'éradication des pathogènes intracellulaires tels que les virus, et certains types de bactéries et, d'autre part, à la lutte anti-tumorale. Des réponses dites à médiation humorale, qui sont adaptées pour lutter contre les pathogènes extracellulaires, tels que les parasites et d'autres types de bactéries. Ce choix de réponse immunitaire semble être régulé entièrement par les lymphocytes T helpers CD4 et, plus précisément, par le programme de fonctions effectrices qu'ils acquièrent. Les clones T murins CD4 peuvent être classés en deux sous populations, nommées Th1 et Th2, suivant le profil de cytokines qu'ils produisent (Mosmann et al., 1986). Ainsi, les lymphocytes Th1 sécrètent de l'IL-2, de l'IFN- γ et du TNF- β . Ils semblent être à l'origine des réponses cellulaires et de la production préférentielle d'IgG2a. Les lymphocytes Th2 qui produisent les cytokines IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, semblent être à l'origine des réponses humorales et de la production d'IgG1. Les cytokines produites sont cruciales très tôt dans l'orientation de la réponse, ainsi l'IL-12 favoriserait préférentiellement Th1, alors que l'IL-4 développerait plutôt une réponse Th2. Néanmoins, outre le rôle prépondérant joué par les cytokines, les mécanismes, par lesquels un pathogène donné induit une certaine catégorie de réponse, sont encore très peu connus. Il a été montré, néanmoins, que les différentes populations de DC

semblent jouer un rôle majeur dans la modulation des réponses immunes, en étant capables d'influencer le développement des lymphocytes T préférentiellement vers Th1 ou vers Th2 (Bottomly, 1999; Lanzavecchia and Sallusto, 2001b; Lanzavecchia and Sallusto, 2001c; Liu et al., 2000; Liu et al., 2001; Moser and Murphy, 2000; Reid et al., 2000).

8.2.2)- Les propriétés de polarisation des populations de cellules dendritiques CD8 α - et CD8 α +

Deux études ont mis en évidence que les DC pouvaient, non seulement, activer *in vivo* des lymphocytes T, mais qu'elles pouvaient, de plus, orienter leur développement vers Th1 ou Th2. Dans ces deux modèles, les auteurs ont utilisé des DC purifiées, issues de la rate, chargées en antigènes *ex vivo*, puis injectées dans les coussinets plantaires de souris. Quatre à cinq jours après l'immunisation, les cellules des ganglions lymphatiques drainants sont restimulées *in vitro* et testées pour la sécrétion de cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL10). Les résultats démontrent que les DC CD8 α + induisent une réponse endogène de type Th1 (IL-2, IFN- γ), tandis que les DC CD8 α - induisent une réponse endogène Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) (Maldonado-Lopez et al., 1999a; Maldonado-Lopez et al., 1999b). Dans la seconde étude, les auteurs ont utilisé des DC triées sur la base de CD11b et chargées en peptide (OVA 323-339) *ex vivo*. Ces cellules sont ensuite injectées dans des souris ayant reçues, au préalable, un transfert adoptif de lymphocytes T CD4 spécifiques de l'OVA issus de souris transgéniques (DO11.10). Les DC CD11b-, représentant majoritairement des CD8 α +, induisent une réponse des lymphocytes T transférés plutôt Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-10), tandis que les DC, CD11b+, représentant majoritairement des CD8 α -, induisent une réponse de type Th2 (IL-4, IL-10) (Pulendran et al., 1999). Ces observations suggèrent qu'*in vivo*, la balance entre Th1/Th2 pourrait être régulée par le type de DC présentant l'antigène aux lymphocytes T naïfs.

Il est à noter, que des DC, issues de la rate, et injectées dans les coussinets plantaires ne reflètent, ni la réaction inflammatoire générée au site infectieux, ni l'ensemble des DC recrutées qu'un pathogène est capable d'activer. De plus, comme nous l'avons souligné précédemment, les DC localisées au sein de la rate sont moins diverses que celles situées dans les ganglions lymphatiques sous cutanés. Il est difficile de dire si les DC injectées activent, elles mêmes, les lymphocytes T *in vivo* ou bien si elles sont prises en charge par des DC endogènes (transfert d'antigène grâce aux exosomes par exemple). Les propriétés de migration de ces deux populations de DC semblent dépendantes du site d'injection. Lorsqu'elles sont injectées dans le sang, toutes deux colonisent la rate, mais les DC CD8 α - sont présentes en plus grand nombre (Ruedl and Bachmann, 1999). En revanche, lorsqu'elles sont injectées par voie sous cutanée seules les DC CD8 α - migrent jusqu'au ganglion drainant (Ruedl and Bachmann, 1999; Smith and de St Groth, 1999). Enfin, la voie d'administration des deux populations de DC a aussi une influence importante sur le type de réponse qu'elles induisent. En effet, lorsqu'elles sont injectées dans le sang, les différences de polarisation sont beaucoup

moins drastiques, que lorsqu'elles sont injectées par voie sous cutanée (Schlecht et al., 2001). Les deux populations, CD8 α - et CD8 α +, chargées en peptides, induisent alors des lymphocytes T CD4 à produire de l'IL5.

Chez l'homme la situation est différente. Les études sont conduites sur les deux types de précurseurs présents dans le sang humain. Les monocytes qui, en présence de GM-CSF + IL-4, se différencient en DC1, et les cellules plasmacytoïdes qui, en présence d'IL-3, engendrent des DC2 (Grouard et al., 1997). Les DC1 sont capables d'induire la polarisation vers Th1, de manière dépendante de l'IL-12, tandis que les DC2 engendrent une réponse plutôt Th2 (Rissoan et al., 1999). Il est très intéressant de noter que ces mêmes DC2, stimulées par un virus, sont capables de produire de l'IFN- α . Ce dernier permet la différenciation vers Th1 (en absence d'IL-12) chez l'homme, mais pas chez la souris (Cella et al., 2000; Kadowaki et al., 2000).

Il faut être prudent avec ce type de résultats, car, les cocktails de cytokines nécessaires à la génération des DC humaines, GM-CSF + IL-4 pour DC1 et IL-3 pour DC2, pourraient être responsables de leur potentiel respectif à induire la polarisation vers Th1 et Th2. Il existe, en effet, des boucles de régulation de la production d'IL-12 et notamment par l'IL-4 (bien que son rôle soit controversé (Koch et al., 1996)) qui induit la production d'IL-12 par les DC dérivées des monocytes (Hochrein et al., 2000).

8.2.3)- La production de cytokines par les cellules dendritiques CD8 α - et CD8 α +

Comment expliquer que les DC CD8 α + aient une propension à induire une réponse vers Th1 tandis que les DC CD8 α - favoriseraient préférentiellement le développement vers Th2 ? La propriété de polarisation vers Th1 des DC CD8 α + paraît être directement liée à leur capacité à produire de l'IL-12. Des expériences, similaires à celles précédemment décrites, ont été réalisées à partir de DC, CD8 α + ou CD8 α -, issues de souris déficientes en IL-12 ou IL-4, ou IL-10, ou IFN- γ . Il a été montré les DC CD8 α +, dérivées de souris déficientes en IL-12 ou en IFN- γ , chargées en antigène puis injectées par voie sous cutanée, perdaient leurs propriétés de polariser des lymphocytes T vers Th1. Inversement, des DC CD8 α -, dérivées de souris déficientes en IL-10, ne sont plus capables de favoriser la différenciation des lymphocytes T vers Th2 (Maldonado-Lopez and Moser, 2001). Enfin, les DC CD8 α -, dérivées de souris déficientes en IL-4, ont le même potentiel pour permettre la polarisation vers Th2 que des DC CD8 α - de souris normales.

La différenciation vers Th2 est peu comprise à l'heure actuelle. Il se pourrait que ce soit l'absence de signaux extérieurs (IL-12, IFN- γ favorisant d'ailleurs la production d'IL-12) qui induise la polarisation vers Th2 suggérant même qu'elle se ferait par "défaut", bien que cette hypothèse soit très controversée. L'IL-4, est cependant nécessaire au développement des Th2, *in vitro* et *in vivo*. Pourtant cette cytokine n'est produite que par les cellules NK, les cellules

NKT et les lymphocytes T CD4 activés, se différenciant vers Th2. Deux études, seulement, suggèrent que les DC pourraient produire de l'IL-4. Une lignée de DC (D1), en présence de la forme hyphae de *Candida albicans*, produit des ARN messagers spécifiques de l'IL-4 (d'Ostiani et al., 2000). Des DC, dérivées de la moelle osseuse, peuvent produire de l'IL-4 en présence d'un rétrovirus (Kelleher et al., 1999). Malgré ces résultats, les capacités de polarisation vers Th2, de DC CD8 α -, issues de souris déficientes en IL-4, ne sont pas altérées (Maldonado-Lopez and Moser, 2001).

Il semblerait donc, que le seul événement qui contrôle la balance Th1/Th2, par les populations CD8 α + et CD8 α -, soit leur potentiel à produire de l'IL-12 (Figure 24). Ces résultats suggèrent que certaines populations de DC seraient "programmées", selon leur potentiel à produire de l'IL-12, à induire un type donné de réponse T. Néanmoins, des DC dérivées *in vitro* de la moelle osseuse en présence de diverses combinaisons de cytokines GM-CSF/IL-3 + IL-12/IFN- γ ou + IL-4 activent des lymphocytes T CD4 vers Th1 ou Th2 respectivement (Sato et al., 1999). La production locale de cytokines, durant la maturation des DC, pourraient être un événement critique pour l'orientation de la réponse. Ainsi, les DC CD8 α + incubées en présence d'IL-10, avant leur injection, promouvraient la polarisation vers Th2. Inversement, les DC CD8 α - en présence d'IFN- γ , favoriseraient le développement vers Th1 (Maldonado-Lopez and Moser, 2001). La production d'IL-12, dans la rate, est restreinte aux DC CD8 α +. Cependant, sous certaines conditions (présence d'IFN- γ), les CD8 α - peuvent sécréter de l'IL-12 bien qu'en moins grande quantité (Hochrein et al., 2001; Maldonado-Lopez and Moser, 2001; Reis e Sousa et al., 1999). Enfin, les relations entre les DC CD8 α + et CD8 α - sont peu définies. Il semble que l'expression de CD8 α soit extrêmement stable dans le temps, et qu'elle permette de distinguer deux populations différentes et, non pas, deux stades séquentiels de maturation (De Smedt et al., 2001).

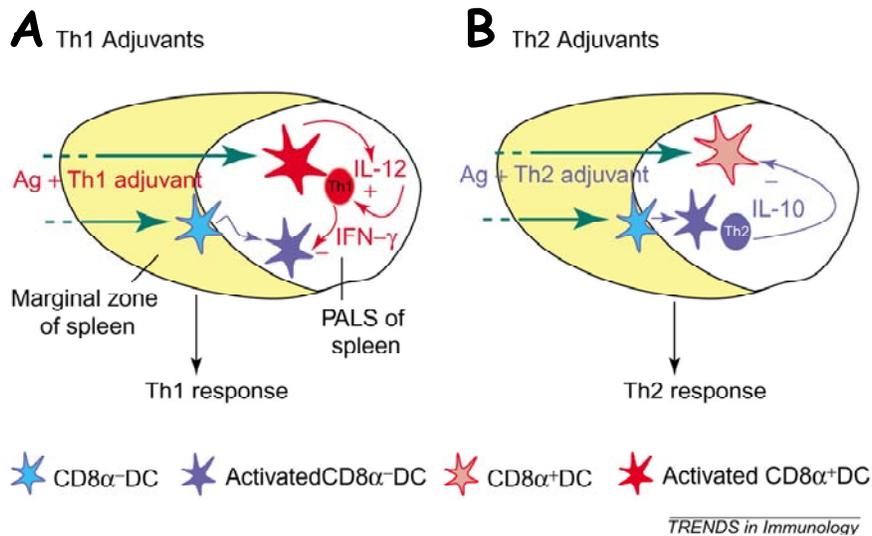


Figure 24 : Rôle des cellules dendritiques dans la polarisation des lymphocytes T CD4.

Les décisions qui permettent de contrôler la polarisation vers Th1 ou Th2, se font à différents niveaux. Néanmoins, l'événement de restriction semble être la capacité des DC à produire de l'IL-12, cette dernière étant la cytokine prédominante, qui régulerait la polarisation vers Th1. Nous pouvons imaginer les deux scénarios suivants :

A) En présence, par exemple, du LPS de *Escherichia coli* (qui induit préférentiellement la différenciation vers Th1), les deux populations de la rate, CD8 α ⁻ et CD8 α ⁺, sont activées probablement via le même récepteur (TLR4 ?). Cependant, seules les DC CD8 α ⁺ produisent de l'IL-12 qui provoque la polarisation des lymphocytes T vers Th1. De plus, la production d'IFN- γ par ces lymphocytes T activés pourrait, en même temps, inhiber le potentiel des CD8 α ⁻ à induire la différenciation vers Th2.

B) En présence, par exemple, d'un adjuvant tel que l'Alum (qui induit préférentiellement la différenciation vers Th2), les deux populations de DC pourraient être activées. Cependant, cette activation ne provoque pas la production d'IL-12, voire pourrait même l'inhiber, ce qui entraîne la polarisation vers Th2. De plus, la production d'IL-10 par les lymphocytes T activés pourrait, en même temps, inhiber le potentiel des CD8 α ⁺ à produire de l'IL-12, et donc à polariser vers Th1.

Adapté de Pulendran B et al., Trends In Immunology. 2001, 22: 41-47
Copyright © 2002 Dr Karine SERRE

On peut donc imaginer deux modèles. Le premier, où certaines populations de DC sont "programmées" pour engendrer une réponse T donnée. Il faut supposer dans ce cas que, lors d'une infection, le pathogène pourra être en contact avec toutes les populations de DC. Celles qui pourront être activées auront la réponse adaptée à l'élimination de ce pathogène. L'évolution a peut-être permis l'apparition de plusieurs populations de DC ayant chacune une efficacité accrue pour une fonction donnée. Il a d'ailleurs été montré dans ce sens que les populations de DC, dérivées *in vitro*, ont des réponses différentes en fonction du stimulus reçu (Pulendran et al., 2001a) et ce de façon dépendante de leur profil d'expression en TLR (Kadowaki et al., 2001).

Dans le second modèle, les produits microbiens, les signaux environnementaux dont la production locale de cytokines, mais aussi l'interaction avec des lymphocytes T CD4, durant la maturation des DC, pourraient être les événements critiques pour la génération des réponses Th1 ou Th2 (Kalinski et al., 1999). La sécrétion d'IL-12 semble pouvoir être induite par différents stimuli, comme des produits issus de pathogènes (LPS, STAg) mais aussi lors de l'interaction avec des lymphocytes T CD4 par l'engagement des molécules de classe II ou de CD40 (Koch et al., 1996). L'engagement "physiologique" des molécules de classe II pouvant se faire via le TCR ou bien via LAG-3. Une forme soluble de ce dernier induit, en effet, la production d'IL-12 par les DC (Avice et al., 1999). Il est de plus en plus évident que les molécules de classe II sont capables de transduire un signal intracellulaire, responsables de l'activation des cellules (Lang et al., 2001). On peut supposer qu'il y a deux niveaux de contrôle de la production d'IL-12. Tout d'abord en périphérie, initiée par le pathogène et par l'environnement, et ensuite dans les ganglions, soutenue par les lymphocytes T CD4, en partie grâce à l'interaction via les molécules de classe II et de CD40.

Une approche *in vivo* permettra de mieux comprendre la physiologie des DC, qui est encore obscure. En effet, maintenant qu'il est possible de discriminer au moins quatre populations de DC, dans les ganglions sous cutanés, (CD8 α -/DEC-205-, CD8 α -/DEC-205+/-, CD8 α -/DEC-205+, CD8 α +/DEC-205+) (Henri et al., 2001), il sera très intéressant d'essayer de répondre aux questions suivantes : 1) quelle est leur localisation précise au sein des ganglions ? 2) comment ces populations sont régulées et recrutées ? 3) quelle est leur capacité à produire de l'IL-12 après activation *ex vivo* et *in vivo* ? 4) quel est leur potentiel à activer et polariser les lymphocytes T CD4 vers Th1 ou Th2 ? 5) quel est leur potentiel à activer des lymphocytes T CD8 naïfs ?

8.3)- Rôle des cellules dendritiques dans l'activation des lymphocytes T CD8

8.3.1)- Les populations de cellules dendritiques, CD8 α - et CD8 α +, responsables de la présentation croisée

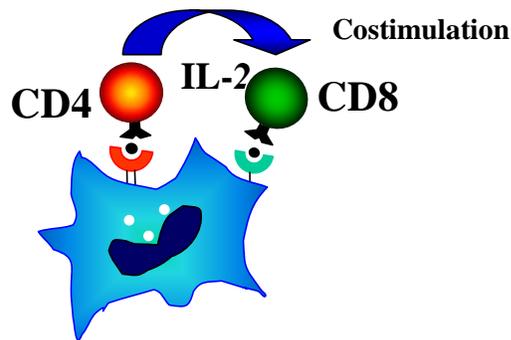
Les populations, CD8 α - et CD8 α +, ont été également testées pour leur aptitude à générer des réponses cytotoxiques *in vivo*. Lorsqu'elles sont triées à partir de la rate, chargées en peptides *in vitro*, puis injectées par voie sanguine, ces deux populations peuvent générer des réponses cytotoxiques efficaces (Ruedl and Bachmann, 1999; Schlecht et al., 2001). Deux groupes ont comparé, *ex vivo*, les trois populations de la rate (CD4-/CD8 α -, CD4+/CD8 α -, CD4/CD8 α +), après immunisation, pour leur propriété de présentation croisée. Des cellules irradiées, issues de la rate de souris déficientes en β 2-microglobuline (donc incapables de présenter elles mêmes un antigène en association avec les molécules de classe I), sont chargées en OVA *in vitro*, puis injectées dans le sang d'animaux receveurs. Quatorze heures après, seules les DC CD8 α + activent des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'OVA. Pourtant, les populations CD8 α - ont, elles aussi, capturé les cellules injectées (den Haan et al., 2000). Il est cependant, difficile de conclure à partir de cette étude, car l'activation obtenue des lymphocytes T CD8, est très faible et le rôle des lymphocytes T CD4 n'a pas été testé.

Lorsqu'une très forte concentration d'OVA soluble est injectée dans le sang d'animaux receveurs, le résultat est identique. Seules les CD8 α + peuvent présenter l'OVA dans le contexte des molécules de classe I (Pooley et al., 2001). Toutefois, les DC CD4-/CD8 α - peuvent, elles aussi, acquérir cette propriété, lorsqu'elles sont exposées à des produits bactériens comme le LPS, bien que leur efficacité soit moindre. L'activation des lymphocytes T CD8 semble donc être dépendante de certaines conditions de stimulation des DC.

8.3.2)- Le dialogue à trois partenaires : les lymphocytes T CD4, les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD8

Dans de nombreux cas, et en particulier, dans les réponses anti-tumorales, l'activation de lymphocytes T CD8 est complexe et requiert la présence de lymphocytes T CD4 helpers activés (Pardoll and Topalian, 1998; Toes et al., 1999). Ce phénomène est désigné sous le terme de "help". Les lymphocytes T CD4 et CD8 doivent reconnaître leur antigène respectif sur la même DC (Guerder and Matzinger, 1992). La mise en place de réponses cytotoxiques nécessite donc un triple partenariat, entre les DC et les lymphocytes T CD4 et CD8 (Clarke, 2000). Originellement, il était pensé que ces deux lymphocytes T, étaient simultanément en contact avec la DC, créant une proximité suffisante, permettant aux lymphocytes T CD8 de bénéficier de l'IL-2 sécrétée par les lymphocytes T CD4 (Figure 25A). Puis, une autre théorie a émergé, suggérant plutôt des interactions séquentielles où le "help" ne serait pas dirigé vers les lymphocytes T CD8, mais vers les DC (Figure 25B). L'interaction, entre un lymphocyte T CD4 et une DC, doit être considérée comme un dialogue bidirectionnel et dynamique qui provoque l'activation simultanée des deux partenaires. Cette interaction convertit la DC en une cellule extrêmement efficace pour stimuler des lymphocytes T CD8 (Lanzavecchia, 1998). Bien que le mécanisme par lequel les lymphocytes CD4 apportent le "help" aux DC ne soit pas encore élucidé, il semble, en partie dépendant de l'interaction CD40-CD40L (Clarke, 2000).

A : Modèle de l'interaction simultanée à trois partenaires



B : Modèle séquentiel d'interaction entre les trois partenaires

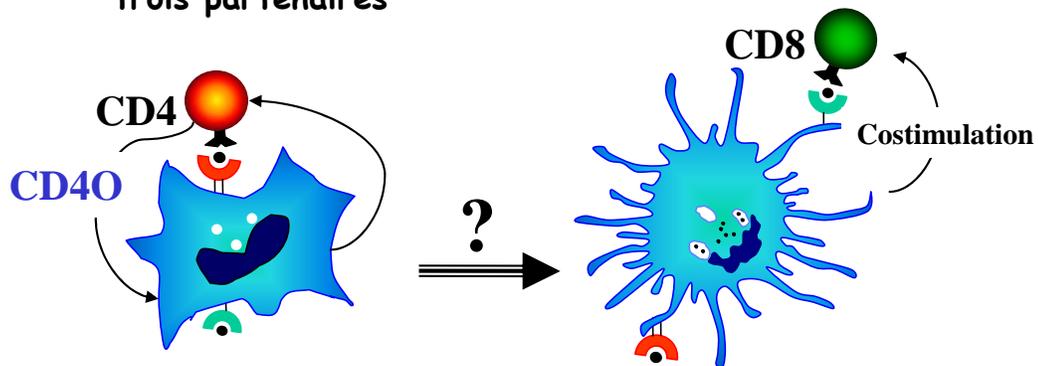


Figure 25 : Rôle des lymphocytes T CD4 dans l'acquisition, par les cellules dendritiques, des propriétés de stimulation des lymphocytes T CD8.

A) Modèle de l'interaction simultanée à trois partenaires.

Les lymphocytes T CD4 et CD8 interagissent en même temps avec la même DC. Le lymphocyte T CD4 est activé et produit de l'IL-2, qui contribue à l'activation du lymphocyte T CD8. Bien que l'IL-2 puisse, dans certains cas, se substituer aux lymphocytes T CD4, l'élément limitant de ce concept est sa faible plasticité. Il nécessite un événement qui doit être extrêmement rare *in vivo* : la rencontre simultanée entre les trois partenaires.

B) Modèle séquentiel de l'activation des DC par le lymphocyte T CD4. Cette DC nouvellement activée peut alors interagir directement et activer un lymphocyte T CD8. Les bases moléculaires exactes de l'interaction entre la DC et le lymphocyte T CD4 ne sont pas encore totalement élucidées. Néanmoins, l'engagement de CD40 sur la DC par le lymphocyte T CD4 semble participer à l'activation des DC. D'ailleurs, le rôle de CD40 sur les DC réfute l'idée première, des cytokines produites par les lymphocytes T CD4 pouvant agir sur le lymphocytes T CD8.

Adapté de Lanzavecchia, A., Nature. 1998, 393: 413-414 Copyright © 2002 Dr Karine SERRE

Les trois premières études, proposant un rôle direct des lymphocytes T CD4 sur les DC et non pas sur les lymphocytes T CD8, ont en effet démontré l'implication de CD40-CD40L (Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Tout d'abord *in vitro* dans le modèle H-Y. Afin de comprendre les mécanismes par lesquels les DC acquièrent le potentiel d'activer des lymphocytes T CD8, des DC, issues de la rate de souris males, sont testées *in vitro*, pour leur efficacité à re-stimuler l'activité cytotoxique de lymphocytes T CD8 générés *in vivo* (Ridge et al., 1998). Dans ce système, ce sont donc les propriétés de re-stimulation de lymphocytes T CD8 par des DC exprimant l'antigène de manière endogène et constitutive, qui sont analysées. Les résultats montrent, qu'en absence de lymphocytes T CD4, les DC ne sont pas capables d'activer les lymphocytes T CD8. De même, des DC issues de souris déficientes en molécules de classe II, et donc incapables d'interagir avec des lymphocytes T CD4, ne parviennent pas à stimuler les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8. Néanmoins, que ce soit en absence de lymphocytes T CD4 ou bien avec les DC n'exprimant pas les molécules de classe II, leur potentiel à activer des lymphocytes T CD8 est restauré en présence d'anticorps agonistes spécifiques de CD40, ou bien, en présence du virus de l'influenza (Ridge et al., 1998). Il a également été montré que ces DC doivent exprimer CD80 et CD86 afin de stimuler les lymphocytes T CD8. Ces résultats suggèrent donc, que le rôle des lymphocytes T CD4, est de convertir les DC en induisant leur maturation, ce qui provoque l'augmentation des molécules de costimulation ainsi que, probablement, la sécrétion de cytokines.

Cette activation est dépendante d'un signal qui peut être induit par CD40 mais aussi par le virus de l'influenza. Néanmoins, un résultat contradictoire démontrant un rôle des lymphocytes T CD4, mais de façon indépendante de CD40, a été démontré *in vitro* (Lu et al., 2000). Des DC, issues de la moelle osseuse, sont utilisées pour activer des lymphocytes T CD4 et CD8, de souris transgéniques (spécifiques de l'hémagglutinine du virus de l'influenza). Quelle que soit la forme de l'antigène (lysate de tumeur exprimant l'hémagglutinine, protéine soluble, peptide reconnu par les lymphocytes T CD8), les lymphocytes T CD4 jouent un rôle majeur, permettant aux DC d'activer les lymphocytes T CD8. Pourtant des DC issues de souris déficientes en CD40 sont efficaces, bien que la présence de lymphocytes T CD4 soit tout de même nécessaire. Ces résultats suggèrent que d'autres molécules que CD40 peuvent être impliquées lors de l'interaction avec les lymphocytes T CD4. Il serait intéressant, dans ce contexte, d'analyser la cascade d'activation intracellulaire induite par l'engagement des molécules de classe II. D'autant qu'il a été montré que l'injection, de la forme soluble de LAG-3, pouvait, non seulement, amplifier les réponses immunes humorales et cellulaires contre un antigène soluble (El Mir and Triebel, 2000), mais aussi, permettre la régression de tumeur (Prigent et al., 1999).

Deux autres études se sont intéressées, à la génération de lymphocytes T CD8 cytotoxiques, contre des antigènes associés à des cellules *in vivo*. Des cellules, chargées *in vitro* avec de

l'OVA, sont injectées dans le sang et, une semaine après, la réponse cytotoxique est mesurée dans la rate. La réponse est abrogée dans les souris déficientes en CD40 ou en CD40L. Elle est aussi totalement inhibée dans des souris déplétées en lymphocytes T CD4, mais restaurée par l'injection d'anticorps agonistes spécifiques de CD40 (Bennett et al., 1998). Une réponse cytotoxique est également induite lorsque des souris B6 (H-2^b), sont immunisées dans le flanc par voie sous cutanée, avec des cellules issues de la rate de souris BALB/c (H-2^d) exprimant une protéine E1B de l'adéno virus humain. Des lymphocytes T CD8, spécifiques d'un peptide de E1B (192-200), en association avec les molécules H-2D^b, sont ainsi générés. Cette réponse est totalement inhibée dans les souris déplétées en lymphocytes T CD4, ou déficientes en molécules de classe II, mais une fois encore restaurée par l'injection d'anticorps anti-CD40. Les auteurs démontrent que les lymphocytes B ne sont pas responsables de l'activation des lymphocytes T CD8, car la réponse est correcte dans des souris n'ayant pas de lymphocytes B (déficientes en chaîne lourde μ des immunoglobulines) (Schoenberger et al., 1998).

Le rôle des lymphocytes T CD4 semble avoir deux conséquences, qui sont d'ailleurs extrêmement corrélées. La première, lors de l'initiation des réponses cytotoxiques pour permettre aux DC d'acquérir leurs fonctions de stimulation des lymphocytes T CD8. La seconde, afin de maintenir une population de lymphocytes T CD8 actifs et mémoires, permettant par exemple la persistance d'une immunité anti-virale ou anti-tumorale (Marzo et al., 2000). Des souris déficientes en CD40L peuvent générer une réponse normale contre une infection virale primaire par LCMV ou VSV (Vesicular Stomatitis Virus). Cependant, après deux mois, ces souris ont une activité cytotoxique très réduite par rapport aux souris normales (Borrow et al., 1996). Dans ce contexte, l'activation des DC par les virus est, peut-être à elle seule, suffisante pour induire leurs propriétés à stimuler des lymphocytes T CD8. Pourtant elle n'est semble-t-il pas suffisante pour maintenir une immunité mémoire. Nous ne discuterons pas la nécessité de la persistance de la présentation d'antigène afin de maintenir une population de lymphocytes T CD8 mémoires, car c'est une notion très controversée. Néanmoins, en supposant que l'antigène persiste et qu'il est présenté, on peut supposer que lorsque l'inflammation produite par le virus diminue, les lymphocytes T CD4 pourraient alors jouer un rôle crucial.

En résumé, il semblerait que le rôle des lymphocytes T CD4 soit d'induire la maturation finale des DC et ainsi d'augmenter les molécules de costimulation et peut-être aussi la sécrétion de cytokines (Figure 25B). Il existe peut-être des molécules de costimulation, induites lors de l'interaction avec les lymphocytes T CD4, qui ne sont pas encore identifiées, mais qui seraient nécessaires à l'activation des lymphocytes T CD8.

Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à l'activation des DC, induite par les lymphocytes T CD4, pour l'acquisition de leurs propriétés de stimulation des lymphocytes T CD8. Nous présenterons dans l'article 3 des résultats suggérant que les lymphocytes T CD4

influencent le processus de présentation dans le contexte des molécules de classe I, en permettant le passage, des antigènes exogènes, des vésicules d'endocytose vers le cytoplasme, devenant ainsi accessibles à la voie de présentation classique. L'article 4 décrit le rôle joué par les lymphocytes T CD4 endogènes *in vivo*, dans l'induction de la prolifération de lymphocytes T CD8, après immunisation par voie sous cutanée, d'antigènes encapsulés dans des liposomes.

Systeme experimental

II)- Le contexte et le système expérimental

1)- Le contexte

De nombreuses évidences montrent que le système immunitaire est capable de reconnaître, et dans certains cas, d'éliminer les cellules tumorales (Roth et al., 1994). Les lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques des antigènes tumoraux, sont les acteurs majeurs de cette immunité anti-tumorale. Néanmoins, malgré un catalogue croissant d'antigènes tumoraux (Cox et al., 1994; Mandelboim et al., 1994), le développement de vaccins thérapeutiques anti-tumoraux contre ces antigènes peu immunogéniques, est encore très limité. Le potentiel des DC, pour activer des lymphocytes T, en ont fait des candidats pour le développement d'immunothérapies efficaces contre le cancer, (Girolomoni and Ricciardi-Castagnoli, 1997; Mayordomo et al., 1997; Schuler and Steinman, 1997; Timmerman and Levy, 1999).

Divers modèles ont montré que, des DC chargées avec des antigènes tumoraux, puis injectées *in vivo*, permettaient d'induire une réponse immune protectrice capable de bloquer le développement de tumeurs (Mayordomo et al., 1995; Okada et al., 1998). Ces protocoles sont d'ailleurs déjà utilisés dans des essais cliniques chez l'homme et ont donné des résultats prometteurs (Nestle et al., 1998). Cependant, les techniques de production de DC sont lourdes et les dangers liés à l'induction de réponses auto-immunes ne sont pas pleinement exclus.

Les réponses anti-tumorales nécessitent l'activation des lymphocytes T CD4 helpers et CD8 cytotoxiques (Pardoll and Topalian, 1998; Toes et al., 1999), ce qui implique que les DC réinjectées doivent être capables de présenter les antigènes à ces deux populations. Il faut, par conséquent, tenir compte de l'accessibilité des antigènes aux bons compartiments de présentation, lors du chargement des DC *ex vivo*. L'idéal serait de pouvoir introduire des antigènes tumoraux directement *in vivo* dans des DC et de stimuler leurs propriétés activatrices de lymphocytes T.

Dans ce contexte, nous nous sommes, intéressés à la fonction de présentation antigénique des DC, aux lymphocytes T CD4 et CD8 *in vitro* et *in vivo*, afin de comprendre des mécanismes qui permettent aux DC d'acquérir les propriétés d'activation des lymphocytes T CD8.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les DC ont un potentiel énorme pour capturer des antigènes et elles expriment un grand nombre de récepteurs. Il nous est apparu essentiel de tirer profit de ce potentiel afin de confronter les DC à ce qui justifie en partie leur existence, c'est-à-dire détecter des pathogènes. Nous avons dans ce but comparé différentes formes d'antigènes et utilisé un système de transport permettant à l'antigène d'être reconnu par sa taille, par sa structure, par la possibilité d'être capturé par un récepteur précis. Ainsi, afin d'améliorer la concentration d'antigène capturé par les DC, la protection de cet antigène vis-à-vis des protéases extracellulaires, et la spécificité de reconnaissance cellulaire et moléculaire, nous avons utilisé des liposomes.

2)- Le système expérimental

L'idée de délivrer des antigènes, de manière spécifique et efficace, afin d'induire une présentation dans le contexte des molécules du CMH, est depuis longtemps investiguée. Une grande variété de systèmes de transport ayant pour objectif de concentrer, de protéger, de délivrer spécifiquement au niveau cellulaire et moléculaire ont été développés. Parmi eux, les liposomes, que nous allons présenter plus en détail. Dans cette partie, nous nous intéresserons aux propriétés des liposomes de pouvoir retenir encapsuler des antigènes, et de leur conférer une spécificité de reconnaissance.

2.1)- Les liposomes

Le terme de liposome est apparu dans les années soixante lorsqu'Alec Bangham a démontré, par études de microscopie électronique, qu'une suspension de lipides dans le milieu aqueux formait des vésicules closes (Bangham and Horne, 1964; Bangham et al., 1965). Les liposomes sont des microvésicules synthétiques, constituées de phospholipides organisés en bicouches délimitant un espace central aqueux (Figure 26A). Ils se forment spontanément dans une solution aqueuse par l'arrangement des molécules de phospholipides amphiphiles.

2.1.1)- Structure et caractéristiques

Les liposomes peuvent être constitués à partir d'une grande variété de lipides. Les plus utilisés sont les phospholipides auxquels s'additionnent fréquemment des stérols (comme le cholestérol) qui stabilisent la membrane. Les liposomes utilisés dans cette étude sont neutres et composés majoritairement de dimyristoyl phosphatidylcholine (65%) et de phosphatidyléthanolamine couplés à un haptène (le dinitrophenyl) les DNP-caproyl-phosphatidylethanolamine (DNP-cap PE) (0,5%) et enfin de cholestérol (34.5%) (Figure 26B). Les techniques de préparation des liposomes ont été très largement détaillées dans certaines revues et la technique la plus utilisée est présentée dans la figure 26C (Brandl, 2001; Gregoriadis et al., 1999).

Ces structures peuvent contenir au sein de leur bicouche des produits liposolubles et dans leur espace aqueux des molécules hydrosolubles qui seront alors protégées du milieu extérieur.

Il existe différents types de liposomes et ils peuvent être classés selon plusieurs critères. Tout d'abord, en fonction de leur taille et de leur caractère uni ou multilamellaire : 1) les vésicules multilamellaires de grande taille (400 nm à 5000 nm de diamètre) (MLV), 2) les vésicules unilamellaires de grande taille (100 nm à 2000 nm de diamètre) (LUV), 3) les petites vésicules unilamellaires (20 nm à 100 nm de diamètre) (SUV). Ensuite, en fonction des propriétés physico-chimiques des phospholipides et des autres constituants, il existe des liposomes neutres (non chargés), des liposomes anioniques (chargés négativement), des liposomes cationiques (chargés positivement), des liposomes "fluides" ou "solides" (suivant la température de transition de phase des phospholipides utilisés), des liposomes sensibles au pH, des liposomes fusiogènes (selon la composition lipidique) et enfin, pouvant être couplés à des ligands.

Dans notre cas, les liposomes constituent des vésicules neutres de transport d'antigènes et il est possible de les diriger sélectivement par un couplage avec des ligands, ce qui leur procure une spécificité envers un type cellulaire ou un type moléculaire donné.

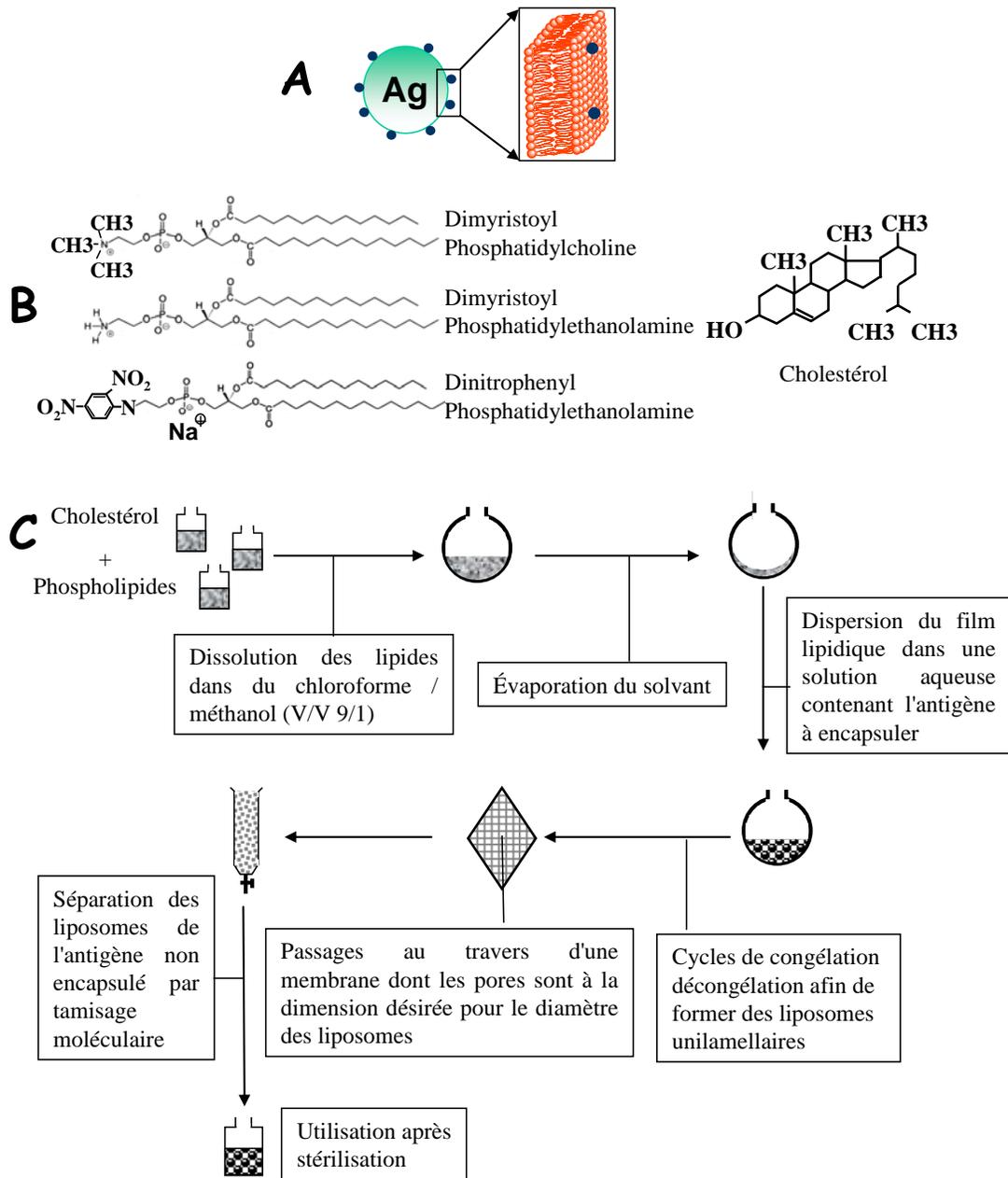


Figure 26 : Composition et formation des liposomes utilisés.

A) Représentation schématique d'un liposome.

B) Structure des phospholipides utilisés pour la préparation des liposomes.

C) Protocole de préparation des liposomes.

Copyright © 2002 Dr Karine SERRE

La structure, la stabilité et la rigidité de la bicouche des liposomes reposent sur différents paramètres physico-chimiques des phospholipides constitutifs, comme la température de transition de phase, mais aussi sur la présence de cholestérol. Ces paramètres sont extrêmement importants car ils rendent compte de l'imperméabilité des liposomes, ce qui est primordial afin qu'ils ne fuient pas. De nombreux travaux ayant été réalisés sur le sujet (Winterhalter and Lasic, 1993) nous n'aborderons que succinctement les caractéristiques des liposomes que nous avons utilisés. Par exemple, la température de transition de phase, des dimyristoyl phosphatidylcholines (constituant majoritaire) est de 45°C. Cette température rend compte de l'état physique de la membrane lipidique. En effet, si la température du milieu ambiant est inférieure à la température de transition de phase, les liposomes sont considérés comme "rigides" tandis qu'inversement, si elle est supérieure ils sont considérés comme "fluides". La stabilité des liposomes est également améliorée par la présence de cholestérol qui joue un rôle fondamental, en rigidifiant la membrane. Ceci permet de réduire la perméabilité des liposomes au voisinage de la température de transition de phase.

Enfin, la stabilité des liposomes, *in vitro* et *in vivo*, est essentielle pour une rétention correcte des produits encapsulés. D'une manière générale, il apparaît que les liposomes neutres sont les plus stables car ils interagissent moins avec les constituants du sérum qui favorisent leur déstabilisation.

2.1.2)- Interactions avec les cellules et mécanismes d'entrée

Les liposomes peuvent interagir avec les cellules par plusieurs mécanismes. En général, ils se fixent soit aspécifiquement, grâce à des interactions électrostatiques, soit, spécifiquement sur des déterminants cellulaires, grâce au couplage covalent de ligand à leur surface. Les mécanismes responsables du transfert du contenu des liposomes varient selon la charge, la composition, la taille des liposomes, mais aussi, selon le type cellulaire. Néanmoins, comme nous le verrons dans les articles, les liposomes utilisés dans cette étude interagissent très peu, de façon aspécifique, avec la membrane plasmique des cellules. Ils sont généralement internalisés par endocytose en fonction de la molécule sur laquelle ils sont ciblés. Pour conférer une spécificité aux liposomes, il suffit de leur associer un ligand, capable d'interagir avec une molécule membranaire déterminée. De nombreux ligands ont été employés par exemple, des sucres, des lectines, des hormones peptidiques, des glycoprotéines, des antigènes, des anticorps ou bien des haptènes.

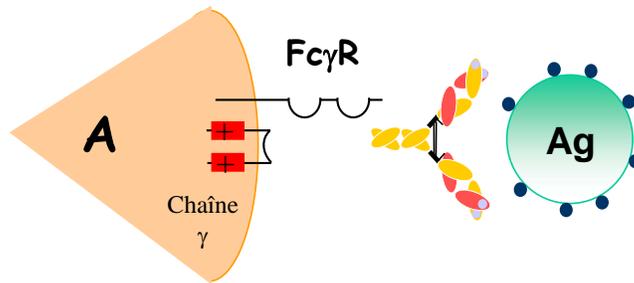
La stratégie utilisée dans le laboratoire est de coupler de façon covalente le DNP sur un groupement amine de la phosphatidyléthanolamine (DNP-cap-PE). Une chaîne polycarbonée (caproyl) permet d'une part, de ne pas altérer les propriétés de ce phospholipide et, d'autre part, de laisser cet haptène accessible en surface. Des liposomes de 200 nm de diamètre contiennent 1000 à 2000 molécules d'antigènes (HEL ou OVA), et environ 400 DNP-cap-PE, qui se répartissent de manière aléatoire vers l'intérieur ou vers l'extérieur de la membrane. Ainsi, 200 DNP-cap-PE doivent être accessibles à la surface de chaque liposome.

Les liposomes peuvent être très simplement opsonisés grâce à la présence de DNP sur leur face externe. En effet, le DNP est un haptène très utilisé en immunologie et, il existe de nombreux anticorps monoclonaux disponibles. Les liposomes, ainsi opsonisés, seront reconnus et capturés par les cellules exprimant les FcR (Figure 27A).

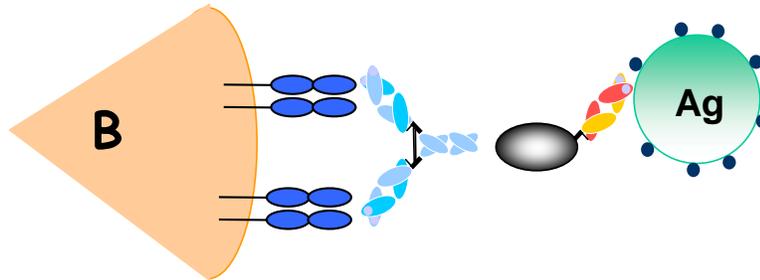
Une autre technique permet de diriger les liposomes sur n'importe quelle molécule de surface. Ils peuvent être opsonisés par des protéines chimériques formées, de la protéine A couplée de façon covalente aux portions F(ab) des anticorps spécifiques du DNP. Ces mêmes liposomes peuvent ainsi se fixer sur un déterminant, grâce à des anticorps, capables de lier la protéine A, et spécifiques d'un déterminant cellulaire (Figure 27B).

Le devenir intracellulaire de ces liposomes dépend majoritairement de la molécule sur laquelle ils sont dirigés. Nous verrons dans la partie résultat que le choix de cette molécule est d'un intérêt primordial pour notre objectif, qui est de délivrer des antigènes dans les DC afin de favoriser la présentation antigénique par les molécules de classe II et de classe I.

Comme nous le verrons dans les articles nous nous sommes attachés à comprendre les mécanismes qui permettent, à un antigène capturé de manière spécifique par les DC, d'être présenté à des lymphocytes T CD4 et CD8 *in vitro*. Nous n'avons pas voulu "forcer" ces cellules à présenter des antigènes dans le contexte classe I mais comprendre comment elles pouvaient acquérir, à un moment donné, les propriétés de stimuler des lymphocytes T CD8 et quel était le rôle des lymphocytes T CD4 dans ce processus. C'est pour cela que nous avons utilisé des liposomes neutres et sans caractéristiques particulières, mais seulement capables d'être dirigés sur un récepteur, comme le FcR qui rend compte de la capture antigénique.



Ciblage vers les récepteurs Fc γ



Ciblage vers toute molécule de la surface cellulaire par l'intermédiaire du réactif protéine A/F(ab) anti-DNP

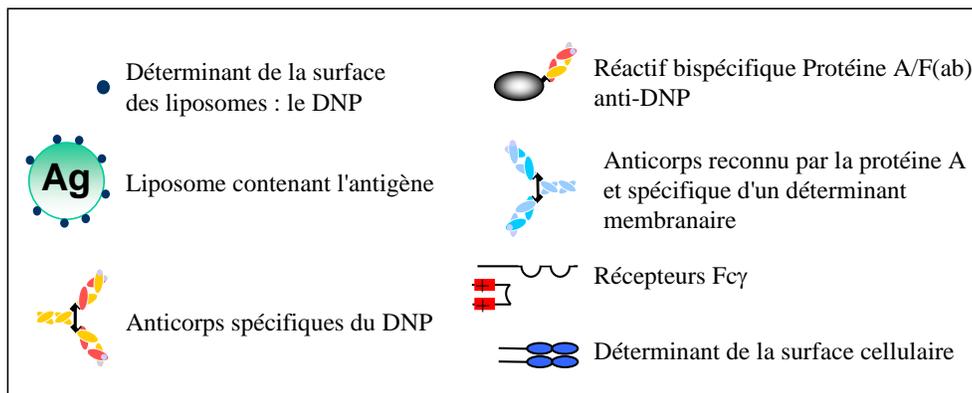


Figure 27 : Systèmes de ciblage des liposomes à la surface cellulaire.

A) Des anticorps spécifiques du DNP opsonisent les liposomes-DNP, permettant leur ciblage sur les FcR exprimés par les DC.

B) Opsonisation des liposomes grâce à un réactif bispécifique composé de la protéine A couplée aux portions F(ab) des anticorps anti-DNP. Un anticorps reconnaissant un déterminant de la surface cellulaire et capable de lier la protéine A permet alors de diriger les liposomes sur n'importe quelle molécule de surface.

Copyright © 2002 Dr Karine SERRE

2.1.3)- Devenir des liposomes injectés *in vivo*

Le devenir des liposomes *in vivo* dépend de plusieurs paramètres comme leur taille, leur charge, leur composition, la voie d'administration, et les interactions avec les composants du sérum. Nous ne ferons pas ici la liste de tous les différents types de liposomes utilisés pour comparer leur efficacité de rétention ou d'élimination, selon leur préparation. Il nous est néanmoins, apparu utile de discuter brièvement du devenir de liposomes neutres selon leur voie d'administration puisque nous les avons utilisés afin de caractériser les cellules responsables de la capture d'antigène *in vivo* après injection par voie sous cutanée.

2.1.3.1)- La circulation des liposomes injectés dans le sang

D'une manière générale, tous les liposomes injectés dans le sang, sont plus ou moins rapidement (selon leur composition) captés par le système réticuloendothélial, c'est-à-dire le foie et la rate. La majorité des liposomes (70 à 80%) s'accumulent dans les cellules de Kuppfer du foie, et une autre proportion (5 à 8%) dans les macrophages de la rate ou bien dans les monocytes circulants. L'élimination des liposomes est rapide et leur demi-vie est extrêmement courte (inférieure à deux heures).

Dans le sang, les liposomes sont très rapidement recouverts par des protéines du sérum. Elles influencent leur capture par des récepteurs, exprimés sur les macrophages et les DC (Moghimi and Hunter, 2001). Toutes les interactions qui permettent à des protéines de se lier aux liposomes sont dues à des affinités pour les phospholipides ou bien à des protéines qui s'y sont déjà fixées. Brièvement, nous pouvons citer quelques exemples d'opsonines (Patel, 1992; Semple et al., 1998). Des anticorps IgM ou IgG naturels circulants, spécifiques du cholestérol ou de certains phospholipides peuvent permettre l'élimination des liposomes par des cellules phagocytaires exprimant des récepteurs Fc. La protéine C réactive (CRP) peut se fixer sur les phosphatidylcholines qui est un des constituants des liposomes utilisés (Mi et al., 1997). C'est une protéine produite lors des phases aiguës de l'inflammation. Sa quantité peut être augmentée de plus de cent fois lors de blessure, d'infection ou d'inflammation. Elle appartient à la famille des pentraxines et peut activer la cascade du complément via la voie classique. Cette protéine C réactive, pourrait aussi être un ligand pour les FcR (Bharadwaj et al., 1999) bien que cette hypothèse soit très controversée (Saeland et al., 2001). Les protéines du complément (C3b, iC3b) sont également impliquées dans l'élimination des liposomes. D'autres protéines, comme l'albumine, la fibronectine, des apolipoprotéines, ainsi que la β 2-glycoprotéine I, peuvent aussi être responsables de leur élimination.

2.1.3.2)- La circulation des liposomes injectés en sous cutané

Lors d'une injection par voie sous cutanée les liposomes peuvent avoir trois devenir.

Tout d'abord, ils peuvent rejoindre la circulation sanguine : lors de l'injection la pression exercée sur le site est forte, et les capillaires sanguins sont endommagés. La proportion qui parvient à s'infiltrer dans la circulation sanguine semble être faible et les liposomes sont rapidement disséminés dans le foie et dans la rate. Ensuite, ils peuvent emprunter la circulation lymphatique, car ils traversent les endothéliums des vaisseaux lymphatiques. Ils gagnent ainsi les ganglions drainants où ils sont majoritairement capturés par les cellules phagocytaires. Enfin, ils peuvent rester sur le site d'injection où ils sont progressivement dégradés et éliminés par les DC et les macrophages.

Dix heures après l'injection, la situation a atteint un équilibre. Le pourcentage de liposomes (de 100 à 200 nm de diamètre) ayant rejoint le ganglion drainant est estimé à 4%, alors que 60% restent sur le site d'injection. Ceci signifie que malgré le passage de 40% des liposomes dans les voies, lymphatique et sanguine, seulement 4% semblent s'accumuler dans le ganglion drainant.

De nombreux paramètres influencent le devenir des liposomes injectés par voie sous cutanée (Oussoren and Storm, 1997; Oussoren et al., 1998). Par exemple, la taille : plus ils sont petits plus ils gagnent facilement la lymphe. Cependant, ils sont moins bien internalisés par les cellules phagocytaires (Oussoren et al., 1997). La composition des liposomes est également importante. La présence de phosphatidylsérine (PS) peut influencer leur captation dans les ganglions, probablement par les mêmes mécanismes de reconnaissance qui permettent aux cellules phagocytaires, et aux DC, de capturer les cellules apoptotiques (qui surexpriment les PS sur leur feuillet externe) (Fadok et al., 1992). L'insertion de F(ab')₂ d'anticorps spécifiques des molécules de classe II, à la surface des liposomes, permet une accumulation trois fois plus importante de ces liposomes dans les ganglions (Dufresne et al., 1999).

Néanmoins, malgré cette description des paramètres influençant la concentration des liposomes dans les ganglions, peut-être que le facteur le plus important est tout simplement la pression qui s'exerce sur le site, lors de l'injection. Lorsque la pression dans les tissus interstitiels surpasse celle des capillaires lymphatiques, les jonctions intercellulaires s'ouvrent et le liquide interstitiel s'infiltré.

Ainsi il y a deux possibilités pour la capture des liposomes par des cellules phagocytaires. La première, ils sont pris en charge sur le site d'injection. Des cellules de Langerhans, ou des DC interstitielles, ou des monocytes, ou des macrophages peuvent les capturer et ensuite migrer jusqu'aux ganglions. La seconde, ils entrent seuls dans la circulation lymphatique et sont pris en charge lors de leur entrée dans le ganglion. Nous avons vu précédemment que des DC possédant, encore, des capacités de capture d'antigènes, sont présentes dans les organes lymphoïdes.

2.1.4)- Quelles sont les cellules qui capturent les liposomes et qui initient la réponse immune ?

Les liposomes sont utilisés dans de nombreuses applications médicales thérapeutiques et préventives, aussi bien dans des modèles expérimentaux animaux que cliniques chez l'homme (pour revues voir (Gregoriadis, 1995)). Ils sont en effet utilisés dans des thérapies antimicrobiennes ou anti-cancéreuses (afin de délivrer des drogues), pour des thérapies géniques (comme vecteur d'ADN), enzymatiques ou hormonales (comme transporteur d'enzymes ou d'hormones) mais également dans des vaccins pour n'en citer que quelques exemples. Nous ne nous intéresserons qu'aux effets adjuvants des liposomes en tant que système de transport d'antigènes (Gregoriadis, 1990).

Nous avons vu précédemment que les liposomes permettaient d'induire des réponses cytotoxiques efficaces. De plus, ils peuvent également stimuler le compartiment des lymphocytes B. Les liposomes, exprimant des haptènes ou des antigènes sur leur surface, ont depuis très longtemps été montrés très efficaces pour induire la production d'anticorps spécifiques de ces déterminants (Alving et al., 1995; Richards et al., 1998). Malgré le nombre important d'études démontrant le potentiel des liposomes dans l'activation de réponses humorales ou cytotoxiques, finalement peu définissent la nature exacte des cellules qui les capturent et qui initient ces réponses.

Des liposomes neutres, contenant la toxine tétanique, génèrent une réponse cytotoxique lorsqu'ils sont injectés dans les coussinets plantaires de souris (Ignatius et al., 2000). Une analyse succincte suggère que trois jours après immunisation, les cellules responsables de la présentation aux lymphocytes T CD8, *ex vivo*, sont CD11c+. Des liposomes contenant un peptide (GP-33) du virus LCMV, injectés par voie intradermale permettent l'induction d'une très forte réponse cytotoxique. Cette réponse est protectrice contre le virus injecté dans le sang et contre le développement d'une tumeur, exprimant ce même antigène, implantée en sous cutané (Ludewig et al., 2000). Il semblerait que les cellules responsables de l'activation de lymphocytes T CD8 soient des DC sur la base de l'expression de certains marqueurs (CD11c, CD54, et CD86) et sur leur potentiel *ex vivo* à activer des lymphocytes T CD8 naïfs, spécifiques du peptide GP-33.

La plupart des travaux, dont l'objectif est de suivre les processus de migration des DC jusqu'aux ganglions, ont été réalisés en utilisant des protocoles de sensibilisation de contact sur la peau avec des agents fluorescents. Les résultats ont démontré que des cellules présentes dans la peau, les cellules de Langerhans, avaient le potentiel de migrer jusqu'aux ganglions. Néanmoins, en absence d'antigène, les fonctions effectrices de ces cellules n'ont pu être précisément appréhendées dans ces protocoles. Nous avons essayé de caractériser les cellules qui capturent les antigènes et qui interagissent avec les lymphocytes T dans le ganglion, au tout début de la réponse. Ainsi nous avons voulu développer un système permettant de caractériser et de suivre les cellules ayant capturé l'antigène afin d'analyser leur phénotype,

leur localisation et leurs fonctions en termes d'activation des lymphocytes T CD4 et CD8. C'est pourquoi nous avons utilisé des liposomes ayant deux caractéristiques simultanées. Ils sont fluorescents et contiennent un antigène. Ainsi les cellules qui les capturent deviennent fluorescentes à leur tour, et nous pouvons donc analyser leurs propriétés de présentation antigénique.

2.2)- Approche expérimentale utilisée *in vitro*

Comprendre les mécanismes d'activation des lymphocytes T CD4 par les DC et le rôle prépondérant de cette interaction CD4/DC dans la stimulation de lymphocytes T CD8 sont des étapes importantes afin de définir les meilleures stratégies vaccinales capables d'induire une immunité cytotoxique adéquate. Nous utilisons dans le laboratoire un système expérimental nous permettant d'étudier, *in vitro*, les interactions qui existent entre les DC et les lymphocytes T CD4 et CD8. Nous nous proposons d'étudier un système de transport d'antigènes, les liposomes, qui sont capturés par les DC, grâce aux FcR et permettent la présentation efficace d'antigènes dans le contexte des molécules de classe II et de classe I.

Nous avons tenté de comprendre quels étaient les mécanismes de capture, de présentation et d'activation des lymphocytes T par les DC, afin de définir la meilleure forme d'antigène capable d'activer les fonctions des DC.

2.2.1)- Les cellules présentatrices d'antigènes

Nous utilisons des cellules dérivées de la moelle osseuse, mises en culture en présence de GM-CSF (Inaba et al., 1992a). Après une semaine de culture, la majorité des cellules expriment CD11c et 33D1 et sont négatives pour DEC-205 et CD8 α . En ce qui concerne le devenir des molécules du CMH de classe II, elles sont concentrées dans les vésicules intracellulaires à l'état immature et exprimées en surface à l'état mature. Les molécules d'adhésion (ICAM-1) et de costimulation (CD80, CD86, CD40) sont également augmentées lors de la maturation par le LPS, par exemple. Enfin, il faut noter que ces cellules expriment les trois types de FcR : Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII.

Nous avons comparé les DC à d'autres cellules présentatrices d'antigènes, comme les lymphocytes B car ils expriment un récepteur spécifique à l'antigène : le BCR. Pour cela nous avons utilisé des lymphocytes B issus de souris CBA/J (H-2^k) transgéniques, dont tous les lymphocytes B expriment un BCR spécifique du lysozyme d'œuf de poule (Hen Egg Lysozyme : HEL) (Goodnow et al., 1988).

2.2.2)- Les antigènes

Dans le but de mesurer les propriétés de présentation d'antigènes exogènes de ces DC dans le contexte des molécules de classe II et de classe I, nous avons utilisé deux antigènes : le HEL une protéine de 15kDa, et l'ovalbumine (OVA) une protéine de 45kDa. Le choix s'est porté

sur ces antigènes parce que des souris transgéniques dont les lymphocytes T CD4 et CD8 sont spécifiques de ces antigènes sont disponibles, et qu'un grand nombre de réactifs ont été réalisés.

Par exemple, les peptides dérivés du HEL sont très bien définis (pour revues voir (Allen et al., 1987; Latek and Unanue, 1999)), ainsi le peptide immunodominant présenté dans le contexte des molécules de classe II IA^k est le 46-61. Il y a également d'autres peptides (18-33, 34-45, et 115-129) pour lesquels des lymphocytes T CD4 spécifiques ont été mis en évidence. De plus, il existe des anticorps monoclonaux (C4H3, Aw3.18) spécifiques du complexe IA^k/46-61 (Dadaglio et al., 1997; Zhong et al., 1997).

De même, l'OVA est bien caractérisée et présente l'avantage d'avoir des peptides connus et présentés dans le contexte des molécules de classe II I-A^b (OVA323-339 : ISQAVHAAHAEINEAGR) mais aussi de classe I H-2^b (OVA257-264 : SIINFEKL). Un anticorps monoclonal spécifique du complexe H-2K^b/SIINFEKL (25D1.16) a également été obtenu (Porgador et al., 1997).

2.2.3)- Les lymphocytes T

Afin d'identifier les événements qui conduisent les DC à présenter un antigène exogène dans le contexte des molécules de classe II et de classe I nous avons analysé leur potentiel à activer des lymphocytes T spécifiques des antigènes utilisés. Les lymphocytes T naïfs CD4 ou CD8 utilisés sont issus de souris transgéniques :

- des souris transgéniques, dont tous les lymphocytes T CD4 expriment un TCR, identique à l'hybridome 3A9 (Allen et al., 1984), spécifique d'un peptide (46-61) issu de la dégradation du HEL présenté en association avec les molécules de classe II H-2 IA^k (Ho et al., 1994).
- des souris transgéniques (OT-II), dont tous les lymphocytes T CD4 expriment un TCR spécifique d'un peptide (323-339) issu de la dégradation de l'OVA présenté en association avec les molécules de classe II H-2 I-A^b (Barnden et al., 1998).
- des souris transgéniques (OT-I), dont tous les lymphocytes T CD8 expriment un TCR spécifique d'un peptide (257-264) issu de la dégradation de l'OVA présenté en association avec les molécules de classe I H-2K^b (Hogquist et al., 1994).

2.3)- Approche expérimentale utilisée *in vivo*

Il est important de tenter de corréliser des résultats obtenus *in vitro* à une réalité existante *in vivo*. En effet, les éléments limitants des cultures *in vitro* sont qu'elles ne reproduisent pas : 1) les interactions spatiales entre les lymphocytes T et les APC qui existent *in vivo*, 2) les effets qu'une inflammation, sur un site d'infection, peuvent avoir sur le microenvironnement produisant des facteurs solubles dans le ganglion, et donc sur le développement et la qualité de l'activation des lymphocytes T d'une réponse immune.

Ainsi nous avons été désireux de visualiser d'une part, les cellules responsables de la capture d'antigènes après immunisation et d'autre part, l'activation des lymphocytes T directement *in*

vivo. Pour ce dernier cas, nous avons, choisi la technique du transfert adoptif de lymphocytes T fluorescents de spécificité connue.

Le répertoire des lymphocytes T, qui n'ont jamais été stimulés par un antigène, est de l'ordre de 25 à 100 millions de clones différents dans un individu adulte. Cependant, le nombre de lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné est extrêmement faible au sein de l'ensemble de cette population : quelques centaines seulement, ce qui représente environ de 0,01% à 0,001%. Une alternative à la faible fréquence des lymphocytes spécifiques d'un antigène *in vivo* est la méthode du transfert adoptif de lymphocytes T issus de souris transgéniques pour leur TCR de spécificité connue (Jenkins et al., 2001). Cette technique permet d'obtenir une population de lymphocytes T naïfs, et de spécificité pour un complexe CMH/peptide choisi, suffisante dans l'animal receveur, de l'ordre de 0.1-1% dans les organes lymphoïdes secondaires. Ceci permet de visualiser, *in vivo*, leur activation en réponse à un antigène. Nous avons utilisé une méthode qui permet de suivre les lymphocytes T transférés, mais aussi le nombre de divisions qu'ils ont effectué, après leur activation, grâce à un marqueur fluorescent, l'ester succinimidyle diacétate carboxyfluorescéine (CFSE) (Fulcher et al., 1996; Hodgkin et al., 1996; Lyons and Parish, 1994). Les lymphocytes transférés peuvent ainsi être analysés en réponse à différentes immunisations. Cette approche nous a permis de poser des questions sur les paramètres responsables de l'activation précoces des lymphocytes T *in vivo*.

Ces systèmes expérimentaux nous ont permis de poser des questions sur le potentiel des DC à présenter des antigènes exogènes par les molécules de classe II et par les molécules de classe I.

Nous avons montré que les DC sont tout aussi efficaces que les lymphocytes B pour présenter à des lymphocytes T CD4 qui leurs sont spécifiques, des antigènes à de très faibles concentrations dès que ces derniers sont sous formes vésiculaires et capturés par des récepteurs. L'agrégation de récepteurs est un événement important qui provoque l'activation des cellules et augmente leur potentiel à présenter des antigènes et, par conséquent favorise l'activation des lymphocytes T CD4. En effet, lorsque l'antigène est encapsulé dans des liposomes dirigés sur le BCR de lymphocytes B, 100 fM sont suffisants pour permettre la stimulation des lymphocytes T CD4. De même, dès que l'antigène est encapsulé dans des liposomes dirigés sur le Fc γ R des DC, 10 fM sont alors suffisants pour leur permettre d'activer efficacement les lymphocytes T CD4.

En ce qui concerne la présentation dans le contexte des molécules de classe I, seules les DC sont capables de présenter un antigène exogène capturé par les Fc γ R aux lymphocytes T CD8 qui lui sont spécifiques. Cependant, elles doivent avoir atteint un stade développemental particulier qui se traduit par 12 jours de culture *in vitro*. Des DC plus précoces (5 jours de culture) en revanche, ne sont pas capables de présenter un antigène exogène capturé par les Fc γ R, en association avec les molécules de classe I. Néanmoins, des lymphocytes T CD4

reconnaissant leur antigène, présenté par ces DC précoces, permettent à celles-ci d'activer des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène internalisé par les Fc γ R.

Cette présentation aux lymphocytes T CD8, induite par les lymphocytes T CD4, est dépendante du protéasome et de TAP. Le rôle des lymphocytes T CD4 serait d'induire dans les DC, le passage de l'antigène des vésicules d'endocytose vers le cytoplasme afin que des peptides puissent s'associer aux molécules de classe I naissantes, dans le réticulum endoplasmique.

Dans la continuité des expériences réalisées *in vitro*, nous nous sommes intéressés aux propriétés de présentation des DC *in vivo*. Ainsi nous montrons que la prolifération de lymphocytes T CD4 ou de lymphocytes T CD8 spécifiques d'un antigène est très dépendante de la forme de l'antigène utilisé pour les immunisations. Les liposomes sont très efficaces pour délivrer un antigène aux DC, afin qu'il soit présenté dans le contexte des molécules de classe II et des molécules de classe I. Ces résultats suggèrent que les formes d'antigènes vésiculaires, et reconnues par des récepteurs, sont particulièrement adéquates pour être prises en charge par le système immunitaire et donc par les DC, pour que ces dernières stimulent des lymphocytes T.

Nous présenterons les résultats obtenus sous la forme de quatre articles.

III)- Articles

1)- Présentation aux lymphocytes T CD4 par les cellules dendritiques *in vitro*

Comparaison des propriétés de présentation d'antigènes exogènes aux lymphocytes T CD4 par des lymphocytes B et des DC.

Article 1 : Serre, K., Machy, P., Grivel, J. C., Jolly, G., Brun, N., Barbet, J., and Leserman, L. *Efficient presentation of multivalent antigens targeted to various cell surface molecules of dendritic cells and surface Ig of antigen-specific B cells.*

Journal of Immunology, 1998. 161(11): p. 6059-67.

2)- Présentation aux lymphocytes T CD8 par les cellules dendritiques *in vitro*

Mise en évidence des processus de régulation des propriétés de présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD8 par les DC.

Article 2 : Machy, P., Serre, K., and Leserman, L.

Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fcγ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells.

European Journal of Immunology, 2000. 30(3): p. 848-57.

3)- Rôles des lymphocytes T CD4 dans l'acquisition des propriétés d'activation des lymphocytes T CD8 par les cellules dendritiques

Contrôle, par les lymphocytes T CD4, de la présentation dans le contexte des molécules de classe I par les DC.

Article 3 : Machy, P., Serre, K., Baillet, M. and Leserman, L.

Induction of MHC class I presentation of exogenous antigen by dendritic cells is controlled by CD4+ T cells engaging class II molecules in cholesterol-rich domains.

Journal of Immunology, 2002. 168: 1172-1180

4)- Présentation aux lymphocytes T CD4 et CD8 *in vivo*

Identification des cellules responsables de la capture des liposomes *in vivo* et analyse de leurs propriétés à activer des lymphocytes T CD4 et CD8.

Article 4 : Serre, K., Giraudo, L., Leserman, L. and Machy, P.

Dendritic cells efficiently capture and present antigen encapsulated in liposomes, to CD4 and CD8 T cells, in vivo.

Manuscrit en préparation, 2003.

Articles

Article 1

Serre, K., Machy, P., Grivel, J. C., Jolly, G., Brun, N., Barbet, J., and Leserman, L.

Efficient presentation of multivalent antigens targeted to various cell surface molecules of dendritic cells and surface Ig of antigen-specific B cells.

Journal of Immunology, 1998. 161(11): p. 6059-67.

1)- Présentation aux lymphocytes T CD4 *in vitro*

Préambule de l'article 1

Afin d'étudier les propriétés de présentation des DC, il nous est apparu important de comprendre ce que représente un antigène pour ces cellules. En d'autres termes, nous avons essayé de définir comment les DC perçoivent les antigènes exogènes et quels sont les mécanismes qui rendent compte de leur efficacité à présenter de très faibles quantités d'antigènes à des lymphocytes T CD4. Nous avons vu dans l'introduction que les DC ont développé de nombreux moyens qui permettent la capture des antigènes. L'acquisition par macropinocytose est un processus non spécifique, qui peut-être efficace pour des concentrations relativement élevées d'antigènes. En revanche, le ciblage des antigènes sur des récepteurs permet aux DC d'activer des lymphocytes T CD4, pour des concentrations très faibles. Dans ce contexte, nous avons comparé l'efficacité de présentation des DC avec des cellules qui sont aussi spécialisées dans la capture et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD4 : les lymphocytes B. Ces dernières expriment un récepteur spécifique à l'antigène : le BCR, qui leur permet de capturer de très faibles quantités d'antigènes pour les présenter à des lymphocytes T CD4. Si les DC sont les cellules présentatrices d'antigènes les plus performantes, elles doivent posséder des propriétés équivalentes voir supérieures de capture et d'apprêtement, pour induire l'activation des lymphocytes T CD4 naïfs.

Afin, de pouvoir appréhender les capacités de présentation d'antigènes des lymphocytes B et des DC, nous avons utilisé un système expérimental qui soit autant que possible physiologique et surtout, qui nous permette de comparer ces deux types cellulaire pour des formes d'antigènes équivalentes. Partant du principe que le système immunitaire a évolué afin d'éliminer des agents infectieux, nous avons voulu tirer profit des mécanismes développés par ces cellules pour reconnaître et internaliser les pathogènes. L'engagement de récepteurs est un événement primordial qui rend compte de la reconnaissance, de l'internalisation, de l'apprêtement des antigènes et de l'activation des cellules. Les BCR exprimés par les lymphocytes B possèdent ces propriétés et nous avons supposé que les récepteurs Fc (FcR), exprimés par les DC pouvaient jouer ces mêmes rôles. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'un système de transport d'antigènes qui soit vésiculaire, et capable à la fois de protéger de grandes quantités d'antigènes et d'agréger des récepteurs exprimés par ces cellules. Les liposomes possèdent ces propriétés, qu'ils partagent d'ailleurs avec les pathogènes (en tant que particules), mais sont dépourvus de tous mécanismes d'échappement au système immunitaire, ou de toxicité. Ces propriétés sont obtenues grâce aux nombreux haptènes (dinitrophenyl : DNP) que portent les liposomes à leur surface.

Une simple incubation avec des anticorps spécifiques du DNP, permet de les opsoniser et de les diriger sur les FcR exprimés par les DC. De même, l'utilisation de protéines chimériques,

formées de la protéine A couplée de façon covalente aux portions F(ab) des anticorps spécifiques du DNP permet, grâce à des anticorps qui fixent la protéine A et qui reconnaissent les BCR, de diriger ces liposomes sur les lymphocytes B. Les détails des systèmes de ciblage utilisés pour ces liposomes, sont schématisés dans la [figure 27](#) de ce manuscrit et dans la [figure 1](#) de l'article qui suit.

De plus, grâce à l'utilisation de lymphocytes B issus de souris transgéniques pour leurs BCR (spécifiques du HEL) nous avons pu comparer l'efficacité de ces lymphocytes B à présenter un antigène capturé sous forme monovalente (le HEL soluble, qui n'engage que quelques BCR), ou multivalente (des liposomes, contenant le HEL, dirigés sur les BCR, et qui agrègent ces derniers).

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les DC sont tout aussi efficaces que les lymphocytes B pour présenter des antigènes à de très faibles concentrations dès lors que ces antigènes sont sous formes vésiculaires et capturés par des récepteurs. L'agrégation de récepteurs est un événement important qui provoque l'activation des cellules et augmente leur potentiel à présenter des antigènes et, par conséquent favorise l'activation des lymphocytes T CD4. Néanmoins, il faut noter que les DC sont beaucoup plus "malléables" et qu'elles peuvent acquérir et présenter des antigènes qui se fixent sur des molécules ne participant pas, à priori, au processus de capture et de présentation en tant que tel, comme les molécules du CMH (non restreintes par les lymphocytes T CD4). Les stratégies de capture antigénique de ces deux types de cellules semblent donc très différentes mais en accord avec les rôles de chacune dans la mise en place de réponses immunes.

Efficient Presentation of Multivalent Antigens Targeted to Various Cell Surface Molecules of Dendritic Cells and Surface Ig of Antigen-Specific B Cells¹

Karine Serre, Patrick Machy, Jean-Charles Grivel,² Gilles Jolly, Nicole Brun, Jacques Barbet, and Lee Leserman³

To study the relation between the form of an Ag and the response to it, we compared presentation in vitro with hen egg lysozyme (HEL)-specific T cells from TCR transgenic mice of free HEL and liposome-encapsulated HEL by different APC. HEL-specific splenic B cells or bone marrow-derived dendritic cells were incubated with free HEL or HEL-containing liposomes targeted by Ab to either surface Ig, the Fc receptor, or MHC class I and II molecules. Ag presentation by HEL-specific B cells was at least 100-fold more efficient for HEL in surface Ig-targeted liposomes than free HEL taken up by the same receptor or HEL in liposomes targeted to class I or II molecules. Ag presentation by dendritic cells from Fc receptor-targeted vesicles was augmented 1,000–10,000-fold compared with free Ag or nontargeted liposomes, but presentation was also efficient when Ag was targeted to class I or II molecules. These results indicate that Ag-specific B cells and dendritic cells can be equally efficient in stimulating IL-2 production by Ag-specific T cells from unimmunized TCR transgenic mice when the Ag is multivalent and taken up by appropriate receptors. In contrast to B cells, which require engagement of surface Ig for optimal presentation, dendritic cells may present Ag by means of several different cell surface molecules. *The Journal of Immunology*, 1998, 161: 6059–6067.

B cells acquire Ag for presentation to T cells primarily via Ag-specific surface Ig (1). When Ags bear repeating determinants expressed at high density they can also activate specific B cells and may lead to differentiation and Ab production in a T-independent manner. Multivalent Ag determinants have been shown to be critical for stimulation of surface Ig of specific B cells, both in response to haptens coupled to lipid vesicles (liposomes) in the pioneering studies of Kinsky's group (2) and to membrane Ags of certain bacteria and viruses, in a T-independent manner (3). B cells can also take up and present T-dependent Ags encapsulated in liposomes (4) or associated with particles (5). Thus, surface Ig is responsible for both signaling and Ag acquisition. Although it has been reported that soluble hen egg lysozyme (HEL)⁴ binding to surface Ig up-regulates costimulatory molecules on B cells (6), the potential role of Ag multivalence in activation of Ag-specific B cells with respect to their efficiency as APC for naive T cells has not been evaluated.

Dendritic cells are thought to be the most efficient APC and as such are considered critical for the induction of immune responses (7). Lacking true Ag-specific receptors, immature dendritic cells can acquire Ags by fluid phase endocytosis and present them to T cells (8–10). This raises the question as to how an Ag is "perceived" by the dendritic cells in peripheral tissues, i.e., by what mechanisms Ag uptake induces the initiation of dendritic cell migration to secondary lymphoid organs (11) and up-regulation of costimulatory molecules (12, 13), which are events implicated in maturation of dendritic cells and necessary for their interaction with T cells. Dendritic cells express "pattern recognition receptors" (14), with affinity for repeating determinants, such as mannosyl groups, present on many bacteria (9, 15). These receptors clearly augment the efficiency of dendritic cells as APC for T cell stimulation, but the relative roles of Ag acquisition vs signals transmitted by these receptors have not been determined. Another strategy available for dendritic cells is to use the products of acquired immunity to recognize microorganisms expressing antigenic determinants identical to or cross-reactive with those for which Ab exists. The role of Fc receptor (FcR) in increasing the efficiency of presentation of opsonized Ag by dendritic cells has been reported (8, 16).

Both surface Ig and Fc γ RIII signal intracellularly use immunoreceptor tyrosine-associated motifs on cytoplasmic domains of the surface Ig-associated Ig α - and Ig β -chains and the γ -chain of Fc γ RIII (17), or closely related sequences for Fc γ RII (18), suggesting analogous downstream events following receptor engagement. We therefore investigated the role of multivalent vs monovalent Ag targeted to surface Ig of B cells and the FcR of dendritic cells, with respect to the capacity of these cells to serve as APC to HEL-specific T cells from TCR transgenic mice. We compared these molecules with MHC class I and II determinants, which are present on both cells but are not known to be receptors implicated in the uptake of exogenous Ag.

Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France

Received for publication February 19, 1998. Accepted for publication August 10, 1998.

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 These studies were supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité des Bouches du Rhône), by a contract with Inex Pharmaceuticals Corp., and by institutional grants from l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Centre National de la Recherche Scientifique. K.S. was supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. J.-C.G. was supported by a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

² Current address: Laboratory of Theoretical and Physical Biology, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Lee Leserman, CIML, Case 906, 13288 Marseille Cedex 9, France. E-mail address: leserman@ciml.univ-mrs.fr

⁴ Abbreviations used in this paper: HEL, hen egg lysozyme; FcR, Fc receptor; PA, anti-DNP, protein A anti-dinitrophenyl Ab conjugate; CF, carboxyfluorescein.

Table I. *Monoclonal Abs used in this study*

Antibody	Target	Isotype	Reference/Source
265.5	DNP	IgG1	Immunotech
U7.6.3	DNP	IgG1	Z. Eshhar, unpublished
U7.27.7	DNP	IgG2a	Z. Eshhar, unpublished
7.6 (anti-Id)	HEL-specific Ab (HH10)	IgG2a, κ	20
B1 23 2	HLA B and C	IgG2a, κ	50
H 100.5/28	H-2K ^k α 1 domain	IgG2a, κ	51
H 39.352.4	H-2 IE ^k	IgG2a, κ	52
10-2-16	H-2 IA ^k	IgG2a, κ	52
2.4G2	Fc γ RII, Fc γ RIII	Rat IgG2b	53

In this study we used HEL-containing liposomes with repeating hapten determinants on their surfaces. Results presented in this paper indicate that B cells transgenic for an anti-HEL surface Ig presented Ag much more efficiently when the protein was encapsulated in liposomes targeted to surface Ig than when HEL was free in solution. HEL encapsulated in liposomes opsonized by IgG Abs to the hapten is taken up and efficiently presented to T cells by dendritic cells via Ig FcR (Fc γ RII and/or Fc γ RIII), while HEL in nonopsonized liposomes was taken up and presented inefficiently. However, our results indicate that other cell surface molecules of dendritic cells, namely class I and class II MHC molecules, also permit efficient presentation of Ag in targeted liposomes. This is in contrast to the reduced capacity of these same molecules to serve an Ag-presenting function when B cells are used as APC. These results underline the different strategies of exclusive uptake by B cells of ligands corresponding to the specificity of their surface Ig as compared with less fastidious uptake by dendritic cells of particulate Ags with which they come into contact by means of a more varied group of cell surface molecules.

Materials and Methods

Mice

CBA/J mice transgenic for rearranged IgM and IgD Abs with variable regions derived from an Ab (HH10) with high affinity for HEL (19) were generated (20) using plasmids provided by A. Basten (Centenary Institute, Newtown, New South Wales, Australia). Characteristics of other transgenic lines made with these plasmids have been reported in detail (21). TCR transgenic mice (22), which express the same TCR as the 3A9 hybridoma (23), specific for the immunodominant HEL peptide 46–61 in the context of H-2 I-A^k, were kindly provided by M. Davis (Stanford University, Palo Alto, CA). Transgenic mice were maintained as heterozygotes backcrossed to CBA/J mice (IFFA-CREDO, L'Arbresle, France) and identified, by an ELISA for serum IgM anti-HEL for Ig transgenic mice (20) or by FACS analysis of TCR transgenic mice, as those in which a majority of peripheral blood CD4⁺ cells express V β 8.2, the family of the gene used for construction of the strain (22). Mice used were between 6 and 12 wk of age.

Cells

Dendritic cells were obtained from femur bone marrow of normal CBA/J mice cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium with 10% FCS, antibiotics, 2×10^{-5} M 2-ME, glutamine, and supernatants from NIH3T3 cells supplemented with 10–20 ng/ml murine granulocyte macrophage-CSF (24). After 3 days of culture, cells were diluted 1:1 in the same medium, and, after an additional 4–6 days of culture, plastic nonadherent cells were used as APC. At this time, the majority of these had immature dendritic cell morphology. B cells were purified by treatment of spleen cells with Abs to Thy-1, CD4 and CD8, and rabbit complement. T cells from the spleen were purified by passage over nylon wool columns, as described (25).

Antibodies

Abs used are described in Table I. The protein A-anti-DNP (PA-anti-DNP) conjugate was prepared by covalent coupling of Fab fragments of the mouse IgG1 anti-DNP mAb 265.5 (Immunotech, Marseille, France) to equimolar quantities of protein A (Pharmacia, Piscataway, NJ), modified with *N*-succinimidyl-6-maleimido caproate (Sigma, St. Louis, MO). The product was separated from multimeric conjugates and noncoupled species

on Superdex 200 columns (Pharmacia). Monoclonal IgG1 and IgG2a anti-DNP Abs were produced from hybridoma cells kindly provided by Zelig Eshhar (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). All anti-DNP Abs were purified on protein G-Sepharose (Pharmacia). Ab 7.6 is an anti-Id (20) specific for HH10, the anti-HEL Ab expressed by the transgenic B cells used in this study. Other Abs were provided by the groups that published them or by the American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Liposomes

Liposomes (80 μ mol with respect to lipids) were made from 65% (mol/mol) dimyristoyl phosphatidylcholine and 34.5% cholesterol (both from Sigma) and 0.5% DNP-caproylphosphatidylethanolamine (Molecular Probes, Eugene, OR). Liposomes were formed by exposing lipids evaporated from chloroform/methanol (9:1 v/v) to an aqueous solution containing HEL (Sigma) (10 mg/ml; 700 μ M) and 10 mM carboxyfluorescein (CF) (Molecular Probes) in PBS. For some experiments, liposomes of the same composition were made in CF/PBS or PBS alone. Following repeated cycles of freezing and thawing, liposomes were formed by extrusion (Extruder; Lipex Biomembranes, Vancouver, British Columbia, Canada) (26) through polycarbonate filters of 200-nm pore size (Corning Costar, Oneonta, NY) at 45°C, followed by gel filtration over Sepharose 4B columns (Pharmacia) to eliminate unencapsulated solute. Lipid vesicles were sterilized by filtration through 0.45 μ m filters (Gelman, Ann Arbor, MI). Different HEL concentrations in lipid vesicles were obtained by dilution of this stock solution. HEL levels were confirmed by fluorescence of dilutions of free and liposome-entrapped CF with reference to the stock solution of HEL and CF used for liposome preparation. Use of ¹²⁵I-labeled HEL has confirmed that the fraction of encapsulated CF accurately reflects passive HEL entrapment (4). The internal volume of the liposomes used is about 4.2×10^{-18} liters, so at 700 μ M Ag used, each liposome contains about 1750 HEL molecules.

Tests of Ag presentation

A schematic of the liposomes, the PA-anti-DNP conjugate, and the protein A-binding Ab that are used to target determinants other than the FcR is presented in Fig. 1A. Direct opsonization of the same liposomes by anti-DNP Abs, used to target the FcR, is presented in Fig. 1B. Twenty thousand (or as specified) B or dendritic cells were distributed in wells of 96-well flat-bottom microtiter plates (Costar, Cambridge, MA) in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS, 2×10^{-5} M 2-ME, glutamine, and antibiotics. Tenfold dilutions from the above stock solutions of free HEL or DNP liposomes containing HEL were added to the wells together with the PA-anti-DNP conjugate and/or Abs at a final concentration of 5 μ g/ml. In some experiments, a washing step separated the exposure of cells to Ag and Abs or liposomes. Cells and Ags were incubated overnight at 37°C in a total volume of 100 μ l, after which 20,000 T cells from transgenic or normal mice were added and incubated for an additional 48 h in a total volume of 110 μ l. At this time, the concentration of IL-2 in supernatant fluids was determined by adding them to IL-2-dependent CTLL cells (10,000 cells/well). Following a 16-h incubation, proliferation of CTLL was assessed by measurement of radiolabeled thymidine incorporation into DNA at the end of an additional 8-h incubation in the presence of 0.5 μ Ci [³H]thymidine. For studies of T cell proliferation, dendritic cells were irradiated (2000 rads) before Ag addition and [³H]thymidine incorporation by T cells during an 8-h period measured following 96-h exposure to APC. All points are the means of duplicate determinations.

Flow cytofluorometry

Dendritic cells or B cells were incubated on ice with unlabeled or fluorescein-modified Abs (5 μ g/ml), the PA-anti-DNP conjugate (5 μ g/ml), and/or fluorescent or nonfluorescent liposomes corresponding to an HEL concentration of 100 nM before fixation. Analyses were performed on a FACScan using Lysis II and CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Results

Ag presentation by B cells is maximal for multivalent ligands targeted to surface Ig

Ag presentation to transgenic T cells was evaluated using B cells from anti-HEL transgenic or nontransgenic CBA/J mice as APC (Fig. 2). HEL was either free in solution or encapsulated in hapten-bearing liposomes. B cells from nontransgenic mice were unable to present Ag in either free or lipid vesicle-encapsulated form at HEL concentrations below 100 nM (1.5 μ g/ml; Fig. 2A). As expected,

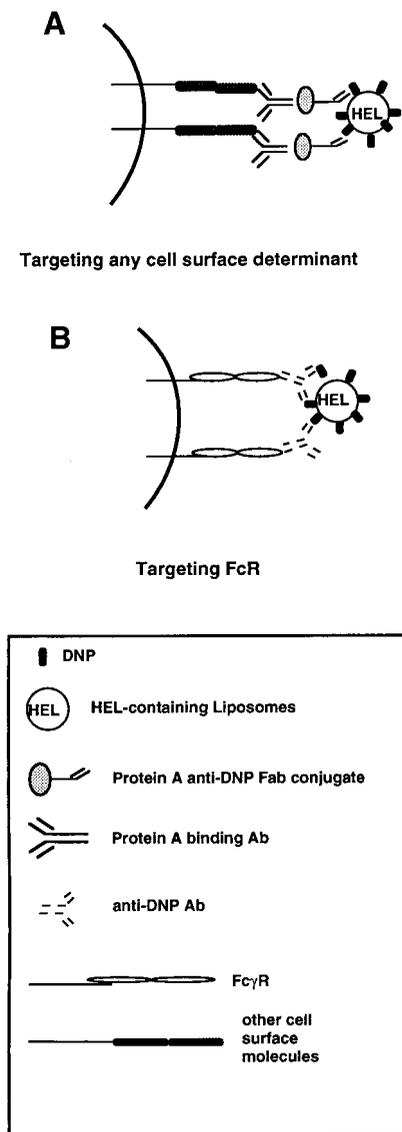


FIGURE 1. Schematic of the DNP-bearing liposome-Ab complexes used in this study. *A*, Targeting determinants other than the FcR with a PA-anti-DNP conjugate and protein A-binding Abs. *B*, Targeting the FcR by direct opsonization of the same liposomes with anti-DNP Abs.

B cells from anti-HEL Ig transgenic mice efficiently presented soluble HEL at concentrations as low as 10 pM (Fig. 2*B*). HEL encapsulated in liposomes was only slightly more efficiently presented by these transgenic mice than by nontransgenic mice in the absence of a cell-targeting Ab. Since HEL-specific B cells presented free HEL at 100-fold lower concentrations, this indicates that maximal leakage of HEL from lipid vesicles did not exceed 1% of the encapsulated Ag. Anti-hapten Fab coupled to protein A permitted targeting liposomes to surface IgM and IgD of Ig transgenic mice via the protein A binding anti-Id Ab 7.6 (20). In this situation, HEL in liposomes was presented at concentrations that never exceeded 1 pM HEL, a concentration 100-fold less than that required for presentation of free HEL directly taken up by the HEL-specific surface Ig and 100,000-fold less than free HEL or HEL in liposomes taken up by nonspecific B cells (Fig. 2*A*). The increased presentation of HEL in ligand-bearing liposomes, as compared with a monovalent HEL bound to the same receptor, could be related to increased delivery of the HEL into specialized intracellular compartments, up-regulation of costimulatory mole-

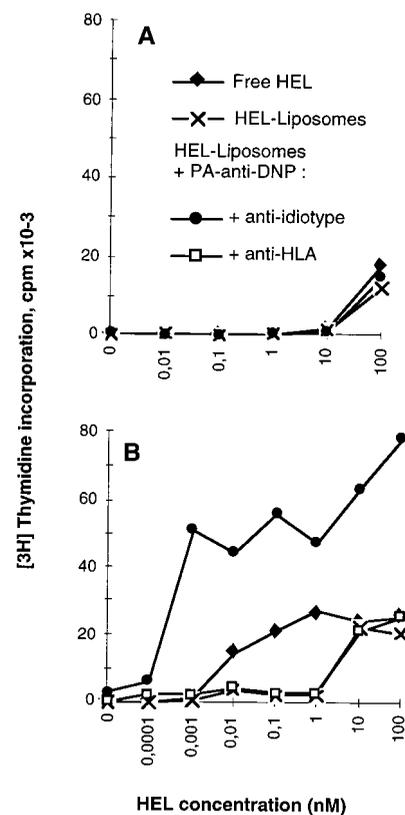


FIGURE 2. Advantage of multivalent Ag for presentation of HEL by transgenic B cells to transgenic T cells. Twenty thousand purified B cells from normal mice (*A*) or mice transgenic for anti-HEL Ig (*B*) were incubated overnight with various concentrations of HEL free in solution or encapsulated in DNP-bearing liposomes in the presence of a PA-anti-DNP Fab conjugate (5 μ g/ml), together with an anti-Id Ab specific for the transgenic B cell receptor or an isotype-matched control Ab specific for HLA, at 5 μ g/ml. Twenty thousand T cells from mice transgenic for an HEL-specific TCR were then added. The results correspond to proliferation of CTLL cells incubated in supernatants from duplicate wells obtained after an additional 48-h incubation of APC and T cells. These are data from an experiment representative of five performed.

cles due to the cross-linking of surface Ig, and/or an increased quantity of HEL in liposomes associated with the cells. Two series of experiments were performed to attempt to differentiate these possibilities.

To determine the effects of cross-linking of surface Ig, we incubated B cells in the cold with medium alone or with different concentrations of free HEL and then washed the cells. We then incubated them with the 7.6 anti-Id alone; with the 7.6 anti-Id and PA-anti-DNP complexes; or with the 7.6 anti-Id, PA-anti-DNP, and a fixed concentration of empty DNP-bearing liposomes overnight before the addition of transgenic T cells. The results are presented in Fig. 3. Responses to B cells incubated with HEL and then washed were comparable with responses without a washing step (data not shown). When cells were subsequently incubated with the 7.6 anti-Id a marked response was noted at an Ag concentration 100-fold lower than for cells incubated by Ag alone. This response was slightly increased by the addition of the PA-anti-DNP complex and was not further increased when DNP-bearing empty liposomes were added. No increased response was seen for liposomes in the presence of a control Ab, and no response at all seen for empty anti-Id targeted liposomes in the absence of free HEL. Thus, a fixed Ag dose was presented more efficiently when the surface Ig to which it bound was cross-linked. However, when

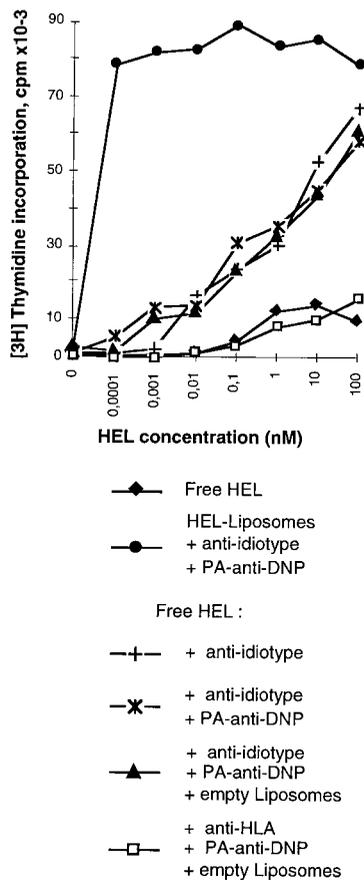


FIGURE 3. Effects of cross-linking surface Ig on Ag presentation. Twenty thousand B cells were incubated in the cold in medium alone or with various concentrations of free HEL, washed, and then incubated overnight with the 7.6 anti-Id alone (5 $\mu\text{g/ml}$), with the 7.6 anti-Id and PA-anti-DNP Fab conjugate (5 $\mu\text{g/ml}$), or with the 7.6 anti-Id, PA-anti-DNP Fab conjugate and a concentration of empty DNP-bearing liposomes identical to the number of liposomes sufficient to attain a concentration of 10 nM HEL, if the liposomes had contained Ag. Twenty thousand HEL-specific T cells were then added. The results correspond to proliferation of CTLL cells incubated in supernatants from duplicate wells obtained after an additional 48-h incubation of APC and T cells. These are data from one experiment representative of three performed.

targeted liposomes contained Ag the response was at plateau levels for Ag concentrations 100 times lower. Since induction of costimulation induced by cross-linking of surface Ig would be expected to be the same under conditions in which empty or HEL-containing liposomes were used, our results may be explained by a surface Ig-signaling-dependent modification of HEL presentation.

To evaluate the effects of the quantity of cell-associated Ag and the context in which it is perceived, we compared liposomes targeted to surface Ig by an anti-Id with protein A-binding Abs specific for other cell surface determinants. These were incubated with transgenic B cells in the presence of DNP-bearing liposomes and PA-anti-DNP. Incubation with HEL in liposomes targeted to either the MHC class II I-E^k molecule not involved in peptide presentation for this TCR or to the class I H-2K^k molecule also augmented HEL presentation by 100-fold, i.e., to the same level as that observed for free HEL taken up via surface Ig, but at least 100-fold less efficient than Ag in liposomes targeted to surface Ig (Fig. 4A), while differences in binding of liposomes to these different determinants were minor (Fig. 4B). Ag targeted by an Ab to the I-A^k

molecule was not presented, since this Ab is present in excess during the experiment and blocks recognition of the I-A^k-HEL peptide complex recognized by the TCR. Ag targeted to H-2K^k or I-E^k was presented with the same efficiency whether transgenic or nontransgenic B cells were used (data not shown). Thus, the advantage for Ag presentation for HEL in liposomes targeted to surface Ig may not be explained only by increased Ag binding.

Ag presentation by dendritic cells when multivalent Ags are targeted to the IgG FcR

Dendritic cells are known to be excellent APC and are also known to have active fluid phase endocytosis (10). This endocytic activity is presumably related to the APC function, but few studies have compared presentation of Ag taken up by fluid phase or receptor-mediated processes. Dendritic cells were incubated with HEL or DNP-bearing liposomes in the absence of cell-targeting Abs or in the presence of IgG1 or IgG2a monoclonal anti-DNP Abs, together with HEL-specific T cells. Results for IgG1 are presented in Fig. 5A. Neither free HEL nor lipid vesicle-encapsulated HEL was as efficient for T cell stimulation at 10 μM , at least 1000-fold less than free HEL or nontargeted lipid vesicles. The anti-DNP Abs had no effect when HEL-containing liposomes were made without DNP on their membranes, or when DNP-bearing liposomes were made without encapsulated HEL (data not shown). The IgG FcR dependence of presentation mediated by the anti-DNP Ab was shown by the absence of efficient presentation in the presence of Fab (or F(ab')₂, data not shown) fragments of the IgG1 Ab and by inhibition of presentation of liposomes incubated with IgG1 (or IgG2a, not shown) by preincubation with the anti-Fc γ R Ab 2.4G2 (Fig. 5B). In parallel experiments, HEL in liposomes opsonized by intact anti-DNP Abs was not presented by B cells (data not shown), consistent with the inability of the B cell isoform of the FcR to take up Ag (28).

The ability of the anti-DNP Abs to mediate liposome-encapsulated Ag presentation by dendritic cells correlated with liposome binding to the cells. This depended on multivalent interaction with the Abs (Fig. 5C). Binding of fluorescence-labeled anti-DNP Abs was low in the absence of DNP-bearing liposomes. Their binding increased markedly in the presence of nonfluorescent DNP liposomes. The binding and presentation mediated by the 265.5 IgG1 Ab was similar to that of U7.6.3, an independently derived monoclonal IgG1 anti-DNP Ab (data not shown). Similar patterns of binding were seen when we used nonfluorescent anti-DNP Abs and DNP-bearing fluorescent liposomes (data not shown). Inhibition by 2.4G2 of binding of liposomes to the cells mediated by IgG1 and IgG2a Abs (Fig. 5) correlated with inhibition of Ag presentation via those isotypes (data not shown). Since Ab 2.4G2 is specific for Fc γ R II/III (29), all of the FcR-mediated binding and presentation are due to targeting to one or both of these receptors. The homologue of the high affinity (CD64) Ig FcR reported to be present on dendritic cells from human blood (30, 31) consequently does not appear to participate in the uptake of Ag by mouse dendritic cells derived from bone marrow under these culture conditions.

Ag presentation by dendritic cells is also efficient for multivalent ligands targeted to several cell surface determinants other than the FcR

The above results indicate that the FcR can play a role for dendritic cells analogous to that of surface Ig for B cells. In contrast to the

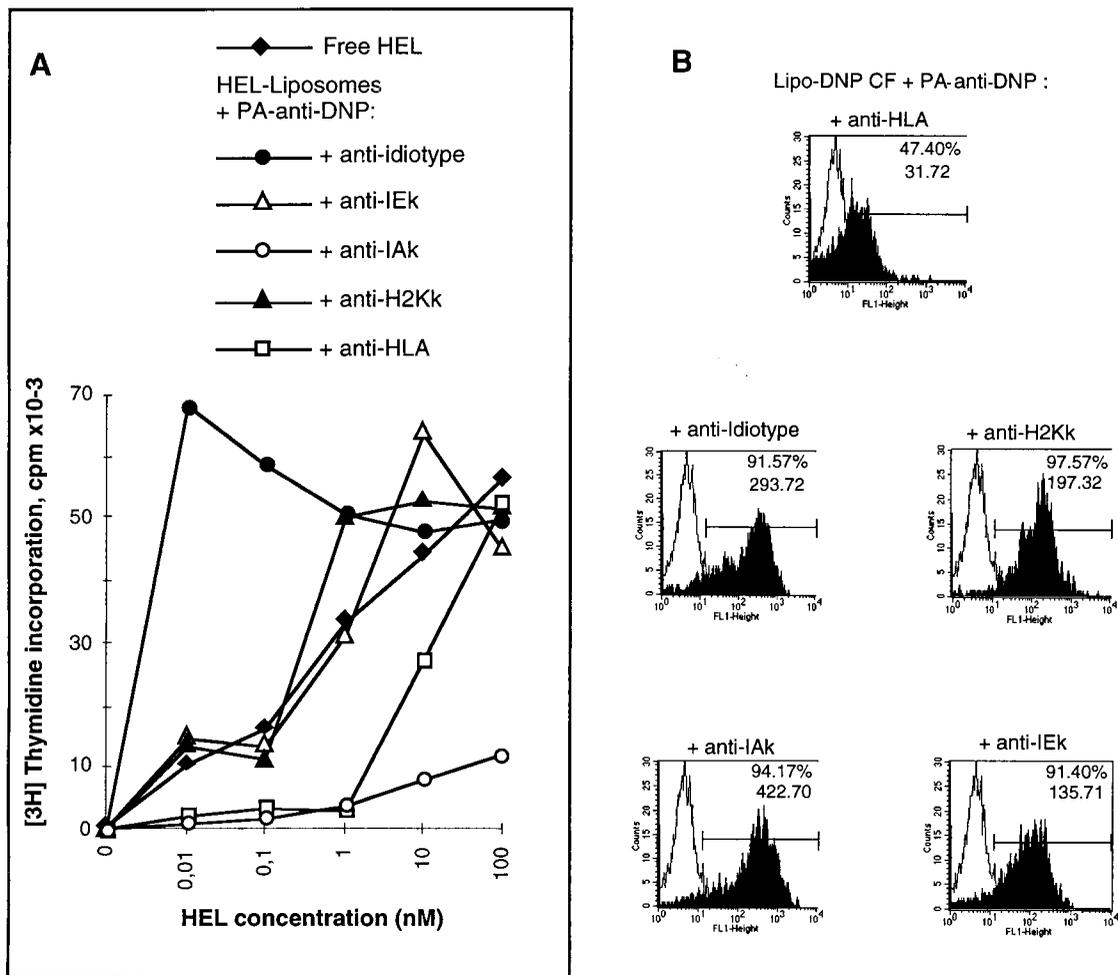


FIGURE 4. Multivalent Ag targeting to surface Ig of transgenic B cells generates the most efficient stimulus for IL-2 production by T cells. *A*, Purified B cells from mice transgenic for anti-HEL Ig were incubated overnight with various concentrations of HEL, free in solution or encapsulated in DNP-bearing liposomes together with an anti-Id Ab specific for the transgenic B cell receptor, or isotype-matched Abs specific for H-2K^k, I-E^k, I-A^k, or control HLA (5 μ g/ml), in the presence of the PA-anti-DNP Fab conjugate (5 μ g/ml). Transgenic T cells were added and assayed as in Fig. 2. These data are from a representative experiment of three. *B*, FACS profiles of purified transgenic B cells from the above mice alone (open silhouettes) or with DNP-bearing CF containing liposomes (Lipo-DNP CF) in the presence of a PA-anti-DNP Fab conjugate and the Abs specific for the molecules indicated in *A*. Profiles for 3000 cells are presented. The figures within the FACS profiles refer to the percentage of cells positive for the fixation of the liposomes and the mean fluorescence of that population.

situation for B cells, increased Ag presentation by dendritic cells was also seen when the PA-anti-DNP conjugate was used for targeting together with anti-class I (H-2K^k) or II (I-E^k) Abs (Fig. 6*B*); a separate experiment targeting I-E^k is presented in Fig. 6*A*. As for the situation with B cells, Ag presentation was not seen when the restricting I-A^k molecule was targeted (Fig. 6*B*). The anti-Fc γ R Ab 2.4G2 did not inhibit presentation of Ag delivered in the presence of protein A-bearing Abs (data not shown). Thus, dendritic cells are not efficient APC for HEL present free in solution or in neutral liposomes at biologically relevant concentrations (~150 ng/ml) but may present Ag to T cells about as efficiently as Ag-specific B cells (15–150 μ g/ml), provided that the Ag makes multivalent contact with the cell. The same class I and II molecules that were inefficient for Ag presentation when expressed on B cells were more efficient when dendritic cells were targeted.

IL-2 production by transgenic T cells correlates with their proliferation

We asked whether the more efficient Ag presentation by dendritic cells for FcR targeted as compared with nontargeted Ag correlated

with a more efficient Ag presentation by each cell, thus reducing the number of APC required. The number of dendritic cells necessary for the stimulation of IL-2 production by transgenic T cells was evaluated as a function of the mode of Ag acquisition. Variable numbers of irradiated dendritic cells were incubated with 10 nM free or 1 nM liposome-encapsulated Ag targeted by intact or Fab fragments of an IgG1 anti-DNP Ab. As few as 1000 dendritic cells generated a plateau level of IL-2 production when the FcR was targeted, whereas 10 times more dendritic cells were required for plateau stimulation of T cells at a 10-fold higher concentration of free Ag. Dendritic cells incubated under conditions of optimal Ag stimulation but in the absence of transgenic T cells failed to produce any factor capable of stimulating [³H]thymidine incorporation by CTLL cells (Fig. 7*A*).

The production of IL-2 and the subsequent proliferation of T cells may be dissociated, if, for example, the amount of IL-2 produced is insufficient to support proliferation, or if the T cell is incompletely activated and does not up-regulate IL-2 receptors. However, our results demonstrate that the optimal conditions for induction of IL-2 production by responding transgenic T cells correlated with conditions for optimal stimulation of their directly

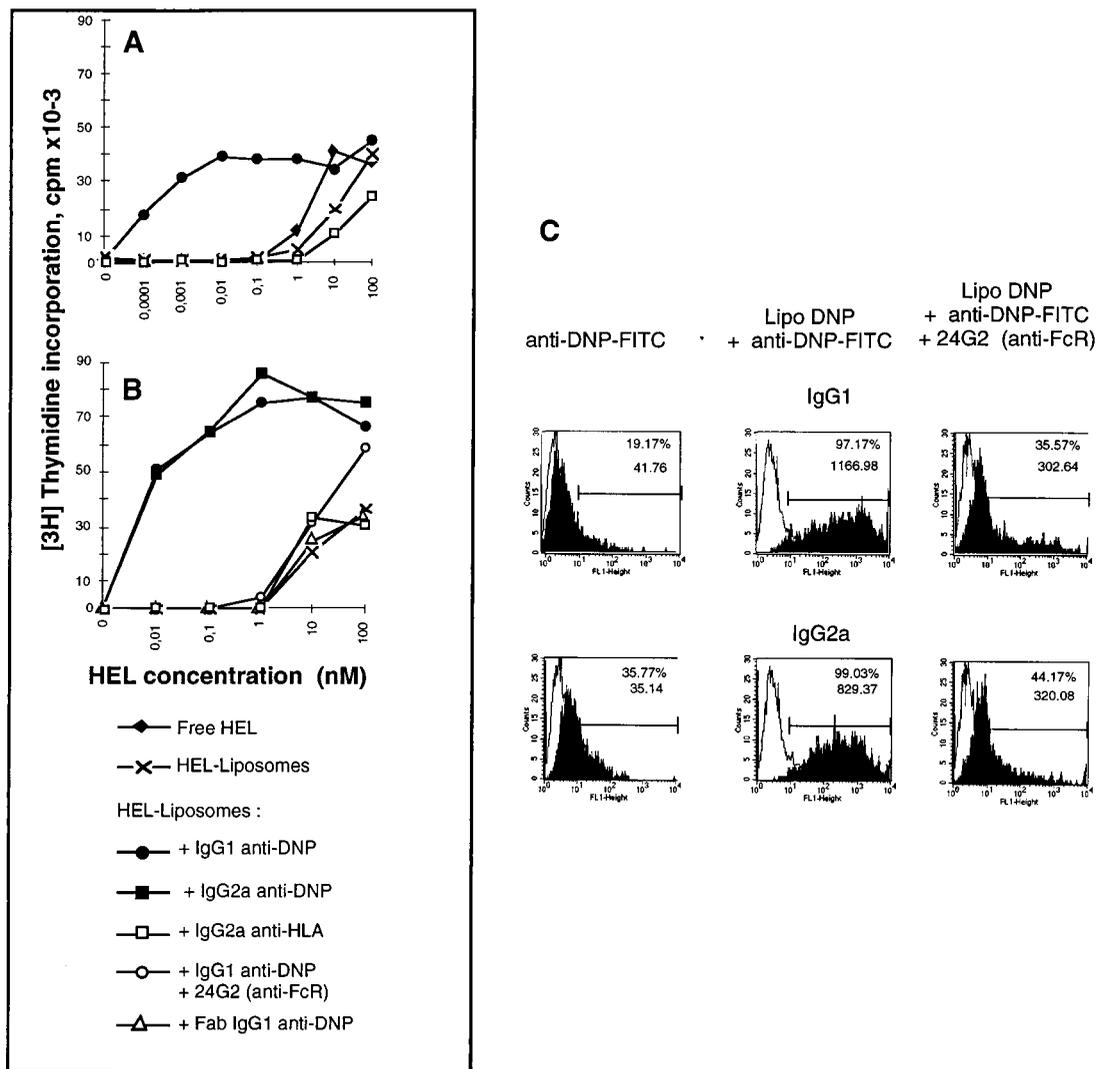


FIGURE 5. Efficiency of the IgG FcR for presentation of liposome-encapsulated Ag by dendritic cells. *A*, 15,000 dendritic cells obtained after culture of bone marrow for 7 days in the presence of granulocyte macrophage-CSF were incubated overnight with various concentrations of HEL, free in solution or encapsulated in DNP-bearing liposomes in the presence of anti-DNP Ab of the IgG1 isotype, or a control Ab specific for HLA at 5 μ g/ml. T cells were added and assays were performed as described in Fig. 2. These are data from a representative experiment of more than 10 for IgG1 and free HEL. *B*, Dendritic cells as above were incubated overnight with various concentrations of HEL encapsulated in DNP-bearing liposomes with anti-DNP Abs of the IgG1 or IgG2a isotype, with anti-DNP Abs of the IgG1 isotype in the presence of the anti-FcR Ab 2.4G2 or in the presence of a Fab fragment of the IgG1 anti-DNP Ab. Data are representative of three experiments. *C*, FACS profiles of dendritic cells alone, with FITC-labeled Abs to DNP (5 μ g/ml) alone, with DNP-bearing nonfluorescent liposomes (sufficient to contain 100 nM HEL) in the presence of FITC-labeled IgG1 or IgG2a DNP-specific Abs (5 μ g/ml) to opsonize these liposomes, or with these liposomes and Abs together with the anti-FcR Ab 2.4G2 (20 μ g/ml). Profiles for 3000 cells are presented. Data are representative of three analyses. The open silhouettes represent cells alone (*left*) or cells and FITC-modified anti-Id, as control (*middle and right*). Percentage of positive cells and mean fluorescence are indicated as for Fig. 3.

measured [³H]thymidine incorporation after a period of culture extended to 4 days (Fig. 7*B*).

Discussion

We compared the presentation of soluble and liposome-encapsulated Ag by dendritic and B cells. DNP-bearing liposomes were opsonized by anti-DNP Abs for studies of interaction with Fc receptors (Fig. 1*B*). Alternatively, the use of these liposomes with PA-anti-DNP Fab conjugates permitted intact protein A-binding Abs to be oriented correctly toward other target molecules (Fig. 1*A*) while simultaneously blocking association with Fc receptors (32). Liposomes of the type used in this study are consequently models for infectious agents, which may interact with any of a number of cell surface determinants via multivalent ligands (13),

and which contain multiple copies of Ag behind the barrier of a membrane or capsule. In the present experiments, each liposome expresses more than 1500 DNP molecules, permitting a high density of targeting ligands, based on DNP binding by intact anti-DNP Abs to dendritic cells or by PA-anti-DNP conjugates to other determinants on B cells or dendritic cells.

Differences in stimulation of Ag-specific T cells will depend on the consequences of interaction between Ag, or the liposome in which it is entrapped, and the particular APC surface molecule to which the Ag is targeted. These will be determined by 1) the density of the target molecules; 2) the signals generated by binding of Ag to the receptor; 3) the rate and extent of their endocytosis; 4) the quantity of the Ag delivered; and 5) the intracellular fate of the Ag, including degradation and access to class II molecules. Intact

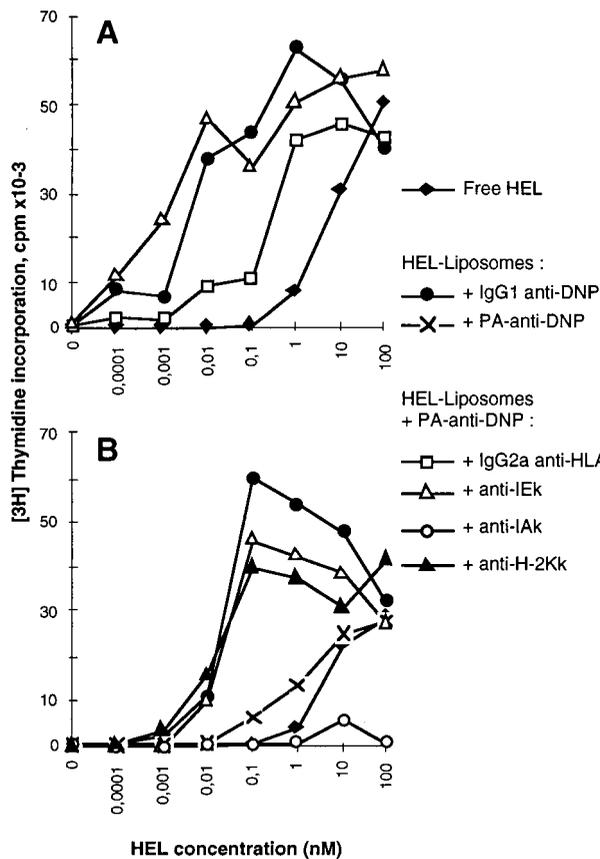


FIGURE 6. Multivalent targeting to several different dendritic cell surface molecules results in efficient T cell production of IL-2. *A*, Dendritic cells were incubated overnight with various concentrations of HEL, free in solution or encapsulated in DNP-bearing liposomes together with an IgG1 anti-DNP Ab, or with a PA-anti-DNP Fab conjugate and IgG2a Abs specific for H-2K^k, I-E^k, I-A^k, or control HLA. Transgenic T cells were added and assayed as in Fig. 2. Data from two representative experiments of four performed are presented. *B*, As in *A*, except that the control consists of HEL liposomes and the PA-anti-DNP Fab conjugate incubated in the absence of a targeting Ab.

monovalent Ag has been shown to be able to permit transgenic B cells to stimulate transgenic T cells bearing the same TCR as those used in the present study, at comparable Ag concentrations (6, 22). This monovalent form of Ag presentation by B cells is shown in the short term in vitro studies performed here to be much less efficient for stimulation than the same quantity of Ag bound to surface Ig that is subsequently cross-linked by Ab or empty liposomes. This difference for the same target molecule and APC is consistent with modulation of signals that are transmitted by surface Ig as a consequence of cross-linking, as has already been demonstrated in studies in which mutated Ig α or Ig β molecules associated with surface Ig on B cells were transfected into myeloma or lymphoma cells (33, 34). However, cross-linking of surface Ig in the presence of a fixed amount of bound free HEL increased Ag presentation to a much lesser extent than when liposomes bound to surface Ig contained HEL (Fig. 3). HEL is passively entrapped within the aqueous spaces of these liposomes and presumably behaves like free HEL when released in cells. This is in contrast to experiments in which Ags have been covalently hapten modified for binding to anti-hapten surface Ig (35, 36) or directly bound to anti-Ag Abs for targeting purposes. These may alter Ag processing, or result in modification of their presentation, depending on the site on the Ag to which the Ab binds (37, 38). In

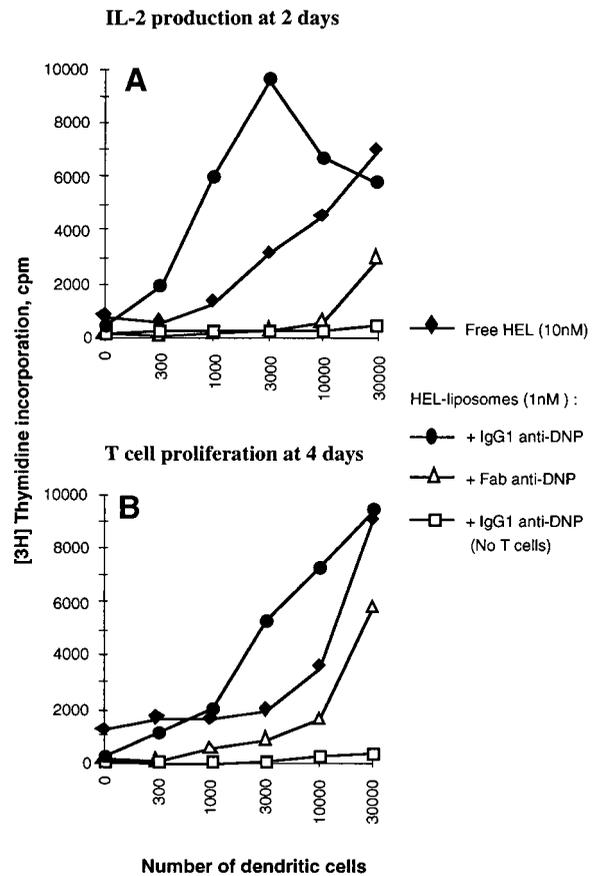


FIGURE 7. IL-2 production by transgenic T cells correlates with their proliferation. *A*, Various numbers of dendritic cells were incubated as in Fig. 4, except that they were irradiated (2000 rads) before exposure to Ag. They were incubated with HEL or HEL-containing, DNP-bearing liposomes at various concentrations together with IgG1 anti-DNP Ab or a Fab fragment of that Ab. T cells were not added to one series of dendritic cells incubated with liposomes and intact Ab. IL-2 production was evaluated by the incorporation of [³H]thymidine by CTLL cells starting at 48 h after addition of T cells. *B*, For studies of proliferation, [³H]thymidine incorporation by T cells (or of dendritic cells incubated alone) was measured directly after 96 h of exposure to APC.

other experiments we have studied Ag presentation to T hybridomas specific for the 46–61 determinant, which requires extensive processing for presentation and is associated primarily with newly synthesized class II molecules, as well as T hybridomas specific for peripheral peptides included within the sequence of HEL, which are presented by recycling class II molecules. These results indicate that HEL in liposomes behaves like free HEL when taken up by fluid phase endocytosis and shares the markedly enhanced presentation of HEL when targeted to surface Ig, whatever the peptide specificity of the hybridoma.⁵ There is thus no evidence that a specialized processing compartment is required for release of liposome-entrapped Ag.

It has been estimated that fewer than 300 HEL peptide-IA^k complexes may activate class II- plus peptide-specific T cell hybridomas (39), whereas about 1 HEL molecule in 750 taken up by fluid phase endocytosis by lymphoma cells generated I-A^k-associated peptides recognized by a hybridoma with the same TCR as that expressed by our TCR transgenic T cells (40). Although naive

⁵ F. Forquet, N. Barois, P. Machy, J. Trucy, V. S. Zimmermann, L. Leserman, and J. Davoust. Submitted for publication.

transgenic T cells are reported to require a somewhat higher number of class II-peptide complexes for IL-2 production than primed T cells or hybridomas (41), the efficiency of class II association of Ag taken up by a receptor on APC may permit this level of peptide binding to be achieved at low external Ag concentrations, as suggested by the present studies. The efficiency of this process will also depend on the form of the Ag. Each liposome used here contains hundreds of HEL molecules, so that surface Ig targeted by anti-Id will internalize much more Ag than the two HEL molecules in free form taken up by the same receptor. Thus, the internalization of Ag in monovalent form could be considered as an "analogue" event, with the Ag dose internalized linearly with increasing numbers of receptors engaged, whereas internalization of multivalent Ag is a "quantal" event, in which one or only a few liposomes may contain sufficient Ag to induce a response, if delivered into a suitable compartment. This is an appropriate response in nature, in which quanta of Ag will normally be contained within infectious organisms. However, this sensitivity is manifest only in the context of cross-linking of surface Ig. Indeed, targeting of liposomes and the same PA-anti-DNP conjugates to I-E^k or H-2K^k, of which the density of expression on B cells is comparable with that of surface Ig, resulted in Ag presentation to a level not greater than that seen for the uptake of soluble HEL by anti-HEL surface Ig. This strongly suggests that binding of Ag to these molecules does not result in signaling that permits up-regulation of costimulatory molecules and access of Ag to class II-containing compartments. The recent development of Abs specific for HEL peptide-IA^k conjugates (40, 42) will permit quantification of the actual I-A^k association of Ag presented in monovalent or multivalent forms targeted to different cell surface molecules.

Several studies have emphasized the endocytic capacities of dendritic cells (9, 10). The liposomes we use are small enough to be taken up by fluid phase endocytosis. Free HEL and nontargeted liposome-encapsulated HEL were presented by dendritic cells equally well at equivalent Ag concentrations, ruling out any protective effect of the liposome membranes with respect to Ag processing. The presentation by dendritic cells of Ag associated with phagocytosis of micrometer-sized latex particles has been shown to be orders of magnitude more efficient than uptake of the same Ag in solution (43). Nonrecognition of the 200 nm DNP-bearing neutral liposomes used here in the absence of a targeting ligand permitted an unambiguous evaluation of the role of defined receptors in the uptake process. These lipid vesicles could be used to bind intact anti-DNP Ab, resulting in Ag presentation by IgG FcR-bearing dendritic cells. Stimulation of Ag-specific T cells by liposome-encapsulated HEL targeted to the FcR of dendritic cells by anti-DNP Abs required 1000-fold less Ag than when the cells were exposed to free HEL or nonopsonized liposomes containing HEL. Ag delivered by liposomes opsonized by PA-anti-DNP conjugates in the presence of Abs specific for class I or nonrestricting class II molecules on dendritic cells also resulted in presentation of Ag, resulting in IL-2 production at low Ag concentrations. This contrasts with the reduced efficacy of Ag presentation from liposomes targeted via class I and II molecules on B cells, as compared with surface Ig-targeted liposomes. The fact that we targeted identical class I and II molecules on B and dendritic cells rules out any possible effects of the affinity of receptor-ligand interactions on processing of the liposome-encapsulated Ag. On the other hand, this study compares B cells directly obtained from the spleen with dendritic cells maintained in culture. The phenotype of cultured dendritic cells may change rapidly, with down-regulation of Fc receptors and up-regulation of class II molecules, although the culture conditions used here are reported to maintain an immature

phenotype (44). The respective roles of different dendritic cell surface molecules in Ag presentation *in vivo* remain to be tested.

B cells derived from mice in which the class II-associated invariant chain has been deleted cannot present class II-restricted Ag, while dendritic cells from the same mice present these Ags normally (24). These results indicate that Ag-processing pathways of dendritic and B cells differ. Recent studies indicate that cross-linking of surface Ig may alter intracellular transport of class II molecules and increase its association with endosomal compartments to which Ag is transported by surface Ig (45, 46). The experiments reported here suggest that Ags targeted to surface Ig on B cells are efficiently presented as a consequence of alteration of transport induced by Ig cross-linking. The FcR serves a similar role on dendritic cells, but its participation appears less predominant for dendritic cells than that of surface Ig for B cells. The function of dendritic cells as "sentinels" exposes them to infection by numerous microorganisms. This parasitism of APC is useful for host defense, provided that the act of entering the dendritic cell results in T cell activation. The capacity of dendritic cells to present Ags that cross-link molecules, including MHC class I and II molecules that are not nominal cell surface Ag receptors, may counter the potential use of these molecules as receptors by microorganisms. While the presence of immunoreceptor tyrosine-associated motifs in molecules associated with both surface Ig on B cells and the FcR of dendritic cells suggests common downstream pathways potentially responsible for both efficient presentation and activation (47), the mechanisms permitting Ag presentation or activation via other molecules on dendritic cells remain to be determined.

The question as to whether B cells can initiate immune responses, or are better or worse as APC for T cells than dendritic cells, has been long posed. Early studies indicating that B cells cannot initiate responses are based on experiments in which surface Ig is not stimulated at all, as when exogenous or constitutive peptides are presented (48, 49). Subsequent studies indicated that this presentation defect could be partially overcome by monovalent Ag (22). In the present study the efficiency of Ag presentation by B cells the surface Ig of which was targeted by multivalent Ag was further augmented by orders of magnitude. Furthermore, our data indicate that contact with multivalent Ag may be as important for Ag presentation by dendritic cells as it is for Ag-specific B cells. Thus, these results suggest that when access to Ag is assured, Ag-specific B cells and dendritic cells may have equivalent capacity for Ag presentation to Ag-specific CD4⁺ T cells. In fact, presentation of Ag from relevant pathogens may be a cooperative process between B cells and dendritic cells under physiologic conditions, since by secreting Ab into the circulation, B cells can permit dendritic cells to identify Ag via their Fc receptors. The requirement that Ab pre-exist to promote processes that augment production of Abs of equivalent specificity does not necessarily pose a dilemma because of the neonatal availability of IgG Ab of maternal origin, as also suggested by others (31). Maternal Ab will permit dendritic cells to present environmental Ags, increasing the frequency of Ag-specific T cells and compensating for the rarity of Ag-specific B cells.

Acknowledgments

We thank Delphine Palet for technical assistance; Eric Rouvier for help in preparing the PA-anti-DNP conjugates; Aïssa Loucif, Michel Pontier, and Gilles Warcollier for animal care; and Jean Davoust, Sylvie Guerder, Philippe Naquet, and Anne-Marie Schmitt-Verhulst for critical reading of the manuscript.

References

- Lanzavecchia, A. 1985. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314:537.
- Yasuda, T., G. F. Dancey, and S. C. Kinsky. 1977. Immunogenic properties of liposomal model membranes in mice. *J. Immunol.* 119:1863.
- Bachmann, M. F., H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1995. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur. J. Immunol.* 25:3445.
- Grivel, J.-C., K. Crook, and L. Leserman. 1994. Endocytosis and presentation of liposome-associated antigens by B cells. *ImmunoMethods* 4:223.
- Vidard, L., M. Kovacsics-Bankowski, S. K. Kraeft, L. B. Chen, B. Benacerraf, and K. L. Rock. 1996. Analysis of MHC class II presentation of particulate antigens of B lymphocytes. *J. Immunol.* 156:2809.
- Lenschow, D., A. Sperling, M. Cooke, G. Freeman, L. Rhee, D. Decker, G. Gray, L. Nadler, C. Goodnow, and J. Bluestone. 1994. Differential upregulation of the B7-1 and B7-2 costimulation molecules after Ig receptor engagement. *J. Immunol.* 153:1990.
- Guéry, J.-C., F. Ria, and L. Adorini. 1996. Dendritic cells but not B cells present antigenic complexes to class II-restricted T cells after administration of protein in adjuvant. *J. Exp. Med.* 183:751.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179:1109.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389.
- Steinman, R., and J. Swanson. 1995. Commentary: the endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182:389.
- De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.* 184:1413.
- Larsen, C. P., S. C. Ritchie, T. C. Pearson, P. S. Linsley, and R. P. Lowry. 1992. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J. Exp. Med.* 176:1215.
- Larsen, C. P., S. C. Ritchie, R. Hendrix, P. S. Linsley, K. S. Hathcock, R. J. Hodes, R. P. Lowry, and T. C. Pearson. 1994. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J. Immunol.* 152:5208.
- Medzhitov, R., and C. A. Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9:4.
- Jiang, W., W. Swiggart, C. Heuffer, M. Peng, A. Mirza, R. Steinman, and M. Nussenzweig. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151.
- Maurer, D., E. Fiebiger, C. Ebner, B. Reininger, G. F. Fischer, S. Wichlas, M.-H. Jouvin, M. Schmitt-Egenolf, D. Kraft, J.-P. Kinet, and G. Stingl. 1996. Peripheral blood dendritic cells express Fc ϵ RI as a complex composed of Fc ϵ RI α - and FcR1 γ -chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J. Immunol.* 157:607.
- Cambier, J. 1996. Antigen and Fc receptor signaling: the awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J. Immunol.* 155:3281.
- Daeron, M. 1997. Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15:203.
- Smith-Gill, S. J., T. B. Lavoie, and C. R. Mainhart. 1984. Antigenic regions defined by monoclonal antibodies correspond to structural domains of avian lysozyme. *J. Immunol.* 133:384.
- Grivel, J. C., P. Ferrier, N. Renard, G. Jolly, T. Jarry, and L. Leserman. 1993. Rapid induction of anti-idiotypic responses to unmodified monoclonal antibodies from syngeneic mice following primary immunization. *J. Immunol. Methods* 158:173.
- Goodnow, C. C., J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Wotherspoon, R. H. Loblay, K. Raphael, R. J. Trent, and A. Basten. 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334:676.
- Ho, W., M. Cooke, C. Goodnow, and M. Davis. 1994. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 179:1539.
- Allen, P. M., D. J. Strydom, and E. R. Unanue. 1984. Processing of lysozyme by macrophages: identification of the determinants recognized by two T-cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2489.
- Rovere, P., V. S. Zimmermann, F. Forquet, D. Demandolx, J. Trucy, P. Ricciardi-Castagnoli, and J. Davoust. 1998. Dendritic cell maturation and antigen presentation in the absence of invariant chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1067.
- Machy, P., J. Barbet, and L. D. Leserman. 1982. Differential endocytosis of T and B lymphocyte surface molecules evaluated with antibody bearing fluorescent liposomes containing methotrexate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4148.
- Hope, M. J., M. B. Bally, G. Webb, and P. R. Cullis. 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* 812:55.
- De Bruijn, M., J. Nieland, C. Harding, and C. Melief. 1992. Processing and presentation of intact hen egg-white lysozyme by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 22:2347.
- Amigorena, S., C. Bonnerot, J. Drake, D. Choquet, W. Hunziker, J. Guillet, P. Webster, C. Sautes, I. Mellman, and W. Fridman. 1992. Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 256:1808.
- Daeron, M., C. Bonnerot, S. Latour, and W. H. Fridman. 1992. Murine recombinant Fc γ RIII, but not Fc γ RII, triggers serotonin release in rat basophilic leukemia cells. *J. Immunol.* 149:1365.
- Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder, and P. M. Guyre. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc γ receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 157:541.
- Fanger, N. A., D. Voigtlaender, C. Liu, S. Swink, K. Wardwell, J. Fisher, R. F. Graziano, L. C. Pfefferkorn, and P. M. Guyre. 1997. Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc γ RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 158:3090.
- Tony, H. P., and A. Schimpl. 1980. Stimulation of murine B cells with anti-Ig antibodies: dominance of a negative signal mediated by the Fc receptor. *Eur. J. Immunol.* 10:726.
- Flaswinkel, H., and M. Reth. 1994. Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig- α protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *EMBO J.* 13:83.
- Patel, K. J., and M. S. Neuberger. 1993. Antigen presentation by the B cell antigen receptor is driven by the α/β sheath and occurs independently of its cytoplasmic tyrosines. *Cell* 74:939.
- Rock, K. L., B. Benacerraf, and A. K. Abbas. 1984. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med.* 160:1102.
- Watanabe, M., D. R. Wegmann, A. Ochi, and N. Hozumi. 1986. Antigen presentation by a B-cell line transfected with cloned immunoglobulin heavy- and light-chain genes specific for a defined hapten. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5247.
- Watts, C., and A. Lanzavecchia. 1993. Suppressive effect of antibody on processing of T cell epitopes. *J. Exp. Med.* 178:1459.
- Simitsek, P. D., D. G. Campbell, A. Lanzavecchia, N. Fairweather, and C. Watts. 1995. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J. Exp. Med.* 181:1957.
- Harding, C. V., and E. R. Unanue. 1990. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 346:574.
- Dadaglio, G., C. A. Nelson, M. B. Deck, S. J. Petzold, and E. R. Unanue. 1997. Characterization and quantitation of peptide-MHC complexes produced from hen egg lysozyme using a monoclonal antibody. *Immunity* 6:727.
- Kimachi, K., M. Croft, and H. M. Grey. 1997. The minimal number of antigen-major histocompatibility complex class II complexes required for activation of naive and primed T cells. *Eur. J. Immunol.* 27:3310.
- Zhong, G., C. R. E. Sousa, and R. N. Germain. 1997. Production, specificity, and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide-major histocompatibility complex class II complexes formed by processing of exogenous protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13856.
- Shen, Z., G. Reznikoff, G. Dranoff, and K. L. Rock. 1997. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* 158:2723.
- Winzler, C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V. S. Zimmermann, J. Davoust, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185:317.
- Barois, N., F. Forquet, and J. Davoust. 1997. Selective modulation of the major histocompatibility complex class II antigen presentation pathway following B cell receptor ligation and protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 272:3641.
- Siemasko, K., B. J. Eisfelder, E. Williamson, S. Kabak, and M. R. Clark. 1998. Signals from the B lymphocyte antigen receptor regulate MHC class II containing late endosomes. *J. Immunol.* 160:5203.
- Bonnerot, C., V. Briken, and S. Amigorena. 1997. Intracellular signaling and endosomal trafficking of immunoreceptors: shared effectors underlying MHC class II-restricted antigen presentation. *Immunol. Lett.* 57:1.
- Fuchs, E. J., and P. Matzinger. 1992. B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 258:1156.
- Croft, M., D. D. Duncan, and S. L. Swain. 1992. Response of naive antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *J. Exp. Med.* 176:1431.
- Rebã, N., and B. Malissen. 1983. Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies. *Tissue Antigens* 22:107.
- Lemke, H., G. J. Hämmerling, and U. Hämmerling. 1979. Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the major histocompatibility complex and by the Qa/TL region in mice. *Immunol. Rev.* 47:175.
- Pierres, M., F. Kourilsky, J. P. Rebouah, M. Doretto, and D. Caillol. 1980. Distinct epitopes on I k gene products identified by monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 10:950.
- Unkeless, J. C. 1979. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J. Exp. Med.* 150:580.

Discussion de l'article 1

La notion de récepteur est extrêmement importante et sera une sorte de "leitmotiv" tout au long de l'analyse et de l'interprétation de ces résultats. Les DC, tout comme les lymphocytes B, peuvent présenter des antigènes à des concentrations de l'ordre du femtomolaire lorsque celui-ci est contenu dans une vésicule et reconnu par des récepteurs appropriés. L'avantage obtenu grâce aux liposomes contenant l'antigène et capturé par les FcR exprimés par les DC ou les BCR exprimés par les lymphocytes B, permet de diminuer de 10000 fois la quantité d'antigène, comparativement au même antigène sous forme soluble.

Présentation par les lymphocytes B

Des lymphocytes B issus de souris sauvages (sans spécificité pour le HEL), sont très peu efficaces pour présenter un antigène capturé par macropinocytose, puisque de très fortes quantités sont nécessaires (1000 nM) pour induire l'activation de lymphocytes T CD4 spécifiques de cet antigène. Néanmoins, dès que l'antigène soluble est potentiellement capturé par le BCR de lymphocytes B issus de souris transgéniques (dont leur BCR reconnaît le HEL), 1 nM est alors suffisant pour permettre à ces lymphocytes B d'activer ces mêmes lymphocytes T CD4. Enfin, lorsque l'antigène est encapsulé dans des liposomes dirigés sur le BCR de ces lymphocytes B, 10 à 100 fM sont alors suffisants pour permettre la stimulation des lymphocytes T CD4.

Des expériences complémentaires réalisées en collaboration avec l'équipe de Jean Davoust au CIML, nous ont permis de montrer que le BCR entraîne son ligand antigénique dans un compartiment de la voie d'endocytose, accessible aux molécules de classe II nouvellement synthétisées et dépendantes de la chaîne invariante (Zimmermann et al., 1999)^T. De plus, l'engagement du BCR induit une accumulation des molécules de classe II nouvellement synthétisées dans un compartiment contenant la molécule H-2M et le BCR internalisé. Ces structures correspondraient à des compartiments de chargement en peptides des molécules de classe II. Le BCR joue donc un double rôle, qui rend compte de l'efficacité de la présentation des antigènes qu'il internalise d'une part, en concentrant les antigènes dans un compartiment de chargement en peptides et d'autre part, en induisant, vraisemblablement par l'intermédiaire d'une signalisation intracellulaire via les chaînes Ig α et Ig β , l'accumulation des molécules de classe II dans ce même compartiment. Il a été montré par d'autres équipes, que le complexe BCR, associé aux chaînes Ig α et Ig β , se recycle naturellement et constitutivement dans ces compartiments de chargement en peptides. Cependant, son engagement provoque une

^T Zimmermann, V. S. Rovere, P. Trucy, J. Serre, K. Machy, P. Forquet, F. Leserman, L. Davoust, J. *Engagement of B cell receptor regulates the invariant chain-dependent MHC class II presentation pathway*. Journal of Immunology, 1999, 162, 2495-02

internalisation et une concentration très rapide de l'antigène dans ces compartiments (Brown et al., 1999; Cheng et al., 1999).

Non seulement, le BCR a un rôle primordial dans les phénomènes de concentration de l'antigène dans des compartiments dédiés à la présentation antigénique, mais il participe aussi à l'activation des lymphocytes B, grâce aux motifs ITAM présents sur les chaînes, $Ig\alpha$ et $Ig\beta$, associées aux BCR (Teh and Neuberger, 1997). Nous avons vérifié que le degré d'engagement des BCR se corrèle directement au niveau d'activation des lymphocytes B, et par conséquent à leur efficacité de stimulation des lymphocytes T CD4. Ainsi, le HEL sous forme soluble n'induit pas d'influx calcique dans les lymphocytes B ni d'augmentation des molécules de costimulation comme CD86. En revanche, un anticorps qui agrège les BCR, de façon plus importante que le HEL, provoque un fort influx calcique et entraîne l'augmentation d'expression de CD86 (résultats non montrés).

L'efficacité de l'antigène encapsulé dans des liposomes ciblés sur le BCR, comparé au même antigène sous forme soluble, s'explique donc par des aspects quantitatifs à la fois car les liposomes vont permettre l'internalisation d'une plus grande quantité d'antigènes, et aussi parce qu'ils vont induire une activation des lymphocytes B plus importante. Nous allons voir que ces mêmes conclusions peuvent s'appliquer aux DC, par l'engagement des FcR.

Présentation par les cellules dendritiques

En absence de reconnaissance spécifique, les DC sont légèrement plus efficaces que les lymphocytes B issus de souris sauvages pour présenter des antigènes sous forme soluble, suggérant que leur activité de macropinocytose est plus importante. Toutefois, de fortes quantités sont nécessaires (10 nM) pour induire l'activation des lymphocytes T CD4. Cependant, dès que l'antigène est encapsulé dans des liposomes dirigés sur le FcR des DC, 1 à 10 fM sont alors suffisants pour permettre à ces DC d'activer efficacement les lymphocytes T CD4.

Des expériences complémentaires (qui ne sont pas exposées dans ce manuscrit) nous ont permis de mieux comprendre pourquoi les liposomes capturés par les FcR sont aussi efficaces pour permettre la présentation des antigènes qu'ils contiennent aux lymphocytes T CD4. Tout d'abord, le chlorure d'ammonium (NH_4Cl), qui augmente le pH intracellulaire des compartiments de la voie d'endocytose, inhibe très fortement la présentation de l'antigène contenu dans les liposomes ciblés sur les FcR. Ceci suggère que lorsque l'antigène est internalisé grâce aux FcR, il suit la voie d'endocytose où il est dégradé à pH acide pour que des peptides s'associent aux molécules de classe II. Nous avons d'ailleurs vérifié par des expériences de microscopie confocale, que des liposomes fluorescents opsonisés, sont concentrés dans des compartiments de chargement en peptides, riches en molécules de classe II et H-2M. Il est intéressant de noter qu'il peut aussi y avoir ségrégation des molécules

impliquées dans la présentation antigénique (CMH classe II et H-2M) et des ligands des FcR (liposomes fluorescents opsonisés). Les DC possèdent, en effet, des vésicules contenant les ligands des FcR, mais dépourvues de molécules de classe II et de H-2M, qui pourraient correspondre à des compartiments de stockage où l'antigène est soumis à une faible dégradation (Inaba et al., 2000; Lutz et al., 1997). Nous verrons dans les articles exposés ultérieurement, que ces compartiments méritent certainement une analyse plus précise, car ils pourraient jouer un rôle important dans le processus de présentation dans le contexte des molécules de classe I.

Tout comme l'engagement du BCR provoque l'activation des lymphocytes B, l'engagement des FcR provoque l'activation des DC (Regnault et al., 1999; Shen et al., 2001). Les liposomes opsonisés agrègent les FcR et provoquent l'augmentation par les DC des molécules de classe II, d'adhésion (ICAM-1), de costimulation (CD80, CD86). L'activation des DC lors de l'agrégation des Fc γ R est induite par les motifs ITAM qui sont présents sur les chaînes α de ces récepteurs, ou bien sur les chaînes associées, comme nous l'avons vu dans l'introduction. Ceci explique pourquoi les DC sont aussi efficaces pour présenter des concentrations d'antigènes de l'ordre du femtomolaire aux lymphocytes T CD4. En parallèle, nous avons également vérifié que l'activation des lymphocytes T CD4 était très fortement inhibée en présence d'anticorps bloquants, spécifiques des molécules de costimulation CD80 et CD86, tout comme avec ceux spécifiques des molécules CD4 et de classe II du CMH.

Grâce à une collaboration avec l'équipe de J. Sijf Verbeek, qui nous a fourni des souris déficientes en Fc γ RII et Fc γ RIII, nous avons étudié le potentiel de trois isotypes (IgG1, IgG2a, IgG2b) à être reconnus par les Fc γ R exprimés par les DC. Ainsi, des liposomes opsonisés par des anticorps spécifiques du DNP, IgG1 et IgG2b, sont essentiellement reconnus par les récepteurs Fc γ RII et Fc γ RIII, alors que les anticorps IgG2a sont reconnus par les trois types de récepteurs Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII. Non seulement, ces différents isotypes permettent la capture des antigènes contenus dans les liposomes, mais de plus, ils facilitent leur présentation aux lymphocytes T CD4. Ne disposant pas encore des souris spécifiquement déficientes en chacune de ces trois classes de récepteurs, nous n'avons pu poursuivre plus avant la caractérisation des fonctions associées à chacun d'eux.

Enfin, désireux de vérifier que l'efficacité des liposomes n'était pas uniquement due à un aspect quantitatif où tout simplement des quantités plus importantes d'antigènes se fixent sur les cellules indépendamment des molécules reconnues, nous avons dirigé les liposomes sur les molécules du CMH de classe II (non restreintes par les lymphocytes T CD4) et de classe I. Ainsi, les lymphocytes B sont très contraints et ne présentent très efficacement que les antigènes qu'ils capturent par leur BCR. Les antigènes, dirigés sur les molécules du CMH de

classe II ou de classe I, ne sont pas présentés plus efficacement que le même antigène sous forme soluble, reconnu par le BCR.

Les DC, au contraire, présentent tout aussi efficacement des antigènes qu'elles capturent par le FcR ou par les molécules du CMH. Il est difficile de dire si ces résultats représentent, ou non, une réalité physiologique. Pour cela il serait nécessaire : 1) de caractériser le devenir intracellulaire des antigènes, en fonctions des molécules qui les ont capturés, 2) d'analyser l'état d'activation des DC, 3) d'étudier le devenir des lymphocytes T CD4 activés.

Conclusions

Ces résultats suggèrent que les DC ont évolué pour reconnaître des pathogènes ou des antigènes sous forme vésiculaires, et qu'elles ont développé des récepteurs capables d'assurer cette fonction. Afin de tirer profit de ce potentiel, il semble important que les formulations d'antigènes tiennent compte de deux paramètres. Le premier est que les formes solubles ne sont pas présentées de manière adéquate car peu d'antigène est internalisé. Le second est qu'il est important d'activer la DC pour favoriser son potentiel de présentation et de stimulation des lymphocytes T. Néanmoins, il est favorable que ces deux paramètres soient combinés par la formulation d'antigène elle-même. En effet, lorsque les DC sont incubées avec l'antigène sous forme soluble, en présence de LPS, leur efficacité n'est que faiblement augmentée.

Idéalement, les préparations doivent donc combiner ces deux aspects, c'est-à-dire délivrer une grande quantité d'antigène (comme lors de l'internalisation de pathogènes), et agréger un récepteur rendant compte à la fois de la présentation antigénique et de l'activation de la cellule. L'identification de nouveaux récepteurs ayant, ces propriétés, peut s'avérer importante pour le développement de nouvelles préparations vaccinales.

Article 2

Machy, P., Serre, K., and Leserman, L.

Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fcγ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells.

European Journal of Immunology, 2000. 30(3): p. 848-57.

2)- Présentation aux lymphocytes T CD8 *in vitro*

Préambule de l'article 2

La présentation aux lymphocytes T CD8, d'antigènes exogènes dans le contexte des molécules de classe I, est un phénomène nécessaire qui est responsable de la mise en place de réponses immunes protectrices contre des agents infectieux intracellulaires ou contre le développement de tumeurs. En revanche, elle peut être néfaste lors de la rupture de la tolérance périphérique qui conduit à l'émergence de maladies auto-immunes. Pour ces raisons, il est important d'une part, d'identifier les cellules capables de présenter des antigènes exogènes dans le contexte des molécules de classe I, et d'autre part, de comprendre les mécanismes régulant cette présentation.

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, la présentation par les molécules de classe I nécessite un devenir intracellulaire de l'antigène totalement différent de celui qui permet la présentation par les molécules de classe II. Il est possible que les mécanismes responsables de l'association de peptides dérivés d'antigènes exogènes avec les molécules de classe I, soient extrêmement régulés, compte tenu des dangers que pourraient représenter une activation plus "aléatoire" des lymphocytes T CD8.

Tout comme nous nous sommes intéressés aux propriétés de présentation des DC dans le contexte des molécules de classe II, nous avons étudié leur habilité à présenter diverses formes d'antigène dans le contexte des molécules de classe I. De façon tout à fait parallèle aux études exposées dans l'article 1, nous avons comparé les DC aux lymphocytes B pour leur capacité à stimuler cette fois-ci des lymphocytes T CD8. Nous avons utilisé diverses formes d'antigènes, c'est-à-dire solubles (protéiques ou peptidiques), ou vésiculaires quand l'antigène est encapsulé dans des liposomes ciblés sur des récepteurs ou des molécules exprimées par ces cellules. Nous avons donc essayé de définir comment les DC perçoivent les antigènes exogènes et quels sont les mécanismes qui rendent compte de leur efficacité à présenter de très faibles quantités à des lymphocytes T CD8.

Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fc γ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells

Patrick Machy, Karine Serre and Lee Leserman

Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, Marseille, France

We evaluated MHC class I- and II-restricted presentation of exogenous antigen by mouse bone marrow-derived dendritic cells (DC) and splenic B cells. DC presented to class I-restricted transgenic T cells femtomolar concentrations of antigens from liposomes targeted to the IgG Fc receptor. Targeting these liposomes to surface immunoglobulin did not permit B cells to stimulate class I-restricted responses. Nevertheless, both DC and B cells presented antigen from liposomes targeted to these same receptors with equivalent efficiency to class II-restricted T cells. Acquisition of the capacity to present class II-restricted antigens required shorter periods of differentiation of DC than presentation of exogenous class I-restricted antigens. The latent period for class I-restricted presentation of exogenous antigen by DC could not be shortened by exposing them to lipopolysaccharide, double-stranded RNA or antibody to CD40. Class I presentation depended on expression of the TAP1 transporter. Our data are consistent with the existence of a regulated transport process present in DC which can convey exogenous antigen from endocytic vesicles to the cytosol.

Key words: Antigen presentation / Dendritic cell / B cell / Fc receptor / Liposome

Received	9/9/99
Revised	29/11/99
Accepted	30/11/99

1 Introduction

CD8⁺ CTL play a major role in protection against intracellular infection. Infected cells are killed by CTL specific for peptides from the infectious agent. Presentation of peptides requires both their production by the target cell and their association with MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum in a manner dependent on proteasomes and the transporter associated with Ag presentation (TAP) [1]. Induction of CTL usually requires interaction with professional APC in lymphoid tissues. These APC present Ag in the context of both MHC class II molecules, to stimulate CD4⁺ T helper cells, and class I to stimulate CD8⁺ precursors of the CTL [2]. These APC need not be infected, but may acquire exogenous Ag in the form of dead cells, cellular debris or defective infectious particles. Uptake of exogenous Ag is well understood for class II presentation but there are gaps in

our knowledge of the mechanisms of recognition and passage into the cytosol of exogenous Ag which become class I restricted, a process called "cross-priming" (reviewed in [3–5]). Ag acquired from non-hematopoietic cells by cross-priming also associated with class I molecules in a proteasome- and TAP-dependent manner after uptake by APC [6]. Since it is important for the immune system to be able to respond as quickly as possible to an infectious threat, characteristics expected for APC responsible for initiating both class II- and class I-associated responses include an efficient means for recognizing Ag to be taken up for presentation, and an efficient means for transferring this Ag to the cytosol for proteolysis and TAP transport.

B cells efficiently take up and induced responses of naive CD4⁺ T cells to soluble [7] as well as particulate [8] Ag expressing determinants for which their slg are specific. One report indicates that, in addition to augmenting class II presentation, binding of Ag to specific slg permitted B cells to augment presentation of Ag in the context of class I and to stimulate CD8⁺ T hybridoma cells [9]. However, specific B cells must survive in order to proliferate and synthesize Ab. Since efficient presentation by B cells to CTL precursors is likely to result in their elimi-

[1 20099]

Abbreviations: **ICAM:** Intercellular adhesion molecule **CF:** Carboxyfluorescein **DC:** Dendritic cell(s) **TAP:** Transporter associated with antigen presentation **HEL:** Hen egg lysozyme **PA-anti-DNP:** Protein A-anti-DNP Fab

nation by the CTL they induce, their behavior as APC would appear to be in conflict with the requirements of their function as B cells. We therefore re-evaluate in this study the capacity of B cells to cross-present exogenous Ag taken up by their slg. Alternatively, B cells can act indirectly in the process of Ag uptake, by virtue of their capacity to secrete IgG after receiving T cell help. This Ab becomes widely distributed in the body and can combine with Ag to form immune complexes. Dendritic cells (DC), another population of APC, can recognize immune complexes by virtue of their receptors for the Fc portion of IgG (Fc γ R). These immune complexes may be efficiently taken up by the Fc γ R and initiate T cell responses to both class II-associated [8, 10–13] and class I-associated Ag [13].

In this study we compare presentation of a model exogenous Ag, liposome-entrapped ovalbumin (OVA), for its ability to stimulate class I- and II-restricted responses following targeting to slg of B cells and the Fc γ R of bone marrow-derived DC. We show that this Ag is efficiently presented in the context of class II, but not in the context of class I by B cells. In contrast, it is presented both in the context of class II and class I by DC. Acquisition of the capacity to present exogenous Ag in the context of class I by DC required a longer period in culture than the presentation of the same Ag in the context of class II. This lag period for class I presentation appears due to the time necessary for the development in these bone marrow-derived DC of a system to transfer exogenous Ag to the cytosol.

2 Results

2.1 Presentation of targeted liposome-encapsulated Ag by class I and II molecules

We have reported efficient class II-restricted presentation of APC-associated, liposome-encapsulated hen egg lysozyme (HEL) to HEL-specific transgenic CD4⁺ T cells from nonimmunized mice [8]. DNP-bearing liposomes were targeted to the Fc γ R of bone marrow-derived DC cultured for 12 days following opsonization with anti-DNP Ab. The same liposomes were targeted to slg of B cells by mixing them together with protein A-anti-DNP Fab (PA-anti-DNP) conjugates in the presence of protein A-binding anti-Ig [8]. In the present study we encapsulated OVA in liposomes of identical composition, using as readout IL-2 production by the I-A^b plus OVA peptide-restricted hybridoma ID5 [14]. Data from a representative experiment are shown in Fig. 1 A and B. As for our results for HEL, OVA was not presented by either B cells or DC at concentrations lower than about 1 μ M when free in solution or 10 nM when encapsulated in non-targeted

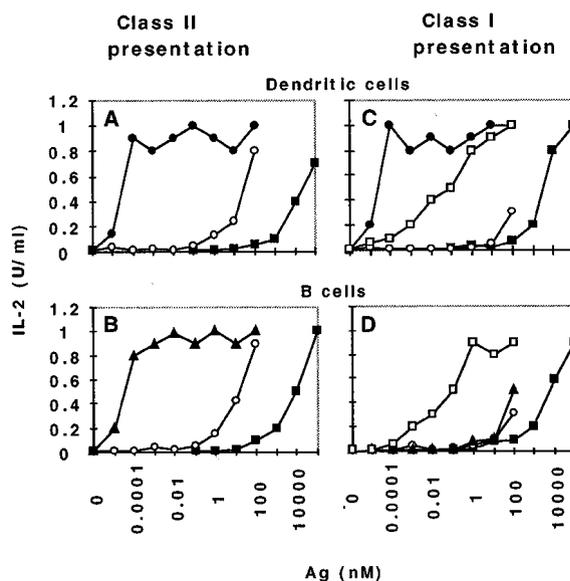


Fig. 1. DC and B cells efficiently present peptides derived from targeted OVA to class II-restricted T cells, but only DC present peptides derived from targeted OVA to class I-restricted T cells. B cells (B, D) or bone marrow-derived DC cultured for 12 days (A, C) were incubated with either free SIINFEKL peptide (\square), free OVA (\blacksquare), or with OVA-containing liposomes alone (\circ) (untargeted), or in the presence of anti-DNP mAb (\bullet) (FcR targeted), or rabbit anti-mouse Ig Ab and a PA-anti-DNP conjugate (\blacktriangle) (slg targeted). After overnight incubation, APC were washed and either OVA peptide plus I-A^b-restricted T hybridoma cells (1D5) (A, B), or SIINFEKL plus K^b-restricted transgenic T cells (OT-I) (C, D) were added. IL-2 production after 48 h is shown. These are data from an experiment representative of more than ten performed.

liposomes, but liposome-encapsulated OVA was presented at 100 000-fold lower concentrations (100 fM) when targeted to the DC Fc γ R (Fig. 1 A) or slg of B cells (Fig. 1 B). B cells did not present Fc γ R-targeted liposomes containing OVA (data not shown), since the Fc γ R they express is not endocytosed [15].

To evaluate presentation of class I-restricted determinants from the same Ag, we used this system of liposome-encapsulated OVA to study presentation by the same APC of a peptide (SIINFEKL) derived from OVA to K^b plus SIINFEKL-specific T cells from OT-I mice [16] (Fig. 1 C and D). As for class II-restricted presentation, targeting of liposomes to the DC Fc γ R permitted efficient presentation of OVA to OT-I cells, while free OVA and OVA in non-targeted liposomes were not presented at concentrations below 100 nM (Fig. 1 C). However, in contrast to the equivalent class II-associated presentation, when liposomes were targeted to the slg of B cells or the Fc γ R of DC, only the DC presented the class I-associated Ag (Fig. 1 D). B cells were not intrinsically less

efficient at stimulating these transgenic T cells than DC, since both APC presented the SIINFEKL peptide free in solution with equivalent efficiency.

We asked whether liposomes could deliver their contents into the class I presentation pathway in a manner independent of the cell surface determinant to which they bound. Presentation to OT-I cells was inhibited by a K^b -specific mAb when DC from B6 or (CBA \times B6) F1 mice were used as APC, but neither K^k -nor I-A^k-specific Ab had any effect on K^b -restricted presentation in the case of F1 mice (data not shown). We were thus able to use these latter Ab to target DNP-bearing liposomes to DC from F1 mice in the presence of PA-anti-DNP conjugates. As shown in Fig. 2A, targeting to either of these determinants permitted presentation of OVA in the context of class II to 1D5 cells with practically the same efficiency as targeting the Fc γ R, but only targeting to the Fc γ R permitted stimulation of class I-restricted OT-1 cells by the same APC (Fig. 2B).

2.2 Presentation of liposome-encapsulated OVA is TAP1 dependent

We asked whether the liposome contents passed into the cytosol prior to their association with class I molecules. When we used DC derived from bone marrow

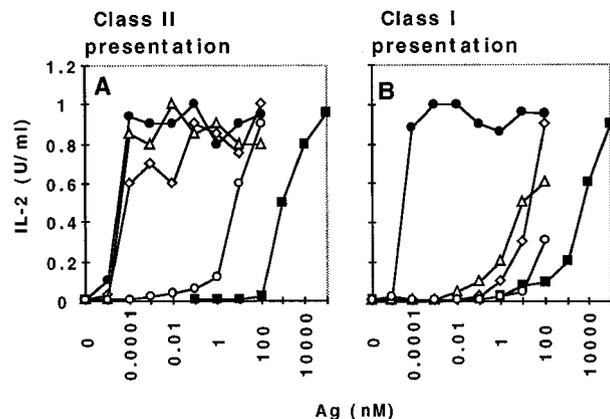


Fig. 2. Targeting the Fc γ R but not other tested DC surface determinants permits class I-restricted antigen presentation. Bone marrow-derived DC (cultured for 12 days) from (B6 \times CBA) F1 mice were incubated with free OVA (■), with OVA containing liposomes alone (○) (untargeted), in the presence of anti-DNP mAb (●) (FcR targeted), or with 5 μ g/ml PA-anti-DNP conjugate and anti-I-A^k (◇) (class II targeted) or anti H2-K^k (△) (class I targeted) mAb. After overnight incubation, cells were washed and T cells 1D5 (A), or OT-1 (B) were added. Results shown are representative of three experiments.

from TAP1^{-/-} mice [17] as APC, Fc γ R-targeted presentation to the class II-restricted hybridoma was not impaired relative to wild-type mice (Fig. 3A; compare to Fig. 1). The ability of the same cells to present exogenous SIINFEKL was enhanced relative to wild-type cells (Fig. 3B; compare to Fig. 1C), despite their low expression of class I molecules observed by FACS® (data not shown). This probably reflects the lack of competition from peptides stably bound to the reduced number of class I molecules that are expressed by these cells. Despite this sensitivity to SIINFEKL, presentation of Fc γ R-targeted liposome-encapsulated OVA was poor (Fig. 3B). Thus, as reported for most forms of class I-restricted presentation of exogenous Ag, liposomes or their contents probably must pass into the cytosol for proteolysis by the proteasome before transport by TAP in order to associate with class I molecules in the endoplasmic reticulum.

2.3 SIINFEKL from Fc γ R-targeted liposomes is not efficiently presented to OT-I cells

SIINFEKL efficiently associates with class I molecules at the cell surface or in cellular compartments accessible to fluid phase endocytosis. Thus, SIINFEKL would be expected to be efficiently presented if introduced into the cytosol by microinjection or if generated in the cytosol, as has been demonstrated when SIINFEKL is expressed from a minigene [18]. Fc γ R-targeted liposome-en-

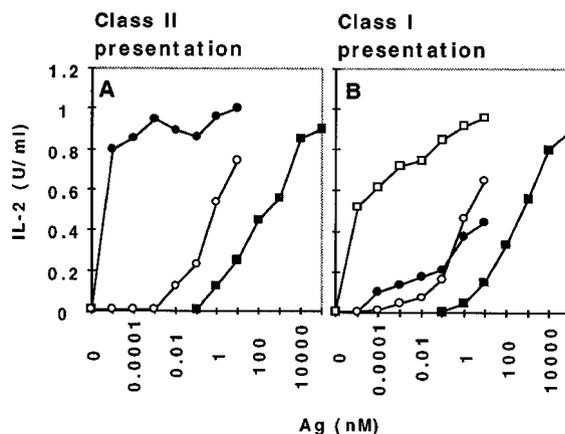


Fig. 3. Presentation of liposome-encapsulated OVA is TAP1 dependent. This experiment was performed using DC under the same conditions as in Fig. 1 except that the cells were from TAP1^{-/-} B6 mice. Cells were incubated with free SIINFEKL (□), free OVA (■), with OVA-containing liposomes alone (○) (untargeted), or the presence of anti-DNP mAb (●) (FcR targeted). After overnight incubation, cells were washed and 1D5 (A) or OT-I (B) T cells were added. Results shown are representative of three experiments.

capsulated OVA was efficiently presented by DC after receptor-mediated uptake. However, no presentation was seen when liposomes containing equimolar concentrations of SIINFEKL, rather than OVA, were used (Fig. 4). This indicates that liposomes do not enter the cytosol as such, nor do their membranes fuse with the membrane of endocytic compartments, since these processes would be equally efficient for cytoplasmic delivery of OVA or SIINFEKL. Thus, liposome-encapsulated molecules are released in some endocytic compartment prior to their movement into the cytosol.

2.4 Class I-associated presentation depends on DC differentiation

In our earlier studies on class II-restricted response to HEL we routinely used DC from CBA mice cultured for 7 days [8]. We evaluated the effect of the age of the B6 DC cultures on class I- and II- restricted presentation of liposome-encapsulated OVA. In agreement with the results for the presentation of HEL by CBA cells, presentation to class II-restricted T cells of peptides derived from OVA in liposomes targeted to the Fc γ R was already as efficient at 4 to 6 days (Fig. 5A) as at later times (Fig. 5B and C). Surprisingly, we found little or no presentation in the context of class I of liposome-encapsulated OVA targeted to the Fc γ R for DC cultured for the same period (Fig. 5D). The capacity to present OVA in the context of class I developed over the

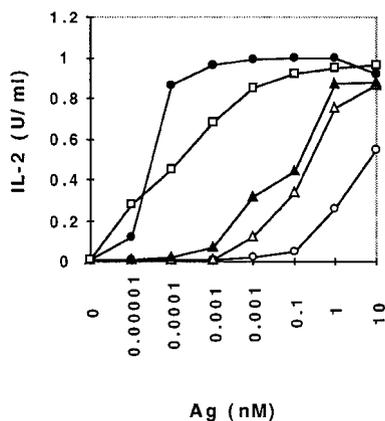


Fig. 4. SIINFEKL contained in Fc γ R-targeted liposomes is inefficient in inducing OT-I T cell stimulation. DC cultured for 12 days were incubated with free SIINFEKL (\square), with SIINFEKL-containing liposomes alone (\triangle) (untargeted), or in the presence of anti-DNP mAb (\blacktriangle) (FcR targeted), or with OVA-containing liposomes alone (\circ) (untargeted), or in the presence of anti-DNP mAb (\bullet) (FcR targeted). Results shown are representative of three experiments.

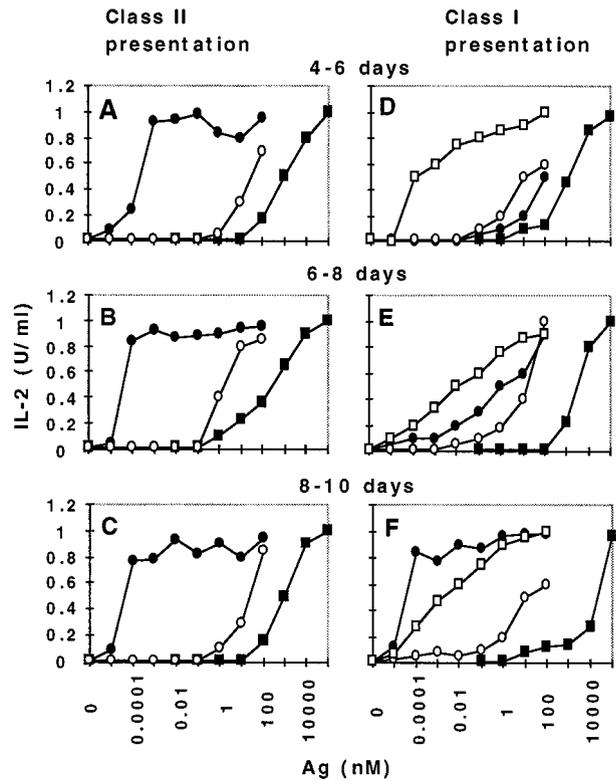


Fig. 5. Acquisition of the capacity to present Ag as a function of duration of culture of DC. After 4 (A, D), 6 (B, E) or 8 (C, F) days of culture, DC were incubated with free or liposome-encapsulated OVA overnight and then with class II- (A–C) or class I- (D–F) restricted T cells for 2 days. Symbols: free SIINFEKL peptide (\square), free OVA (\blacksquare), OVA-containing liposomes alone (\circ) (untargeted), or in the presence of anti-DNP mAb (\bullet) (FcR targeted). Results shown are representative of more than five experiments.

next 2 days and was fully established by day 10 (Fig. 5 E and F).

Despite the differences for the presentation of endocytosed OVA associated with class I, FACS measurements (Fig. 6 A), indicated that the levels of expression of class I and II molecules, Fc γ R (as measured by IgG anti-DNP-opsionized liposome binding), co-stimulatory and myeloid cell markers examined on DC taken after 5 days are similar to those expressed by DC cultured for 12 days. In addition, presentation of a fixed concentration (1 nM) of SIINFEKL peptide in solution to OT-I T cells varied to the same extent as a function of the numbers DC cultured for either 5 or 12 days used as APC (Fig. 7 A). We also compared the number of DC required for presentation of SIINFEKL as the free peptide with the number of DC necessary to stimulate OT-I T cells when the DC acquired the Ag from targeted liposomes containing OVA. DC cultured for 5 and 12 days were incubated in the presence of

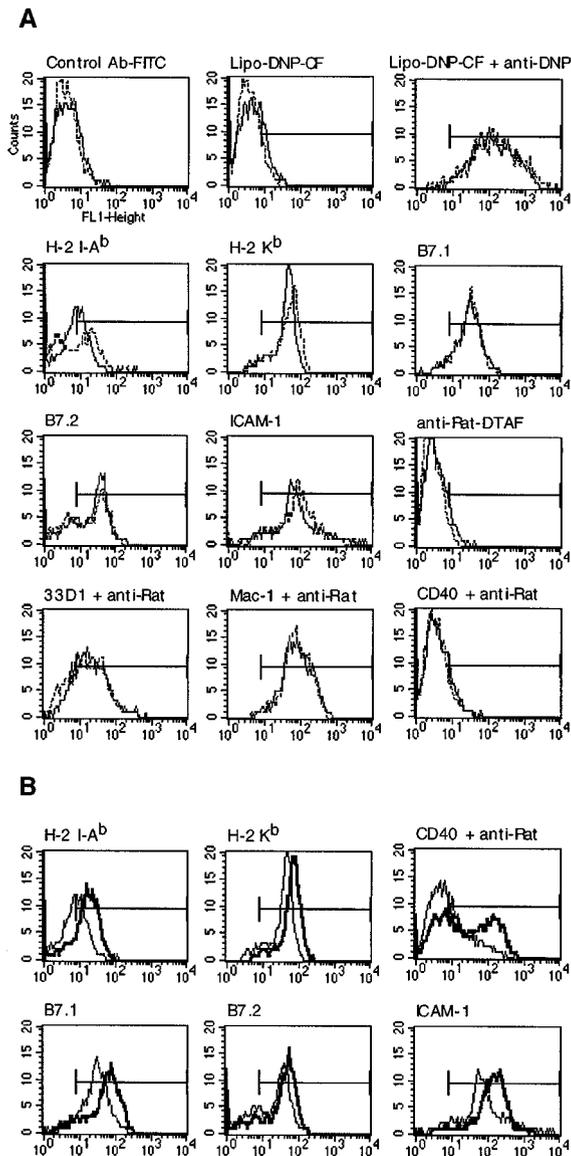


Fig. 6. (A) FACS profiles of DC 5 (continuous line) or 12 (dotted line) days after initiation of bone marrow cultures in conditioned medium containing GM-CSF. (B) FACS profiles of DC following 5 days of culture in conditioned medium containing GM-CSF and subsequent overnight incubation without (fine line) or with 10 μ g/ml LPS (bold line).

anti-DNP Ab and DNP-bearing liposomes at 10 pM OVA concentration in culture. The results, presented in Fig. 7B, show that the number of DC cultured for 12 days required for presentation of SIINFEKL derived from processing of Fc γ R-targeted liposome-encapsulated OVA corresponded well to the number of DC cultured for either 5 or 12 days which presented SIINFEKL as the free peptide (Fig. 7A), while any number of cells cultured for 5 days failed to present the Ag from opsonized liposomes. This suggests that the capacity of processing of

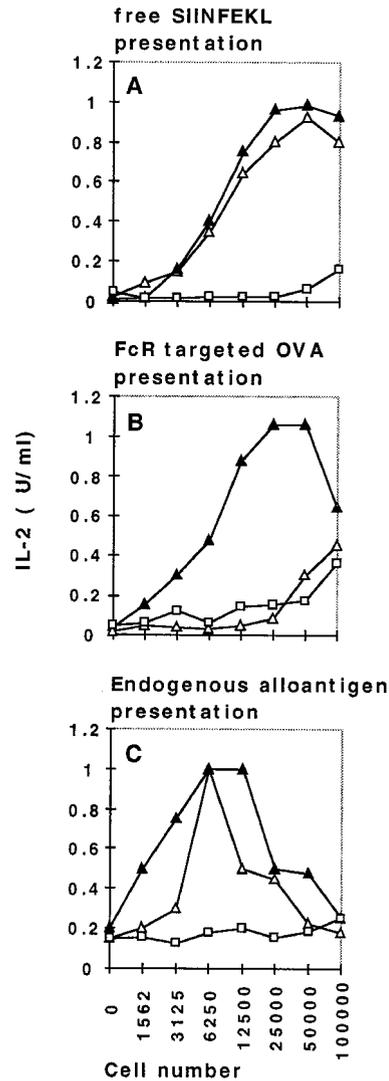


Fig. 7. Acquisition of the capacity to present SIINFEKL or an endogenous antigen as a function of duration of culture of DC. After 5 (Δ) or 12 (\blacktriangle) days of culture various numbers of DC from H-2b mice were incubated with 1 μ M SIINFEKL (A) or with 10 pM OVA in liposomes in the presence of anti-DNP mAb (B), washed, and incubated with OT-I cells. In (C) cells were incubated for 2 days without Ag in the presence of class I-restricted alloreactive transgenic T cells (KB5C20) specific for an K^b-restricted peptide derived from an endogenous mouse protein. The control DC were bone marrow-derived cells from CBA/J mice cultured for 12 days (H-2k) (\square). Results shown are representative of two experiments.

the exogenous OVA was a property, acquired over time, of DC that were nevertheless already capable of presenting SIINFEKL as the free peptide after 5 days.

The lack of major phenotypic differences between DC cultured for 5 and 12 days in Fig. 6A did not rule out a

developmental delay in some element required for class I-peptide presentation by the DC cultured for 5 days, which could occur at the level of the proteasome, TAP or other molecules necessary for class I presentation [1]. To evaluate this question, we analyzed the presentation of an endogenous Ag as a function of the age of the DC. We used B6 DC cultured for 5 and 12 days to stimulate T cells from B10.BR mice transgenic for a CD8⁺ TCR (KB5C20), specific for K^b associated with peptide sequences derived from one or more endogenous mouse proteins [19]. Presentation to KB5C20 of these determinants is TAP dependent [20] but CD4 independent [21]. As shown in Fig. 7 C, DC cultured for 5 days presented endogenous K^b-restricted determinants practically as well, on a per cell basis, as those cultured for 12 days ruling out an obvious defect in any pathway required for class I-restricted presentation of endogenous proteins by early DC. Taken together, these results show that the failure to present exogenous OVA by DC cultured for 5 days appears related to their inability to transport Fc γ R-targeted OVA into the cytosol.

2.5 Lack of effect of induction of DC maturation by various agents on acquisition of class I presentation

DC have been reported to undergo maturation or acquire the capacity to stimulate CD8⁺ T cells as a consequence of various stimuli derived from infectious agents, including LPS or double-stranded RNA in the case of viral infection [22]. DC will initially present Ag to CD4⁺ T cells expressing the CD40 ligand. Activation of DC via CD40 has been shown to render them capable of stimulating CD8⁺ T cells. We asked whether exposure to a ligand for CD40, to LPS, or to poly (I) poly (C), a potent inducer of type I IFN, would permit DC harvested at 5 days to present exogenous Ag in the context of class I molecules. FACS analysis showed that LPS stimulation resulted in marked up-regulation of class II, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, B7.1 and CD40, as well as smaller increases in B7.2 and H-2K^b by DC cultured for 5 days (Fig. 6 B). Reflecting this up-regulation, data presented in Fig. 8 show that cells cultured for 5 days and incubated with Ab to CD40, LPS or double-stranded RNA [poly (I) poly (C)] all presented either free (Fig. 8 A) or Fc γ R-targeted OVA (Fig. 8 B) with 10- to 100-fold greater efficiency. However, cells treated with these agents still required 10 000-fold more Fc γ R-targeted liposome-encapsulated Ag for class I-restricted presentation than untreated DC obtained after 10 or more days of culture (compare to Fig. 1 C).

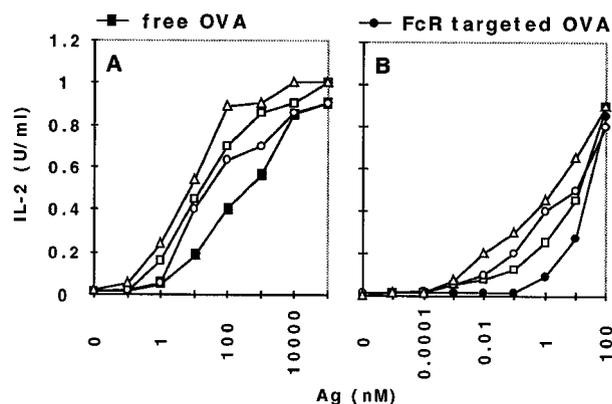


Fig. 8. Agents inducing maturity of DC cultured for 5 days have little influence on their capacity to present free (A) or Fc γ R-targeted OVA (B) in association with class I molecules. After 5 days of culture DC were incubated with 20 μ g/ml anti-CD40 mAb (□), 10 μ g/ml LPS (○), or 10 μ g/ml poly (I) poly (C) (Δ). After overnight incubation, free OVA (■) or liposome-encapsulated OVA in the presence of anti-DNP Ab (●) were added overnight. The following day cells were washed, OT-I cells added, and IL-2 measured 2 days later. The results were the same when these agents were added to the DC at the same time as the OVA (data not shown). Results shown are representative of two experiments.

3 Discussion

Induction of cytotoxic T cell responses normally requires professional APC expressing the class I-peptide complexes for which the T cells are specific, as well as appropriate co-stimulatory molecules. DC are widely distributed in tissues and migrate to sites of inflammation. This increases their chance to contact infectious agents, enabling presentation of antigenic peptides derived from endogenous protein synthesis. These cells are also able to take up and present exogenous Ag in the form of debris from infected dead or dying cells in a TAP-dependent process [6] involving heat shock proteins [23] or particular membrane phospholipids for which they have specific receptors (reviewed in [24]). In the absence of such mechanisms, data presented here and other published results [25–28] show a requirement for relatively high (10^{-8} – 10^{-6} M) Ag concentrations for presentation of free Ag or Ag in non-targeted liposomes, for either class I- or II-restricted responses. However, when targeted in liposomes to the Fc γ R of DC, both class I- and II-restricted presentation occurred at Ag concentrations of 10^{-13} M. This quantity of Ag could be provided by the contents of a single 200-nm liposome, containing about 1600 molecules of OVA, per DC.

Ag presentation was blocked by an Ab to Fc γ RII/III for both class II- [8] and I (data not shown)-restricted responses. In addition, class I-restricted responses to immune complexes did not occur when DC from mice, in which the Fc γ RI- and RIII-associated γ chain was knocked out, were used [13]; thus, if immune complexes and IgG-opsonized liposomes are taken up by the same mechanism, the Fc γ RIII appears to be the relevant receptor. B cells also express an Fc γ R (Fc γ RIIIb1) which does not mediate Ag uptake [15]. In the study of Regnault et al. [13] a chimeric FcR transfected in B lymphoma cells functioned for class II presentation of OVA-anti-OVA complexes by those cells but failed to confer class I-restricted Ag on the lymphoma. Thus, the capacity of an Fc γ R to permit translocation into the cytosol of the Ag to which it binds is not an intrinsic property of the receptor, but also depends on the cells expressing it. However, translocation of Ag into the cytosol is not the inevitable consequence of its internalization in general, since targeting of liposomes to other cell surface molecules than the Fc γ R on DC failed to result in CD8 $^+$ T cell stimulation, although these molecules were excellent targets for endocytosis of Ag for presentation by class II for CD4 $^+$ T cell stimulation (Fig. 2).

Like Fc γ RIII on DC, slg is expressed at the cell surface of B cells in heterocomplexes with molecules containing immune receptor tyrosine-based activation motif (ITAM) sequences, which play a role in the activation of these APC [29]. Evidence for a role of slg of Ag-specific B cells for priming naive CD4 $^+$ T cells *in vitro* is well established [7, 8]. Transfection of B lymphoma cells with slg specific for TNP was also reported to permit those cells to acquire and to present TNP-modified OVA in a class I-restricted manner more efficiently than Ag taken up by fluid-phase endocytosis [9]. Nevertheless, the concentrations of Ag used in the latter study were high (micromolar). Here we show that B cells which could use their slg to present Ag for class II presentation at femtomolar concentrations failed to present these Ag in the class I presentation pathway even at concentrations many orders of magnitude higher (Fig. 1). Pulsing of B cells with SIINFEKL permitted efficient stimulation of OT-I cells from unimmunized mice, thus there are no elements of co-stimulation or of other elements required for Ag presentation lacking in B cells, provided that the class I-peptide complex is expressed at the cell surface.

It has been suggested that peptides derived from exogenous Ag taken up by DC may associate with class I molecules recycling through endocytic vesicles also rich in class II molecules [30, 31]. Co-localization of Ag internalized in coated pits and class I molecule has been recently demonstrated by electron microscopy [32]. However, the capacity of these complexes to be re-

expressed at the cell surface or to stimulate T cells was not tested. In the present study, class I-restricted presentation of OVA taken up in Fc γ R-targeted liposomes was shown to be TAP1 dependent. In addition, SIINFEKL encapsulated in Fc γ R-targeted liposomes was not presented, while liposomes of identical composition but containing OVA released a sufficient fraction of their contents in these vesicles to result in efficient class II-restricted presentation. It is likely that the SIINFEKL peptide in liposomes targeted to the Fc γ R is more rapidly degraded when released in endocytic vesicles than the same sequence expressed within the OVA protein. Nevertheless, SIINFEKL peptide was capable of being presented in association with class I molecules on DC from TAP1 $^{-/-}$ mice when present at concentrations of 10 $^{-14}$ M or less in the medium (Fig. 3B). Thus either peptide association with class I molecules in endocytic vesicles is very inefficient, or molecules which bind peptides in endocytic vesicles accessible via the Fc γ R are not re-expressed at the cell surface. The lack of presentation of SIINFEKL from targeted vesicles also argues against fusion of liposomes with the membrane of endocytic vesicles, which would be expected to have permitted SIINFEKL to enter the cytosol to be efficiently transported by TAP [18]. Passage into the cytosol of peritoneal macrophages or DC *in vitro* was originally reported to be enhanced when “pH-sensitive” liposome formulations, which release their contents or which may fuse with endocytic vesicle membranes at acid pH, were used [25, 26, 33]. However, this dependence on pH-sensitive lipids was not observed for administration of liposomes *in vivo* [27]. The phospholipids we used for liposome formation are saturated and not known to be capable of fusion with cell membranes. This leaves the mechanism of the passage of OVA into the cytosol unexplained.

Electron microscopic studies of bone marrow-derived DC have revealed development of a tubulo-vesicular system, vesicles and multivesicular bodies over the period from 6 to 12–14 days in culture [34]. It remains to be determined whether these morphological changes are relevant to our finding that class I presentation of Ag targeted to the Fc γ R only becomes efficient for DC derived from bone marrow cells cultured for 10–12 days. Cells cultured for 5 or 12 days express nearly equivalent levels of class I molecules and bind equivalent numbers of opsonized liposomes (Fig. 6A). DC cultured for 5 days also present endogenous peptides (Fig. 7C) and exogenous SIINFEKL in the form of the free peptide (Figs. 5D–F and 7A) as efficiently as DC cultured for longer periods. These data are consistent with the existence of a regulated transport process present in DC which can convey exogenous Ag from endocytic vesicles to the cytosol. However, we cannot formally rule out other explanations for our results (for example, “pre-pro-

cessing” of OVA by an enzyme only active in endosomes of cells cultured for 12 days [35]).

In their study on presentation of Ag from Ag-Ab complexes, in addition to bone marrow-derived DC cultured for 3 weeks or more, Regnault et al. [13] successfully used the D1 long-term DC line for class I presentation of Ag from immune complexes [36]. This line is reported to have an “immature” phenotype [36, 37]. Interactions with immune complexes [13] and opsonized liposomes (data not shown) are themselves capable of increasing the expression of MHC and co-stimulatory molecules. Nevertheless, we did not observe presentation of OVA from OVA-anti-OVA immune complexes using DC cultured for 5 days, though we confirmed the results of Regnault et al. when 2-week-old cultures were used (data not shown).

We also exposed DC cultured for 5 days to agents that are known to up-regulate the expression of co-stimulatory molecules, such as LPS, to increase the half-life of class I molecules, such as double-stranded RNA in the form of poly (I) poly (C) [22], or to induce DC to activate class I-associated presentation of Ag by a CD40-dependent pathway [38, 39]. None of these treatments conferred the capacity of efficient class I-restricted presentation of exogenous Ag on these DC, which nonetheless became “mature” by the criteria of up-regulation of MHC, co-stimulatory and ICAM-1 molecules (Fig. 6B).

The heterogeneity of DC pathways and their maturation *in vivo* are just beginning to be elucidated. It remains to be determined whether an *in vivo* population of DC of hematopoietic origin shares the antigen presentation characteristics with the *in vitro* derived cells used here. The ability to facilitate the induction of cytotoxic T cells by targeting DC via the FcR or other receptors is of evident interest for vaccine development.

4 Materials and methods

4.1 Animals, culture medium, cell lines and antibodies

OT-I mice are transgenic for a TCR $\alpha\beta$ specific for the chicken OVA 257–264 peptide SIINFEKL in the context of H-2K^b [16]. These mice were a kind gift of Matthias Merkenschlager (MRC, London). They were maintained on the C57BL/6 (B6) background and identified by FACS analysis as those mice in which a majority of peripheral blood CD8⁺ cells express V α 2. B10.BR mice transgenic for a TCR recognizing the K^b molecule as an alloantigen (KB5C20) [19] were provided by Anne-Marie Schmitt-Verhulst (CIML, Marseille, France). T cells obtained from the spleens of transgenic

mice 6–12 weeks of age were purified by passage over nylon wool columns.

T hybridoma cells OT4H.1D5 (1D5) [14] (provided by Yong Ke, Emory University, Atlanta, GA) are specific for an undefined I-A^b-restricted OVA peptide. These cells were cultured in RPMI medium supplemented with 5 % FCS, 50 μ M 2-ME, 2 mM glutamine and antibiotics (supplemented RPMI).

DC were derived from bone marrow of B6, CBA/J or (CBAxB6)F1 mice (Iffa-Credo), or from TAP1^{-/-} mice on a B6 background (JAX). Cells were cultured for 3 days in DMEM supplemented with 10 % FCS, antibiotics, 2 mM glutamine, 50 μ M 2-ME and 30 % conditioned medium from NIH3T3 cells containing GM-CSF (provided by Jean Davoust, CIML), as described [36]. They were then diluted 1:1 in the same medium and, after an additional period of 1–12 days of culture, plastic-nonadherent cells were washed, resuspended in supplemented RPMI and used as APC. Splenic B cells were obtained from B6 mice by elimination of T cells using Ab to Thy-1, CD4 and CD8, and rabbit complement.

U7.27.7, a hybridoma producing an anti-DNP Ab, was provided by Zelig Eshbar (Weizmann Institute, Rehovot, Israel). 100.5.28 is specific for H-2K^k [40]. 10.2.16 [41] is specific for I-A^k. 5F1 is specific for H-2K^b [42]. The above mAb are mouse IgG2a. The CD40-specific rat mAb FGK45 [39] was provided by Rienk (Offringa, Leiden University, Leiden, The Netherlands). Rabbit anti-mouse IgG (H plus L) was from Jackson.

4.2 Liposomes and other reagents

Liposomes (80 μ moles lipids) were made from 65 % (mol/mol) dimyristoyl phosphatidylcholine, 34.5 % cholesterol (Sigma-Aldrich) and 0.5 % DNP-caproyl-phosphatidylethanolamine (DNP-cap PE) (Molecular Probes). Liposomes were formed by exposing lipids evaporated from chloroform/methanol (9:1 v/v) to an aqueous solution containing 30 mg/ml (680 μ M) OVA (Grade VII, Sigma) in PBS, or 1 mg/ml (1 mM) SIINFEKL (CIML protein synthesis facility) in PBS containing 10 mM carboxyfluorescein (CF) (Molecular Probes). Following repeated cycles of freezing and thawing, liposomes were formed by extrusion (Extruder, Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) [43] through polycarbonate filters of 200 nm pore size at 40 °C, followed by gel filtration over Sepharose 4B columns to eliminate unencapsulated solute. Laser light scattering determinations indicate that these preparations are homogeneous with diameters closely corresponding to the pore size of the polycarbonate filters used (data not shown). Lipid vesicles were sterilized by filtration through 0.45- μ m filters. ¹²⁵I-labeled OVA was used to determine % protein entrapment. SIINFEKL concentrations were determined by fluorescence of dilutions of free and liposome-entrapped SIINFEKL in 10 mM CF with reference to the stock solution of SIINFEKL used for liposome preparation. At the concentration of Ag used for encapsulation, 200-nm liposomes each contain

about 1600 molecules of protein or peptide. The amount of liposome-associated Ag used for presentation experiments was obtained by serial tenfold dilutions of these liposomes. We used anti-DNP mAb to target DNP-bearing liposomes to the Fc γ R. The preparation of PA-anti-DNP conjugated and their use to target DNP-bearing liposomes to various cell surface determinants other than the Fc γ R, in the presence of protein A-binding Ab specific for those determinants, has been described [8]. LPS (*Escherichia coli* 055:B5) and poly (I) poly (C) were from Sigma.

4.3 Antigen presentation assays

APC (20 000 B cells or DC) were incubated in 100 μ l supplemented RPMI, in duplicate wells of 96-well flat-bottom tissue culture plates. Free or liposome-encapsulated Ag at the indicated concentrations were added overnight, in the presence or absence of targeting or control Ab (5 μ g/ml). DC were then washed before addition of 10 000 T hybridoma or 20 000 T cells from transgenic mice for 48 h in supplemented RPMI, at which time undiluted supernatant fluids were harvested for determination of IL-2 secretion based on a bioassay using the IL-2-dependent cell line CTLL. IL-2 values are derived from a standard curve using CTLL in the presence of recombinant mouse IL-2 (Boehringer Mannheim).

4.4 FACS analysis

DC (3×10^5) cultured for 5 or 12 days were washed and incubated in PBS containing 1 % FCS, 1 mM EDTA and 0.1 % NaN₃. Incubation with FITC-conjugated Ab (anti-B7.1, -B7.2 and -ICAM-1 from Pharmingen; anti-I-A^b from Caltag) was performed at 4°C for 1 h. For indirect labeling of Mac-1 (Hybritech, San Diego, CA), 33D1 (ATCC, Manassas, VA) and CD40 (FGK45), cells were incubated with 5 μ g/ml rat mAb for 30 min and washed. Anti-rat fluorescein dichlorotriazine (DTAF) conjugates (Jackson, Bar Harbor, ME) were then added for an additional 30 min. Cells were washed and fixed in 2 % formaldehyde and analyzed in a FACScan (Becton Dickinson) cytofluorimeter. For Fc γ R-dependent binding of liposomes, DNP-bearing liposomes containing CF and OVA were used at a final OVA concentration of 50 nM. They were incubated with cells in the presence or absence of 5 μ g/ml anti-DNP Ab for 1 h, washed and fixed as above.

Acknowledgements: We thank Delphine Palet for technical assistance and Jean Davoust, Sylvie Guerder, Bernard Malissen and Anne-Marie Schmitt-Verhulst for helpful discussions and criticism of the manuscript. This work was supported by institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Centre National de la Recherche Scientifique and by a grant in the European Community Biomed II program. K.S. was supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

References

- 1 Pamer, E. and Cresswell, P., Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 1998. **16**: 323–358.
- 2 Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F. and Kosaka, H., Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 923–930.
- 3 Rock, K., A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol. Today* 1996. **17**: 131–137.
- 4 Jondal, M., Schirmbeck, R. and Reimann, J., MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 1996. **5**: 295–302.
- 5 Carbone, F. R., Kurts, C., Bennett, S. R., Miller, J. F. and Heath, W. R., Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol. Today* 1998. **19**: 368–373.
- 6 Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R. and Rock, K. L., Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 1999. **398**: 77–80.
- 7 Ho, W., Cooke, M., Goodnow, C. and Davis, M., Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 1994. **179**: 1539–1549.
- 8 Serre, K., Machy, P., Grivel, J.-C., Jolly, G., Brun, N., Barbet, J. and Leserman, L., Efficient presentation of multivalent antigens targeted to various cell surface molecules of dendritic cells and surface immunoglobulin of antigen-specific B cells. *J. Immunol.* 1998. **161**: 6059–6067.
- 9 Ke, Y. and Kapp, J. A., Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 1179–1184.
- 10 Sallusto, F. and Lanzavecchia, A., Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 1994. **179**: 1109–1118.
- 11 Maurer, D., Fiebiger, E., Ebner, C., Reininger, B., Fischer, G. F., Wichlas, S., Jouvin, M.-H., Schmitt-Egenolf, M., Kraft, D., Kinet, J.-P. and Stingl, G., Peripheral blood dendritic cells express Fc ϵ RI as a complex composed of Fc ϵ RI α - and FcRI γ -chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J. Immunol.* 1996. **157**: 607–616.
- 12 Fanger, N. A., Voigtlaender, D., Liu, C., Swink, S., Wardwell, K., Fisher, J., Graziano, R. F., Pfefferkorn, L. C. and Guyre, P. M., Characterization of expression, cytokine regulation and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 1997. **158**: 3090–3098.
- 13 Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S., Fc γ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 1999. **189**: 371–380.
- 14 Li, Y., Ke, Y., Gottlieb, P. D. and Kapp, J. A., Delivery of exogenous antigen into the major histocompatibility complex class I and class II pathways by electroporation. *J. Leukoc. Biol.* 1994. **56**: 616–624.
- 15 Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.-G., Webster, P., Sautés, C., Mellman, I. and Fridman, W. H., Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 1992. **256**: 1808–1812.
- 16 Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J. and Carbone, F. R., T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 1994. **76**: 17–27.

- 17 **Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Ploegh, H. H. and Tonegawa, S.**, TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* 1992. **71**: 1205–1214.
- 18 **Craiu, A., Akopian, T., Goldberg, A. and Rock, K. L.**, Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. **94**: 10850–10855.
- 19 **Schönrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A. M., Malissen, B., Hämmerling, G. J. and Arnold, B.**, Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 1991. **65**: 293–304.
- 20 **Guimezanes, A., Schumacher, T. N., Ploegh, H. L. and Schmitt-Verhulst, A. M.**, A viral peptide can mimic an endogenous peptide for allorecognition of a major histocompatibility complex class I product. *Eur. J. Immunol.* 1992. **22**: 1651–1654.
- 21 **Gaugler, B., Schmitt-Verhulst, A. M. and Guimezanes, A.**, Evaluation of functional heterogeneity in the CD8 subset with T cells from T cell receptor-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* 1993. **23**: 1851–1858.
- 22 **Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I. and Lanzavecchia, A.**, Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* 1999. **189**: 821–829.
- 23 **Blachere, N. E., Li, Z., Chandawarkar, R. Y., Suto, R., Jaikaria, N. S., Basu, S., Udono, H. and Srivastava, P. K.**, Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocytes response and tumor immunity. *J. Exp. Med.* 1997. **186**: 1315–1322.
- 24 **Platt, N., da Silva, R. P. and Gordon, S.**, Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell. Biol.* 1998. **8**: 365–372.
- 25 **Harding, C. V., Collins, D. S., Kanagawa, O. and Unanue, E. R.**, Liposome-encapsulated antigens engender lysosomal processing for class II MHC presentation and cytosolic processing for class I presentation. *J. Immunol.* 1991. **147**: 2860–2863.
- 26 **Nair, S., Zhou, F., Reddy, R., Huang, L. and Rouse, B. T.**, Soluble proteins delivered to dendritic cells via pH-sensitive liposomes induce primary cytotoxic T lymphocyte responses in vitro. *J. Exp. Med.* 1992. **175**: 609–612.
- 27 **Collins, D. S., Findlay, K. and Harding, C. V.**, Processing of exogenous liposome-encapsulated antigens in vivo generates class I MHC-restricted T cell responses. *J. Immunol.* 1992. **148**: 3336–3341.
- 28 **Nair, S., Babu, J., Dunham, R., Kanda, P., Burke, R. and Rouse, B.**, Induction of primary, antiviral cytotoxic, and proliferative responses with antigens administered via dendritic cells. *J. Virol.* 1993. **67**: 4062–4069.
- 29 **Cambier, J.**, Antigen and Fc receptor signalling: the awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J. Immunol.* 1996. **155**: 3281–3285.
- 30 **Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L. and Bhardwaj, N.**, Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1998. **188**: 1359–1368.
- 31 **De Bruijn, M., Peterson, P. and Jackson, M.**, Induction of heat-stable antigen expression by phagocytosis is involved in in vitro activation of unprimed CTL by macrophages. *J. Immunol.* 1996. **156**: 2686–2692.
- 32 **Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Ramnensee, H. G., de la Salle, H. and Schild, H.**, Receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 1999. **162**: 3757–3760.
- 33 **Reddy, R., Zhou, F., Huang, L., Carbone, F., Bevan, M. and Rouse, B. T.**, pH sensitive liposomes provide an efficient means of sensitizing target cells to class I restricted CTL recognition of a soluble protein. *J. Immunol. Methods* 1991. **141**: 157–163.
- 34 **Zhang, Y., Harada, A., Wang, J. B., Zhang, Y. Y., Hashimoto, S., Naito, M. and Matsushima, K.**, Bifurcated dendritic cell differentiation in vitro from murine lineage phenotype-negative c-kit+ bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998. **92**: 118–128.
- 35 **Pierre, P. and Mellman, I.**, Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 1998. **93**: 1135–1145.
- 36 **Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J. and Ricciardi-Castagnoli, P.**, Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 1997. **185**: 317–328.
- 37 **Rovere, P., Manfredi, A. A., Vallinoto, C., Zimmermann, V. S., Fascio, U., Balestrieri, G., Ricciardi-Castagnoli, P., Rugarli, C., Tincani, A. and Sabbadini, M. G.**, Dendritic cells preferentially internalize apoptotic cells opsonized by anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *J. Autoimmun.* 1998. **11**: 403–411.
- 38 **Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. and Heath, W. R.**, Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998. **393**: 478–480.
- 39 **Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. and Melief, C. J.**, T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998. **393**: 480–483.
- 40 **Lemke, H., Hämmerling, G. J. and Hämmerling, U.**, Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the major histocompatibility complex and by the Qa/TL region in mice. *Immunol. Rev.* 1979. **47**: 175–206.
- 41 **Oi, V. T., Jones, P. P., Goding, J. W. and Herzenberg, L. A.**, Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2, and Ia antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1978. **81**: 115–120.
- 42 **Sherman, L. A. and Randolph, C. P.**, Monoclonal anti-H-2Kb antibodies detect serological differences between H-2Kb mutants. *Immunogenetics* 1981. **12**: 183–186.
- 43 **Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G. and Cullis, P. R.**, Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* 1985. **812**: 55–65.

Correspondence: Lee Leserman, CIML, Case 906, F-13288
Marseille CEDEX 9, France
Fax: +33-491 269 430
e-mail: leserman@ciml.univ-mrs.fr

Discussion de l'article 2

Tout d'abord, seules les DC sont capables de présenter un antigène exogène à des lymphocytes T CD8 qui lui sont spécifiques. Les lymphocytes B quant à eux, même s'ils présentent efficacement aux lymphocytes T CD4 un antigène, capturé par leur BCR, ils ne sont pas capables d'activer des lymphocytes T CD8. Pourtant en présence du peptide libre, qui se fixe sur les molécules de classe I et, pour lequel les lymphocytes T CD8 sont spécifiques, l'efficacité de ces deux types cellulaires est identique.

Ensuite, l'efficacité des DC à présenter un antigène exogène aux lymphocytes T CD8 est restreinte à certaines conditions. Les DC doivent avoir atteint un stade développemental particulier. Ceci se traduit, dans nos expériences, par la nécessité d'utiliser des DC dérivées de la moelle osseuse, après 12 jours de culture *in vitro* en présence de GM-CSF. Il est difficile de dire si ce phénomène que nous visualisons *in vitro* a une réalité physiologique *in vivo*. Des résultats similaires ont été publiés par l'équipe de Sebastian Amigorena qui a étudié la présentation de complexes immuns. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé, soit une lignée de DC (D1), soit des DC dérivées de la moelle osseuse après 3 semaines de culture *in vitro* en présence de GM-CSF (Regnault et al., 1999). Nous avons tenté d'étudier le phénotype de DC après 5 ou 12 jours de culture, mais en ce qui concerne les molécules du CMH ou de costimulation nous n'avons pas observé de différences majeures. De même, ces DC possèdent le même potentiel à activer des lymphocytes T CD8 (OT-I) lorsqu'elles sont incubées en présence du peptide (SIINFEKL). Ceci nous a conduit à supposer que l'absence de réponse n'était pas due à un défaut d'expression de molécules de costimulation participant à l'activation des lymphocytes T CD8. Il est possible que l'élément limitant soit la capacité de ces DC, après 5 ou 12 jours de culture (selon leur état de maturation ?), à présenter des peptides dérivés d'antigènes exogènes dans le contexte des molécules de classe I.

De plus, seul un antigène internalisé grâce aux Fc γ R est présenté dans le contexte des molécules de classe I. En effet, lorsque l'internalisation de l'antigène se fait grâce aux molécules du CMH (non restreintes) et même s'il est présenté par les molécules de classe II, il ne l'est pas par les molécules de classe I. Ceci suggère que le devenir intracellulaire de l'antigène est différent selon la molécule qui participe à son internalisation. Cela a déjà été montré, dans le cas du récepteur au mannose qui concentre l'antigène dans des compartiments différents de ceux impliqués dans l'internalisation par un récepteur homologue (DEC-205) (Mahnke et al., 2000). Ceci pourrait avoir des conséquences sur l'accessibilité de l'antigène aux molécules de classe I, par exemple. Une autre hypothèse serait que les molécules engagées (FcR, CMH de classe II ou de classe I) activeraient les DC de façon différencielle.

Enfin, la présentation dans le contexte des molécules de classe I d'un antigène internalisé par les FcR est dépendante de TAP et du protéasome, suggérant que les peptides s'associent aux molécules de classe I naissantes dans le réticulum endoplasmique. L'antigène semble donc

devoir passer des vésicules de la voie d'endocytose vers le cytoplasme afin d'être accessible à la voie de présentation classique par les molécules de classe I.

Le mécanisme responsable du passage de l'antigène internalisé dans le cytoplasme, n'est pas encore caractérisé. Cependant, il semblerait que ce soit un transport sélectif dépendant de l'ATP et de la taille des molécules transportées (Rodriguez et al., 1999). Des expériences complémentaires seront nécessaires afin d'identifier les compartiments à partir desquels les antigènes sont redistribués et les molécules responsables de ce transport sélectif. L'existence de compartiments de stockage où l'antigène est soumis à une faible dégradation pourrait être importante dans le processus de présentation dans le contexte des molécules de classe I (Inaba et al., 2000; Lutz et al., 1997). Outre les mécanismes de transport de ces antigènes, il doit également exister des mécanismes rendant compte de l'ubiquitination et de la prise en charge, par le protéasome, des antigènes nouvellement entrés dans le cytoplasme dans les DC selon leur état de "maturation".

Conclusions

Il faut vraisemblablement considérer la présentation dans le contexte classe I comme un phénomène qui n'est pas "anodin". En effet, l'activation de lymphocytes T CD8 auto-réactifs peut potentiellement être un événement dangereux, qui peut conduire au développement de maladies auto-immunes. Des études ont montré que des souris, transgéniques à la fois pour l'expression d'une protéine (GP) du virus LCMV au niveau du pancréas et, pour leurs TCR exprimés par les lymphocytes T CD8, spécifiques de cette même protéine, ne développent pas de diabète auto-immun (Ohashi et al., 1991). Néanmoins, la tolérance contre des antigènes exprimés par le pancréas peut être rompue, au profit de l'induction d'une immunité, puisque dès que ces souris sont infectées par le virus LCMV, elles déclenchent un diabète auto-immun. Ces résultats démontrent que l'équilibre maintenant la tolérance périphérique est très fragile et qu'il peut être rompu lors d'infections. La présentation d'antigène (si les antigènes du pathogène sont proches de ceux de l'hôte) dans le contexte des molécules de classe I doit donc être un événement très contrôlé.

Les DC, dérivées de la moelle osseuse, acquièrent "spontanément" ces propriétés de présentation en fonction de leur stade développemental après 12 jours de culture *in vitro* en présence de GM-CSF. Il est très délicat de suggérer que cette propriété est acquise lors de la "maturation" des DC. Lorsque ces cellules (prises au stade où elles n'activent pas les lymphocytes T CD8) sont activées par des agents connus pour induire leur maturation, (LPS, l'IFN- γ , l'ARN double brin, engagement de CD40), ces DC, alors matures, ne présentent toujours pas efficacement, aux lymphocytes T CD8, un antigène internalisé par les FcR. La réalité physiologique d'un tel mécanisme, où la présentation dans le contexte des molécules de classe I est acquise "spontanément", reste donc encore à démontrer, mais pourrait être impliqué dans le maintien de la tolérance périphérique.

Article 3

Machy, P., Serre, K., Baillet, M. and Leserman, L.

Induction of MHC class I presentation of exogenous antigen by dendritic cells is controlled by CD4⁺ T cells engaging class II molecules in cholesterol-rich domains.

Journal of Immunology, 2002. In press.

Préambule de l'article 3

Dans la continuité du travail exposé dans l'article 2 nous avons cherché comment sont régulées dans les DC, les propriétés de présentation dans le contexte des molécules de classe I. Nous avons vu que dès 4 à 6 jours de différenciation, à partir des précurseurs de la moelle osseuse, les DC sont capables de présenter, à des lymphocytes T CD4, un antigène internalisé grâce aux FcR. En revanche, leur capacité à présenter ce même antigène à des lymphocytes T CD8 est acquise beaucoup plus tardivement, après 12 jours de culture *in vitro*. Nous nous sommes donc intéressés dans ce contexte aux DC précoces, et nous avons recherché comment leur capacité à présenter des antigènes aux lymphocytes T CD8 peuvent être induite. Les agents connus pour induire la maturation de DC (LPS, ARN double brin, CD40, IFN- γ), ne leur permettent pas de présenter un antigène internalisé par les FcR, par les molécules de classe I.

Il est actuellement proposé que l'activation des lymphocytes T CD8 requiert la présence de lymphocytes T CD4 reconnaissant leur antigène présenté en association avec les molécules du CMH de classe II par les DC (Lanzavecchia, 1998). Néanmoins, le rôle exact des lymphocytes T CD4, n'est pas encore pleinement élucidé, bien qu'il semble en partie dépendant du couple CD40-CD40L. La possibilité, dans certains modèles, d'induire les DC à activer des lymphocytes T CD8, grâce à des anticorps agonistes spécifiques de CD40, suggère que le rôle des lymphocytes T CD4 ne peut se résumer à la production de cytokines nécessaires à la stimulation de lymphocytes T CD8. L'interaction, entre un lymphocyte T CD4 et une DC, doit donc être considérée comme un dialogue bidirectionnel et dynamique qui provoque l'activation simultanée des deux partenaires. Cette interaction convertit la DC en une cellule extrêmement efficace pour stimuler des lymphocytes T CD8.

Il semblerait que le rôle des lymphocytes T CD4 soit d'induire la maturation finale des DC et ainsi, d'augmenter l'expression des molécules de costimulation et peut-être aussi la sécrétion de cytokines. Il existe peut-être des molécules de costimulation, induites lors de l'interaction avec les lymphocytes T CD4, qui ne sont pas encore identifiées, mais qui pourraient participer à l'activation des lymphocytes T CD8. Dans ce contexte, nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux rôles que jouent les lymphocytes T CD4 dans l'induction des propriétés de présentation par les molécules de classe I des DC, au stade où elles ne présentent pas spontanément un antigène aux lymphocytes T CD8 (5/7 jours de culture).

Dans la mesure, où nous montrons qu'en présence de lymphocytes T CD4, ces DC deviennent alors capables d'activer des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène internalisé par les FcR, nous avons pu poser deux questions : 1) comment ces lymphocytes T CD4 transforment les DC en cellules capables d'activer des lymphocytes T CD8 ? 2) quelle est l'influence de la forme de l'antigène capturé par ces DC sur leur potentiel à recevoir le "help" apporté par les lymphocytes T CD4 ?

Induction of MHC Class I Presentation of Exogenous Antigen by Dendritic Cells Is Controlled by CD4⁺ T Cells Engaging Class II Molecules in Cholesterol-Rich Domains¹

Patrick Machy, Karine Serre, Marjorie Baillet, and Lee Leserman²

We investigated interactions between CD4⁺ T cells and dendritic cells (DC) necessary for presentation of exogenous Ag by DC to CD8⁺ T cells. CD4⁺ T cells responding to their cognate Ag presented by MHC class II molecules of DC were necessary for induction of CD8⁺ T cell responses to MHC class I-associated Ag, but their ability to do so depended on the manner in which class II-peptide complexes were formed. DC derived from short-term mouse bone marrow culture efficiently took up Ag encapsulated in IgG FcR-targeted liposomes and stimulated CD4⁺ T cell responses to Ag-derived peptides associated with class II molecules. This CD4⁺ T cell-DC interaction resulted in expression by the DC of complexes of class I molecules and peptides from the Ag delivered in liposomes and permitted expression of the activation marker CD69 and cytotoxic responses by naive CD8⁺ T cells. However, while free peptides in solution loaded onto DC class II molecules could stimulate IL-2 production by CD4⁺ T cells as efficiently as peptides derived from endocytosed Ag, they could not stimulate induction of cytotoxic responses by CD8⁺ T cells to Ag delivered in liposomes into the same DC. Signals requiring class II molecules loaded with endocytosed Ag, but not free peptide, were inhibited by methyl- β -cyclodextrin, which depletes cell membrane cholesterol. CD4⁺ T cell signals thus require class II molecules in cholesterol-rich domains of DC for induction of CD8⁺ T cell responses to exogenous Ag by inducing DC to process this Ag for class I presentation. *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 1172–1180.

Dendritic cells (DC)³ induce primary responses of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (1). Ag taken up by DC is processed in endosomes and expressed at the cell surface in the form of peptides associated with MHC class II molecules, which stimulate CD4⁺ Th cells (2, 3). MHC class I-associated peptides, necessary for induction of responses of CD8⁺ T cells, were originally thought to be derived largely from endogenously synthesized proteins, such as viral Ag (4). It is now established that Ag presented to CD8⁺ T cells by DC may be acquired by endocytosis of exogenous Ag of several types. These Ag include those derived from infectious agents, dying cells, proteins associated with inert particles (5, 6), heat shock proteins (7, 8), or immune complexes (9, 10). Class I presentation of exogenous Ag usually requires its entry into the cytosol (9, 11), and is also called cross-priming (12), or cross-presentation (13). CD8⁺ T cell activation by cross-priming appears to be facilitated by the participation of Th cells (14,

15). Importantly, Th cell-dependent cytotoxic responses require the presentation of both class II-restricted and class I-restricted Ag by the same DC (16). This has led to the idea that Th cells actively modify DC, converting them into effective stimulators for induction of CTL from CD8⁺ cytotoxic precursors, and is part of a process called “conditioning” (17) or “licensing” (18) of DC. Th cells have been proposed to license DC for presentation of exogenous or endogenous Ag to CD8⁺ T cells in a way that depends on ligation of the CD40 molecules on DC (17, 19, 20). CD40 ligand-mediated cross-linking of CD40 molecules on DC led to high levels of expression of class II and costimulatory molecules and cytokine secretion by DC (21). However, CD40-independent pathways for induction of CTL by Th cells have also been documented (22, 23). Thus, we have an incomplete understanding of the mechanism by which Th cells license DC and the consequences of their licensing for CTL induction.

DC can present peptides capable of direct binding to class I molecules to CD8⁺ T cells, in the absence of Th cells (24). This suggests a role for Th cells in licensing DC by other means than inducing expression of costimulatory molecules or cytokine production, such as by regulating class I Ag presentation. Here we investigate a possible role for Th cells in licensing DC for stimulation of cognate CD8⁺ T cells by their effects on the transport or processing of Ag by DC, resulting in an increase in expression of class I-associated peptide from the Ag. This was evaluated as a function of the form of the DC-presented class II Ag for which the Th cells are specific. Cognate Ag for Th cells was made available to DC as: 1) free peptide, which binds to empty MHC molecules at the cell surface; 2) free intact protein Ag, which requires intracellular transport and partial proteolysis for presentation; or as 3) Ag in hapten-bearing liposomes targeted for binding and uptake by a FcR for the Fc portion of IgG of DC. Our group (10, 25) has reported that DC from mouse bone marrow precursors, grown for several days in culture in the presence of GM-CSF, efficiently endocytose liposomes opsonized by IgG. FcR cross-linking leads

Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de la Méditerranée, and Centre National de la Recherche Scientifique Groupement de Recherche 2352 “Immunociblage des Tumeurs,” Marseille, France

Received for publication June 27, 2001. Accepted for publication November 28, 2001.

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 These studies were supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Centre National de la Recherche Scientifique, by a grant from the Association Pour la Recherche sur le Cancer, and by Contracts QL61-1999-00622 and BMH4-CT97-2503 from the European Community. K.S. was supported by fellowships from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie and from the Association Pour la Recherche sur le Cancer.

² Address correspondence and reprint requests to: Dr. Lee Leserman, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Case 906, 13288 Marseille, Cedex 9, France. E-mail address: leserman@ciml.univ-mrs.fr

³ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cells; HEL, hen egg lysosome; MCD, methyl- β -cyclodextrin; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif.

to induction of maturation and expression of costimulatory molecules, and delivery of the Ag into compartments rich in class II molecules. Under such conditions, the Ag contained within liposomes is efficiently presented in the context of class II molecules and leads to stimulation of Ag-specific TCR-transgenic CD4⁺ T cells, even at very low levels of Ag (25). When DC were maintained in culture for periods longer than ~12 days, they “spontaneously” (that is, without T cell help) presented class I-associated peptides from immune complexes (9), or FcR-targeted liposomes (10), to CD8⁺ T cells and induced CTL activity by these cells. Nevertheless, while bone marrow-derived DC harvested as soon as 4 days after initiation of DC culture presented exogenous Ag in the context of class II molecules to CD4⁺ T cells and stimulated the CD4⁺ T cells to produce lymphokines (10, 25), these short-term cultured DC very poorly stimulated CD8⁺ T cells specific for the same Ag (10). Known potent stimulators of the phenotypic maturation of DC, including LPS, agonist Abs to CD40, double-stranded RNA and IFN- γ , were unable to transform these short-term cultured DC into cells capable of inducing CTL activity in naive CD8⁺ T cells (10). Class I presentation of exogenous Ag thus appears not to be a constitutive, but rather an inducible, property of DC.

We show in the present study that CD4⁺ T cells recognizing certain forms of cognate class II-associated Ag presented by short-term cultured DC are remarkably efficient in licensing DC for the presentation to CD8⁺ T cells of exogenous class I-restricted liposome-encapsulated Ag taken up by the FcR. The CD4 T cell signal provided to the DC is particular in that it requires peptide/class II complexes formed as a result of endocytosis. CD4 T cell signaling subsequently induces proteasome- and TAP-dependent Ag presentation in association with class I molecules, presumably following movement of Ag from endocytic vesicles to the cytosol. Those molecules that are necessary for signaling DC for class I presentation to CD8⁺ T cells resist extraction by dilute detergent and are sensitive to cholesterol depletion from the surface of DC. This is consistent with their concentration in cholesterol-rich lipid domains. We show that an important role of Th in licensing DC depends on engagement of these molecules and results in up-regulation of the expression of class I-associated peptides by DC for stimulation of cognate CD8⁺ T cells.

Materials and Methods

Mice, cells and Abs

OT-I mice (26) have CD8⁺ T cells transgenic for a TCR specific for the chicken OVA_{257–264} (SIINFEKL) peptide in the context of H-2K^b. OT-II mice (27) have CD4⁺ T cells transgenic for a TCR specific for OVA_{323–339} peptide in the context of H-2 I A^b. These mice were provided courtesy of B. Heath (Walter and Eliza Hall Institute, Parkville, Victoria, Australia). They were maintained on the C57BL/6 (B6) background. KB5C0 mice (Ref. 28; B10.BR background) have CD8⁺ T cells transgenic for a TCR specific for peptides from ubiquitous mouse proteins in the context of H-2K^b (29), and were provided by A.-M. Schmitt-Verhulst (Centre d’Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France). TCR-transgenic mice, which express the same TCR as 3A9 hybridoma specific for the immunodominant hen egg lysozyme (HEL) 46–61 peptide in the context of I A^k (Ref. 30; “3A9 mice”), were kindly provided by M. Davis (Stanford University, Palo Alto, CA). These were maintained on a CBA/J (CBA) background. Animals were treated according to institutional guidelines. T cells obtained from the spleens of transgenic mice 6–12 wk old were purified by passage over nylon wool columns.

The IL-2-dependent line CTLL (31) and the H-2^b RMA (32) lymphoma cell line were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FCS, 50 μ M 2-ME, 2 mM glutamine, and antibiotics, and for CTLL, with 10 U/ml of rIL-2 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

DC derived from bone marrow of B6 (H-2^b), CBA (H-2^k) or (CBA \times B6)F₁ mice (Iffa Credo, L’Arbresle, France), or TAP1^{-/-} mice on a B6 background (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), were cultured for 3 days in DMEM supplemented with 10% FCS, antibiotics, 2 mM glutamine,

50 μ M 2-ME, and 30% conditioned medium from NIH3T3 cells containing GM-CSF, provided by J. Davoust (Institut Curie, Paris, France), as described (33). They were then diluted 1/1 in the same medium and after an additional period of 3–4 days of culture, plastic nonadherent cells were washed, resuspended in supplemented RPMI, and used as APC. The phenotype of these cells has been reported previously (10).

U7.27.7, a hybridoma producing an anti-DNP Ab was provided by Z. Eshhar (Weizmann Institute, Rehovot, Israel). Use of the mAbs 10.2.16, specific for I A^k and 5F1, specific for H-2K^b have been described (10). All of these mAbs are mouse IgG2a. MR-1 (34) (provided by R. Noelle, Dartmouth University, Lebanon, NH) is a hamster mAb specific for CD154 (CD40L). 25-D1.16 is a mouse IgG1 mAb specific for SIINFEKL peptide associated with H-2K^b (35). It was kindly provided by A. Porgador and R. Germain (National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Bethesda, MD). These mAbs were purified over protein G-Sepharose columns (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Fluorescent mAbs specific for CD4, CD8, and CD69 were purchased from BD PharMingen (San Diego, CA).

Liposomes and other reagents

Liposomes were made from 65% (mol/mol) dimyristoyl phosphatidylcholine, 34.5% cholesterol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), and 0.5% DNP-caproyl-phosphatidylethanolamine (Molecular Probes, Eugene, OR) and formed by exposing lipids evaporated from organic solvents to 60 mg/ml (1.4 mM) OVA (grade VII, Sigma Aldrich) or 60 mg/ml OVA and 2 mg/ml (1.4 mM) synthetic HEL 46–61 peptide (HEL_{46–61}) (Centre d’Immunologie de Marseille-Luminy Protein Synthesis Facility) in PBS containing 10 mM CFSE (Molecular Probes) (10). Following several cycles of freezing and thawing, liposomes were extruded (Extruder; Lipex Biomembranes, Vancouver, British Columbia, Canada) 5–10 times through polycarbonate filters of 200 nm pore size at 40°C, followed by gel filtration to eliminate unencapsulated solute. Lipid vesicles were sterilized by filtration through 0.45- μ m filters. At the concentration of OVA and HEL_{46–61} used, individual liposomes contain ~3000 molecules of each encapsulated protein or peptide. The amount of liposome-associated Ag used for presentation experiments was obtained by serial dilutions of a stock preparation of these liposomes. All Ag stocks were tested for endotoxin with a *Limulus* amebocyte assay (BioWhittaker, Walkersville, MD), and if necessary, passed over Acticlean Etox columns (Sterogene Bioseparations, Carlsbad, CA) for endotoxin depletion.

The cell-permeable proteasome inhibitor MG-132 (Z-Leu-leu-Leu-CHO; Ref. 36) was purchased from Euromedex. Methyl- β -cyclodextrin (MCD) and Triton X-100 were from Sigma Aldrich.

Ag presentation assays

A total of 2×10^4 (or as indicated) DC were incubated in 100 μ l supplemented RPMI, in duplicate wells of 96-well flat-bottom tissue culture plates. Free OVA peptide SIINFEKL, HEL_{46–61} or HEL or OVA, or liposome-encapsulated Ag at the indicated concentrations were added overnight, in the presence or absence of targeting anti-DNP mAb (5 μ g/ml). DC were then washed before the addition of 10^4 T cells from CD4⁺ TCR-transgenic mice in supplemented RPMI for 72 h, at which time supernatant fluids were harvested for determination of IL-2 secretion based on a bioassay using the IL-2-dependent cell line CTLL. The IL-2 values in U/ml were derived from a standard curve using CTLL in the presence of recombinant mouse IL-2. Washed CTLL were incubated with harvested supernatants overnight and 0.25 μ Ci of [³H]thymidine (NEN, Boston, MA) were then added during 6 h.

For T cell cytotoxicity, 10^4 T cells from CD4⁺ TCR-transgenic and/or 2×10^4 T cells from CD8⁺ TCR-transgenic mice were incubated as above, and their capacity to induce cytotoxicity was evaluated after 5 days for OT-I, or 3 days in the case of KB5C20 T cells by the just another method test (37). Cells were incubated for 4 h with 5,000 RMA cells which were previously [³H]thymidine-labeled (0.25 μ Ci/ml) and OVA peptide SIINFEKL-pulsed (1 μ M) overnight and washed. In each case, cells were harvested and radioactivity in DNA was counted by scintillation. Under these conditions, 5,000 RMA cells incorporated 7,000–14,000 cpm. Lysis induced by OT-I cells in the presence of DC incubated without Ag was indistinguishable from that of RMA cells incubated alone. This value was taken as 100% viable cells. Maximum lysis using these cells was ~70% of incorporated [³H]thymidine, obtained by incubation of cells in Triton X-100 and DNase.

FACS analysis

For FACS determination of expression of all H-2 K^b molecules or the subpopulation of K^b molecules associated with the SIINFEKL peptide, 2×10^5 B6 DC were incubated as indicated, alone or with free OVA, free SIINFEKL, OVA encapsulated in DNP-bearing liposomes, or OVA in

DNP-bearing liposomes in the presence of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-DNP. In some experiments, after an overnight incubation at 37°C, cells were washed and incubated in the presence or absence of 2×10^5 IA^b/OVA peptide-specific CD4⁺ T cells from OT-II mice. After 24 h incubation, cells were washed and incubated at 4°C with anti-K^b mAb 5F1 or anti-K^b/SIINFEKL complex-specific mAb 25-D1.16. Cells were then washed and incubated with a biotin-labeled goat-anti-mouse IgG Ab for 30 min, then after washing, with FITC-labeled streptavidin. The IgG2a anti-DNP mAb used for FcR targeting of liposomes was not detected by this second Ab. Cells were then fixed in 2% formaldehyde and analyzed by FACS. When incubated with CD4⁺ T cells from OT-II mice, the fluorescence was gated on the DC population, which separated easily from T cells on the basis of the forward angle and side-scatter profiles.

For CD69 expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, DC were incubated with Ags as described for 24 h. Cells were then washed and incubated for 48 h with CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells. CD69 expression was determined by double staining of T cells with either PE-CD8- and FITC-CD69-specific mAb (in the case of CD8⁺ T cells) or PE-CD4- and FITC-CD69-specific mAb (in the case of CD4⁺ T cells).

Results

Expression of the SIINFEKL/Kb complex by DC incubated with CD4⁺ T cells recognizing their cognate Ag

We investigated the role of CD4⁺ Th cells in the expression by DC of the OVA-derived SIINFEKL peptide in association with the K^b molecule. We first calibrated the system to demonstrate the ability to discriminate binding of the SIINFEKL/Kb complex-specific mAb, 25-D1.16 (35), relative to the total number of H-2K^b molecules detected by a pan-specific anti-K^b mAb, 5F1 after incubating DC from B6 mice with 10 μM free SIINFEKL. The results are presented as a histogram showing all K^b molecules and those which express the SIINFEKL/Kb complex at the surface of DC at 24 h (Fig. 1A). As seen in Fig. 1B, DC incubated in the presence of increasing doses of free SIINFEKL showed marked increases in binding of the SIINFEKL/Kb specific mAb 25-D1.16. In Fig. 1C, DC were incubated as above for 24 h with the indicated concentrations of free SIINFEKL, free OVA, OVA in DNP-bearing liposomes without (Lipo OVA), or with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-DNP (FcR Lipo OVA). They were then incubated for an additional 24 h in the presence or absence of Th cells from OT-II mice. The presence of OT-II T cells did not result in increased K^b association of free SIINFEKL, but was required for expression of the SIINFEKL/Kb complex by DC incubated with exogenous OVA. When OVA was contained in liposomes targeted to the FcR of the DC the SIINFEKL epitope was expressed by DC in association with a larger number of K^b molecules than when the DC were incubated with free SIINFEKL at equivalent concentrations (Fig. 1C). This increase occurred without significant change in the total number of K^b molecules expressed by the cells, as revealed by mAb 5F1-binding (data not shown).

MHC class I-restricted presentation of FcR-targeted exogenous Ag to CD8⁺ T cells by DC is induced by CD4⁺ T cells recognizing their cognate Ag

We next evaluated the role of OT-II Th cells in the activation of OT-I cells and induction of cytotoxicity. DC were incubated as above with various forms of OVA in the presence or absence of OT-II cells and in the presence of OT-I cells. CD69 expression by OT-I cells was markedly induced to exogenous OVA only when they were incubated together with OT-II cells and was most efficient when OVA was taken up in opsonized liposomes. The presence of OT-II cells did not increase activation of OT-I cells exposed to DC incubated with free SIINFEKL (Fig. 2A). OT-II cells were also required for the presentation by DC of exogenous OVA, but not free SIINFEKL, for the induction of cytotoxicity by OT-I cells for SIINFEKL-pulsed targets (Fig. 2B). Presentation in unopsonized liposomes or as free OVA required at least 10,000 times

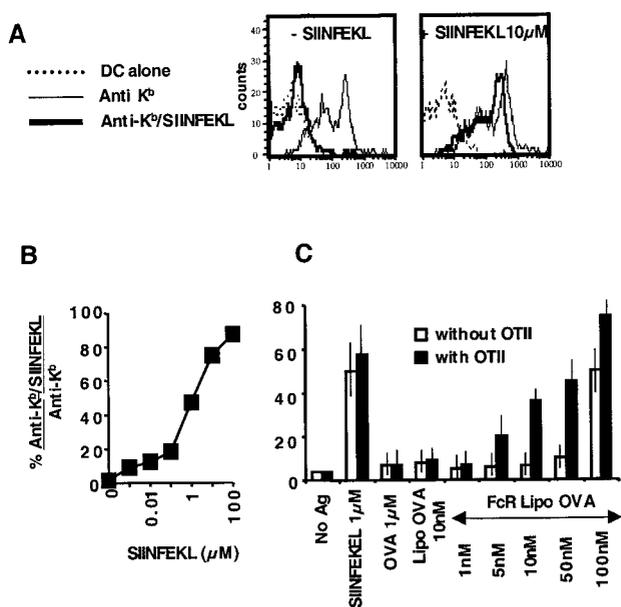


FIGURE 1. Expression of the SIINFEKL/Kb complex by DC incubated with CD4⁺ T cells recognizing their cognate Ag. *A*, B6 DC were incubated with or without 10 μM free SIINFEKL. After an overnight incubation, cells were incubated either with pan K^b (5F1) or K^b/SIINFEKL-specific (25-D1.16) mAbs before washing and staining. *B*, Percent of binding of 25-D1.16 to DC incubated with different concentrations of free SIINFEKL, relative to binding of 5F1 mAb. *C*, DC were incubated for 24 h, alone or with the indicated concentrations of free OVA, free SIINFEKL, OVA in DNP-bearing liposomes without (Lipo OVA), or with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-DNP (FcR Lipo OVA). They were then incubated for an additional 24 h in the presence or absence of Th cells from OT-II mice. DC were then stained for 25-D1.16 and 5F1 mAb binding and results expressed as the percent of K^b/SIINFEKL complexes as compared with total K^b molecule expression. Results are representative of two experiments. Error bars in this and subsequent figures represent SD of the mean for the experiment presented.

more Ag for cytotoxicity by OT-I cells than FcR-targeted liposomes (Fig. 2B). Neither 25-D1.16 mAb binding, CD69 expression, nor cytotoxicity were observed in the absence of OT-II T cells for levels of OVA less than 10 nM, or when either of the Ag-specific CD4⁺ or CD8⁺ T cells were replaced by T cells from non-TCR-transgenic mice. Similarly, OT-II cells incubated with DC and OVA but without OT-I cells were not cytotoxic in this assay (not shown). The results indicate that CD4 T cells responding to their cognate Ag taken up in DC by endocytosis after FcR binding are required in responses of CD8⁺ T cells to another peptide determinant derived from the same Ag presented in the context of MHC class I.

Ag presentation in the context of MHC class I molecules depends on cytoplasmic delivery, processing of endocytosed Ags by the proteasome and the presence of TAP1

We analyzed the role of Ag processing by DC in CTL induction. Bone marrow-derived DC from normal B6 mice or from B6 mice in which the TAP1 gene had been deleted (38) were incubated with the SIINFEKL peptide, or with OVA encapsulated in DNP-bearing liposomes targeted to the FcR with the anti-DNP mAb. The proteasome inhibitor, MG-132 (1 nM) was added to some wells. OT-I and CD4⁺ OVA-specific OT-II T cells were then added, and lysis by OT-I cells determined as in Fig. 2. Results for CTL responses are presented in Fig. 3A. The proteasome inhibitor MG-132 reduced induction of CTL (Fig. 3A) by normal DC for targeted liposomes containing OVA to levels equivalent to the very low presentation observed for the TAP1^{-/-} DC. Similar effects were seen

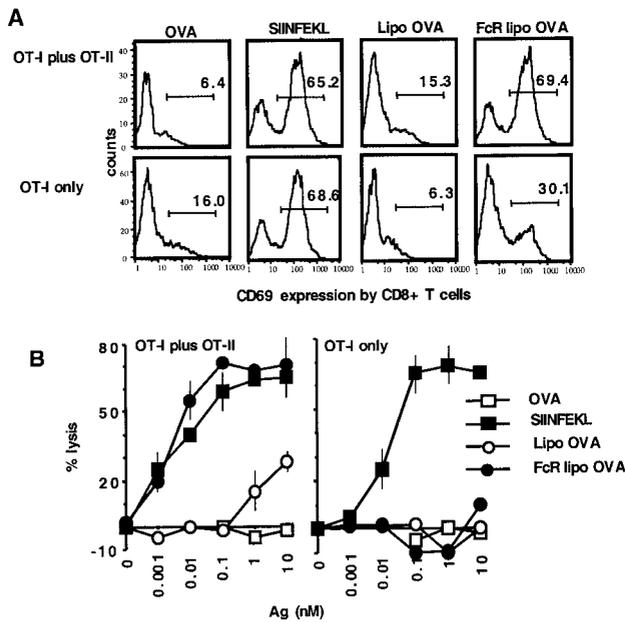


FIGURE 2. MHC class I-restricted presentation of FcR-targeted exogenous Ag to CD8⁺ T cells by DC is induced by CD4⁺ T cells recognizing their cognate Ag. *A*, DC were incubated with different forms of Ag as described in Fig. 1C. The concentration of all Ag was 10 nM. After overnight incubation, they were also incubated with 2×10^4 K^b/SIINFEKL-specific T cells from OT-I transgenic mice, in the presence or absence of T cells from OT-II mice. After 24 h incubation at 37°C, activation of the OT-I T cells was revealed by CD69 expression of CD8⁺ T cells. The number expressed as a percentage refers to the fraction of CD8⁺ T cells that are CD69⁺. Histograms represent data from 50,000 cells. Results are representative of three experiments. *B*, A total of 2×10^4 DC were incubated with different forms of Ag at different concentrations. After an overnight incubation at 37°C, cells were washed and incubated with 2×10^4 OT-I alone (*right panel*), or in the presence of 10^4 OT-II (*left panel*). CTL activity was determined after 5 days. Curves show the results of one experiment, representative of results of five independent experiments.

when another proteasome inhibitor, lactacystin, was used (data not shown). There was no effect of the proteasome inhibitor MG-132 on CTL induced by normal or TAP1^{-/-} DC pulsed with the OVA peptide SIINFEKL (Fig. 3A). There was also no effect of MG-132 on class II-mediated presentation by normal (or TAP1^{-/-} DC, not shown) to OT-II cells of Ag contained in FcR-targeted liposomes (Fig. 3B). Thus, induction of class I-restricted CTL by FcR-targeted Ag on DC requires passage of Ags contained in endocytic vesicles into the cytosol to be processed in a classical proteasome- and TAP-dependent mechanism for generation of SIINFEKL from OVA. Taken together, these results indicate that an important role of Th cells in CD8⁺ T cell activation is through their effects on the level of exogenous Ag processing and presentation in association with class I molecules of DC.

Most of the activity of CD4⁺ Th cells can be explained by their direct effect on presentation by DC of exogenous Ag in the context of class I

The data in Figs. 1–3 indicate that Th cells act on the DC not simply by up-regulating costimulatory molecules but in a manner necessary for proteasome-dependent OVA processing or presentation. Since the OVA peptide SIINFEKL was presented by DC to CD8⁺ OT-I T cells whether or not CD4⁺ OT-II T cells were present (Fig. 2B), the requirement for costimulation by DC for activation of CD8⁺ T cells may be modulated by a sufficient density of peptide ligand. The induction of cytotoxicity requiring Th

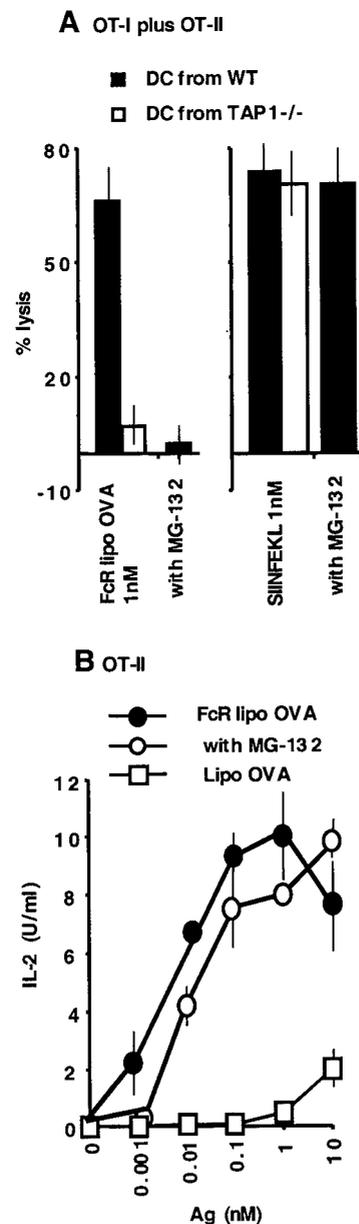


FIGURE 3. Induction by CD4⁺ T cells of MHC class I-mediated presentation of exogenous Ag by DC is proteasome- and TAP-dependent. *A*, A total of 2×10^4 DC from B6 or B6 TAP1^{-/-} bone marrow were incubated with 1 nM free SIINFEKL or 1 nM OVA encapsulated in DNP-bearing liposomes targeted to the FcR by anti-DNP mAbs, alone or together with 1 nM of the proteasome inhibitor MG-132 for 1 h at 37°C. DC were then washed and incubated with 10^4 T cells from OT-II and 2×10^4 T cells from OT-I mice. Cytotoxicity was evaluated as described in Fig. 2. *B*, DC were incubated with serial dilutions of FcR-targeted liposomes containing OVA with or without 1 nM proteasome inhibitor, or with untargeted liposomes, as described in *A*. Cells were thereafter incubated with 2×10^4 T cells from OT-II mice. IL-2 secreted by Ag-specific CD4⁺ T cells was measured after 48 h. Curves are representative of results obtained in two experiments.

cells could, however, be related to other effects of Th cells on CD8⁺ T cells, as by release of lymphokines (23), or by direct effects on the DC, related to their “conditioning” (17). To discriminate between these possibilities we incubated DC from CBA mice, together with DC from B6 mice, with FcR-targeted liposomes containing OVA. We added OT-I CD8⁺ T cells, restricted

by K^b, and provided help with HEL-specific Th cells, which recognize the HEL₄₆₋₆₁ in the context of IA^k (39). HEL was added as the free protein (100 nM). In this form it is taken up by fluid-phase endocytosis and processed in endocytic vesicles, but because this uptake is inefficient it requires higher Ag concentrations than when the Ag is encapsulated in targeted liposomes. We compared the induction of a cytotoxic response to that in cultures containing the same T cells incubated with DC from (CBA × B6)F₁ mice.

As shown in Fig. 4A, (CBA × B6)F₁ DC were able to induce cytotoxicity by OT-I cells at OVA concentrations 1000-fold lower than a mixture of CBA plus B6 DC, when HEL peptide/IA^k-specific Th cells were provided in the presence of HEL. This confirms and extends to another Ag the results presented in Fig. 2 using OT-II Th cells. The use of an independent Ag as a source of class II-associated peptides permits us to conclude that induction of cytotoxicity requires expression of both class II- and class I-restricted determinants on the same DC, as reported for cross-

presentation in vivo (27). Because in the presence of HEL both the CBA and F₁ DC fully stimulated IL-2 production by, and activated the 3A9 CD4⁺ T cells (Fig. 4B); the activity of Th cells necessary for induction of CTL appears to be directed to the DC, rather than the CD8⁺ T cells. Addition of LPS to the culture medium did not change this result (not shown), ruling out any possible participation of even the very low level of endotoxin in the HEL preparation to explain the stimulatory activity of the HEL. These data are in agreement with the report of Lu et al. (23), indicating that ILs secreted by CD4⁺ T cells cannot replace those cells for licensing of DC.

The activity of Th cells on DC resulted in increased efficiency of class I-restricted presentation of Ag by DC to induce a cytotoxic response. In Fig. 4C, we show that 1,500 DC were as effective at stimulating cytotoxicity by OT-I T cells in the presence of HEL-specific T cells and HEL as 25,000 DC with the same Th cells, but without HEL. The provision of cognate CD4⁺ T cell help is thus essential for the induction of CD8⁺ T cell cytotoxicity to OVA through acquisition by DC of the capacity to process the CD8 epitope. However, the action of the Th cells on induction of cytotoxicity was not confined to the processing of epitopes of exogenous Ag. The same F₁ DC were incubated with HEL-specific CD4⁺ cells and CD8⁺ T cells from KB5C20 transgenic mice, specific for a peptide derived from an endogenous DC protein presented in the context of K^b (28). We observed that a modest but reproducible increase in responses (2- to 4-fold reduction in the number of DC necessary to stimulate a response) was obtained when they were incubated with FcR-targeted liposomes in the presence of HEL, while the same liposomes had little effect in the absence of HEL (Fig. 4D). The K^b dependence of the responses of both OT-I and KB5C20 cells was confirmed by blocking with the anti-Kb mAb, 5F₁ (Figs. 4, C and D). OT-I responses dependent on 3A9 Th cells were also blocked by Ab to CD154 and IA^k, (data not shown), confirming the CD40 and class II dependence of the response. These data indicate that responses by CD8⁺ T cells specific for class I-associated peptides derived from endogenous Ag may also be helped by CD4⁺ T cells, though this help does not appear to be critical for the response as it appears to be for peptides derived from exogenous Ag.

Not all MHC class II-peptide complexes are equally effective at inducing CD4⁺ help for MHC class I-restricted Ag presentation by DC

The mechanism of interaction between Th cells and DC was investigated. As shown above, cytotoxicity by OT-I cells, absent without help, was efficiently induced to FcR-targeted OVA in the presence of HEL-specific Th cells and 100 nM free HEL (Fig. 5A). Surprisingly, induction of a cytotoxic response to OVA in opsonized DNP-bearing liposomes was not obtained when 100 nM free HEL₄₆₋₆₁ was used (Fig. 5A), instead of free HEL as a source of Ag for CD4⁺ specific T cells. Despite the lack of activity of free 46-61 in helping cytotoxicity of OT-I cells, coencapsulation of 46-61 with OVA in opsonized liposomes permitted efficient help for induction of cytotoxicity by OT-I cells, even at very low concentrations of both OVA and the HEL peptide (Fig. 5A). Strikingly, the inducible cytotoxic response to 1 nM OVA coencapsulated with equimolar HEL₄₆₋₆₁ in FcR-targeted liposomes was inhibited by free 100 nM HEL₄₆₋₆₁ (Fig. 5A), while this same concentration of free HEL₄₆₋₆₁ had no effect on presentation of free SIINFEKL to OT-I (Fig. 5A, inset, right panel).

In contrast to their differential effects in stimulating T cell help for cytotoxicity, both HEL and free HEL₄₆₋₆₁ promoted similar CD4⁺ T cell activation with respect to IL-2 secretion or expression of CD69 (Fig. 5B), when present at concentrations of 10 nM or

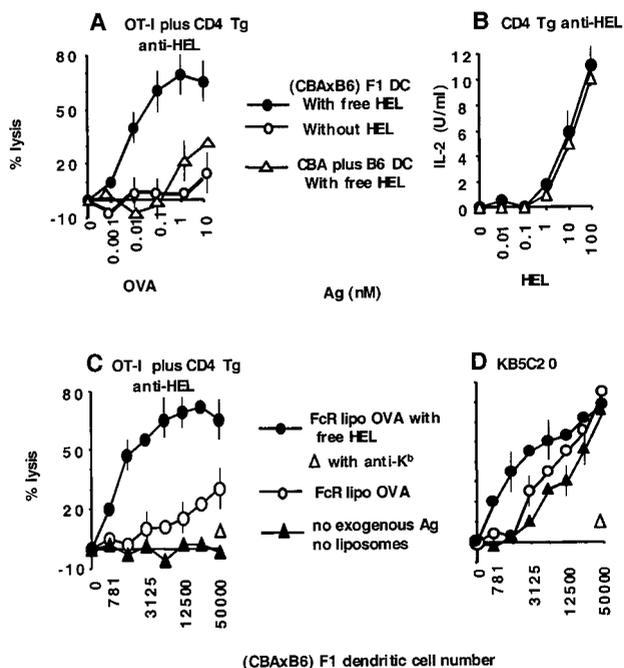


FIGURE 4. Most of the activity of CD4⁺ Th cells can be explained by their direct effect on presentation of exogenous Ag by DC. **A**, A total of 2×10^4 DC from (CBA × B6)F₁ mice or 10^4 DC from CBA plus 10^4 DC from B6 mice were incubated with different concentrations of OVA contained in DNP-bearing liposomes in the presence of 5 μg/ml of anti-DNP mAbs and 100 nM free HEL. After an overnight incubation, cells were washed and incubated with 10^4 HEL-specific CD4⁺ T cells from 3A9 mice and 2×10^4 CD8⁺ T cells from OT-I mice. After 5 days of culture, CTL activity against SIINFEKL-pulsed RMA target cells was read. **B**, A total of 2×10^4 DC from (CBA × B6)F₁ mice or 10^4 DC from CBA plus 10^4 DC from B6 mice were incubated with various concentrations of free HEL. After an overnight incubation, cells were washed and incubated with 10^4 HEL-specific CD4⁺ T cells from 3A9 mice. IL-2 secreted by 3A9 T cells was measured after 48 h. **C** and **D**, Different numbers of (H-2k × b)F₁ DC were incubated alone or with 10 nM OVA in DNP-bearing liposomes with 5 μg/ml of anti-DNP mAbs in the absence or the presence of 100 nM free HEL. After overnight incubation, cells were washed and incubated with 10^4 HEL-specific CD4⁺ T cells from 3A9 mice, and 2×10^4 CD8⁺ T cells from OT-I (**C**), or from KB5C20 (**D**) mice. In control experiments, 10 μg/ml anti-K^b (5F₁) Ab was also added. Cytotoxicity was after 5 days of culture for T cells from OT-I mice or 3 days for T cells from KB5C20 mice as in **A** above. SIINFEKL-pulsing of RMA cells did not affect lysis by KB5C20 cells. Curves are from a single experiment representative of results obtained in five experiments.

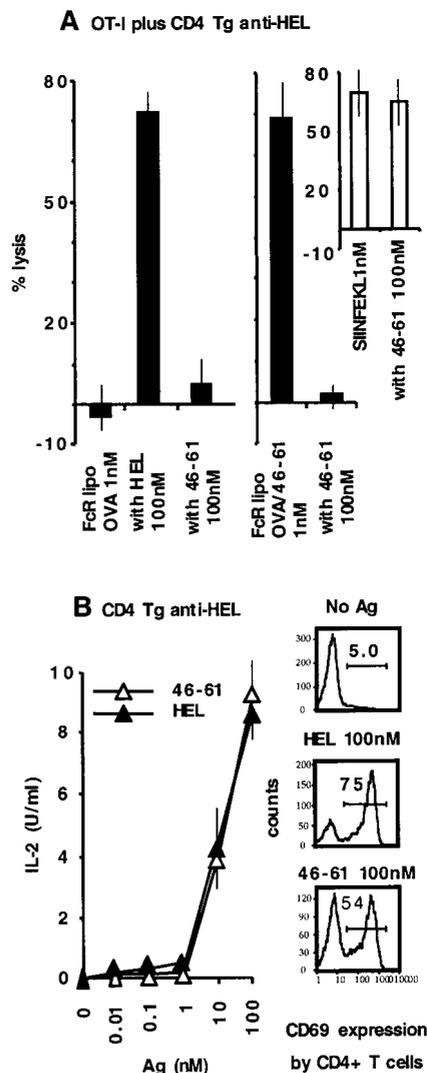


FIGURE 5. Induction of cytotoxicity depends on the manner in which class II-peptide complexes are formed. *A*, A total of 2×10^4 (H-2k \times b) F_1 DC were incubated with 1 nM OVA contained in FcR-targeted liposomes, alone or with 100 nM free HEL, or with 100 nM free HEL₄₆₋₆₁ as indicated (*left panel*); with 1 nM OVA and 46-61, both contained in FcR-targeted liposomes, without or with 100 nM free HEL₄₆₋₆₁ (*right panel*); or with 1 nM SIINFEKL without or with 100 nM free HEL₄₆₋₆₁, (*inset in right panel*). After an overnight incubation, cells were washed and incubated with 2×10^4 OVA-specific (OT-I) and 10^4 HEL-specific (3A9) T cells. After an additional 5 days of culture, cytotoxicity was determined as in Fig. 2. *B, left panel*, A total of 2×10^4 (H-2k \times b) F_1 DC were incubated with different amounts of free HEL or HEL₄₆₋₆₁ and 2×10^4 3A9 T cells were added for 48 h and IL-2 was measured as described in Fig. 4. *B, right panel*, Percentage of 3A9 CD4⁺ T cells positive for CD69 after 24 h incubation was evaluated with PE-labeled CD4- and FITC-labeled CD69-specific Abs. The number expressed as percentage refers to the fraction of CD4⁺ T cells that are CD69⁺.

higher. This confirms that free HEL₄₆₋₆₁ stably binds to accessible IA^k molecules, as previously shown for B lymphoma cells using radiolabeled peptides (40). We conclude that class II molecules of DC that were loaded with peptides derived from free HEL, or liposome-encapsulated HEL₄₆₋₆₁ or HEL in the interior of the endocytic pathway, elicit different responses from Ag-specific CD4⁺ T cells with respect to DC activation for class I presentation than class II molecules loaded with free HEL₄₆₋₆₁ at the cell surface.

Stimulation of CD4⁺ T cells by DC which endocytosed Ag is inhibited by an agent that disrupts cholesterol-rich lipid domains on DC

Naive T cells depend for their activation on contact with Ag peptides on the surface of DC. TCR-clustering in cholesterol-rich lipid domains has been reported to follow its cross-linking, and may be necessary for T cell activation (41). TCR cross-linking in Ag-naive CD4⁺ T cells would be expected to be affected by class II-peptide concentration and organization in DC (3). We consequently evaluated the role of cholesterol rich lipid domains of DC in the stimulation of Th cells. Cholesterol-rich domains resist extraction by cold Triton X-100 (reviewed in Ref. 42). DC which had either been incubated overnight with FcR-targeted HEL₄₆₋₆₁ in liposomes or HEL, or pulsed with HEL₄₆₋₆₁ peptide were treated with low concentrations of Triton X-100 for 30 min, followed by washing and incubation with HEL-specific CD4⁺ T cells. As shown in Fig. 6A (*left panel*), IL-2 production by Th cells in contact with DC incubated with 10 nM free HEL₄₆₋₆₁ was inhibited by treatment of those DC to dilute Triton X-100. In the same experiment, Th incubated with DC incubated with low concentrations (0.1 nM) of HEL₄₆₋₆₁ in targeted liposomes, or 10 nM HEL taken up by endocytosis were insensitive to the effects of Triton X-100 treatment of those DC. Concentrations greater than 0.001% Triton X-100 (10 μ l Triton X-100/L in the incubation solution) were toxic for DC. We also treated DC with MCD after Ag uptake. This agent chelates membrane cholesterol and disperses membrane rafts (43, 44). As shown in Fig. 6A (*right panel*), IL-2 production by Th cells stimulated by HEL or FcR-targeted HEL₄₆₋₆₁ was abolished after MCD treatment. Effective doses of the same drug had no effect on activation of CD4⁺ T cells by DC treated after HEL₄₆₋₆₁-pulsing. Together, these data demonstrating different susceptibility to pharmacological inhibition indicate that class II-associated peptides exist in different environments, depending on whether the peptide was loaded onto class II molecules in endocytic vesicles or at the cell surface.

We next examined the effect of cholesterol depletion of DC on induction of cytotoxic responses by CD8⁺ T cells (Fig. 6B). CTL activity induced in OT-I T cells by DC presentation of OVA and HEL₄₆₋₆₁ contained in FcR-targeted liposomes in the presence of HEL-specific CD4⁺ T cells was abolished when the DC were incubated with 5 mM MCD after Ag uptake (*left panel*). These results strongly suggest that intracellular transport and processing of endocytosed Ag for class I presentation by DC highly depends on CD4⁺ T cell interaction with class II-peptide complexes concentrated in cholesterol-rich domains. The presentation of SIINFEKL was only slightly affected when DC were treated with MCD after SIINFEKL pulsing (*right panel*). This indicates that MCD acted on DC, rather than on the T cells that were added to cultures after a washing step. The data also suggest that class I-peptide complexes of DC need not be concentrated in cholesterol-rich domains for stimulation of CTL responses by CD8⁺ T cells.

Discussion

In this paper, we investigate the process whereby CD4⁺ T cells "license" DC for stimulation of cytotoxic responses by CD8⁺ T cells to exogenous Ag. We had previously shown that binding of OVA-containing liposomes to the FcR was necessary for the CD4 T cell-independent presentation of OVA in the context of class I by long-term cultured DC (10), as it was for presentation of immune complexes by long-term cultured DC and DC lines (9). Here we show that CD4⁺ T cells recognizing their cognate Ag presented by short term cultured DC increased expression by the DC of the

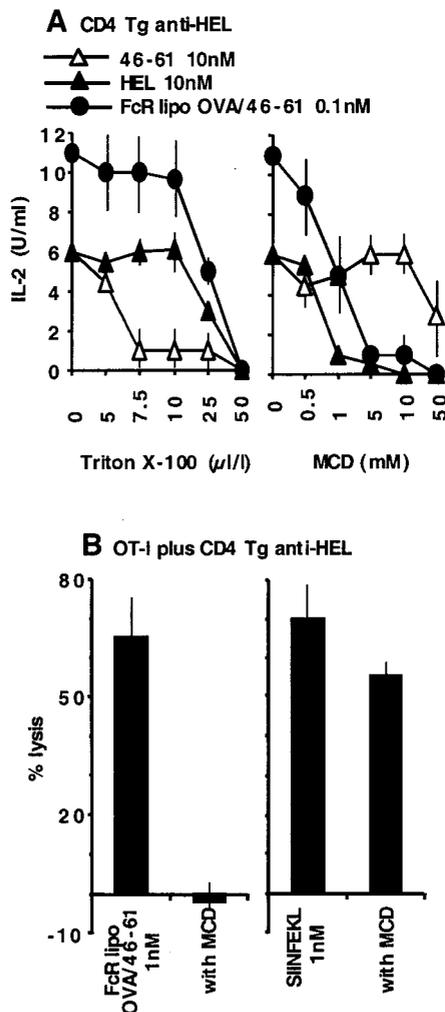


FIGURE 6. CD4⁺ T cell activation of DC that endocytosed Ag can be inhibited by treating DC with MCD but not with dilute Triton X-100. *A*, A total of 2×10^4 (H-2k \times b)F₁ DC were incubated with the indicated concentrations of free HEL or HEL₄₆₋₆₁, or OVA and HEL₄₆₋₆₁ coencapsulated in FcR-targeted liposomes. After overnight incubation, they were washed and treated with different concentrations of Triton X-100 for 30 min at 4°C, or with indicated concentrations of MCD in complete medium for 1 h at 37°C, before re-washing and addition of 2×10^4 HEL-specific CD4⁺ T cells. After 48 h incubation, supernatants were harvested for IL-2 determination, as described in Fig. 4. Data are representative of those obtained in five different experiments. *B*, A total of 2×10^4 (H-2k \times b)F₁ DC were incubated overnight with 1 nM OVA and HEL₄₆₋₆₁ contained in FcR-targeted liposomes (*left panel*), or with 1 nM free SIINFEKL (*right panel*). Cells were then untreated or incubated with 5 mM MCD for 1 h before addition of OT-I T cells with HEL-specific 3A9 Th cells. Representative of five experiments.

fraction of class I-molecules associated with the SIINFEKL peptide processed from OVA encapsulated in opsonized liposomes (Fig. 1C), without markedly increasing the total expression of class I molecules (not shown). This increase of SIINFEKL presentation was not mediated by induction of the immunoproteasome, because it is constitutively expressed in DC, even if up-regulated during maturation of DC (45). Furthermore, treatment of DC with IFN- γ did not eliminate the requirement for CD4⁺ T cells interacting with DC for class I presentation (Ref. 10 and data not shown). These Th cells were also necessary for up-regulation of CD69 expression and cytotoxicity by naive OT-I CD8⁺ T cells (Fig. 2, A and B) to OVA endocytosed by DC. This indicates that licensing

of DC by Th cells for the stimulation of CD8⁺ T cells augments the expression of class I-associated peptides by DC, by an effect of Th cells on the transfer to the cytosol from endocytic vesicles, processing or transport of exogenous Ag. This does not rule out other roles for Th interacting with DC which contribute to the process of licensing, but it seems to be a very important component of licensing for responses to exogenous Ag. Although we observed that Th cells were not necessary for induction of OT-I cytotoxicity to DC pulsed with SIINFEKL (Fig. 2B), or for presentation of an endogenous self-peptide to alloreactive KB5C20 cells (Fig. 4D), both of these responses occurred at 2- to 10-fold lower Ag concentrations when Th cells were stimulated by a cognate ligand presented by DC. These effects on cytotoxicity measured after several days of culture may be related to Th cell effects on DC survival and persistence of Ag presentation, which appear to be dictated in part by CD154-CD40 interactions (46).

DC bearing class II molecules loaded with either endocytosed HEL or exogenous free HEL₄₆₋₆₁ peptide at levels of 10 nM or higher stimulated cytokine release by 3A9 CD4⁺ T cells (Fig. 5B), confirming the published observation that the HEL₄₆₋₆₁ peptide is a full agonist of 3A9 Th cell stimulation for IL-2 production (47). Nevertheless, binding of HEL₄₆₋₆₁ as an exogenous peptide appeared insufficient for transmission of signals from the Th cells into the DC. These CD4⁺ T cells failed to stimulate DC to present peptides derived from exogenous OVA in association with class I molecules. Indeed, exogenous HEL₄₆₋₆₁ inhibited the efficient CD4⁺ T cell-dependent CD8⁺ T cell stimulation by HEL₄₆₋₆₁ peptide encapsulated in liposomes delivered into endocytic vesicles after FcR-binding (Fig. 5A). The fact that DC that have endocytosed peptides are differently susceptible to pharmacological manipulation by MCD and Triton X-100 than cells that have been pulsed with peptides strongly indicates that different pools of class II molecules have been addressed. These data are consistent with the hypothesis that some signals from Th cells necessary for licensing DC originate from the TCR of Th cells and pass through Ag-loaded class II molecules concentrated in cholesterol rich domains of DC. These signals may be transmitted through class II molecules alone or in conjunction with signals through other molecules known to be concentrated in lipid domains, including CD40 (48).

Cross-linking of class II molecules on human myelomonocytic cells led to phosphorylation of associated Src-family kinases, in a manner which required the presence of class II molecules in lipid rafts (43). It is interesting that class II molecules of B cells have been reported to acquire the capacity to transduce signals leading to phosphorylation of Src-kinases and Ca²⁺ mobilization by virtue of their association with immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-motifs in Ig-associated I α and I β (49). We are investigating the possibility that a role analogous to ITAM of I α and I β may be played by FcR-associated ITAM sequences in signaling via class II molecules after re-expression at the cell surface in cholesterol-rich domains. The combined roles of the FcR as an Ag receptor, as a molecule signaling for the maturation of DC and as a transducer of signals from the TCR of Th cells may collectively account for its remarkable efficacy as a target for Ag delivery for both class II- and I-restricted responses.

These experiments suggest a model for at least part of the role of CD4⁺ T cells in licensing DC for cross-presentation of exogenous Ag to CD8⁺ T cells. Ag binding to a suitable receptor on DC is taken up by endocytosis into vesicles where, following release and partial proteolysis, peptides associate with relevant class II molecules. These peptide-loaded class II molecules are expressed at the cell surface concentrated in cholesterol rich domains, probably in association with other molecules necessary for signaling. Contact with cognate Th cells results in cross-linking of

the TCR and up-regulation of ligands including CD 154 in these cells, inducing stimulation of DC through class II, CD40, and additional molecules. These signals open endocytic compartments in DC, releasing remaining Ag into the cytosol where it follows the classical proteasome and TAP-dependent class I pathway for presentation. DC pulsed with peptides that associate with class II molecules at the DC surface are not concentrated in lipid domains. At sufficiently high concentrations these class II-peptide complexes activate cognate Th cells, but do not transmit signals from these cells permitting presentation of class I-associated Ag by DC. In line with these results it is interesting that administration in mice of tumor Ag-derived class II associated peptides, which can stimulate T cell-dependent delayed hypersensitivity and Ab responses, has recently been shown to enhance rather than inhibit tumor growth (50). Taken together, these data suggest that the manner in which class II molecules of DC are loaded with Ag-derived peptide may have important consequences for immune responses they induce.

Acknowledgments

We thank Laurent Giraud for technical assistance, Hervé Sanchez for animal care, Anne-Marie Schmitt-Verhulst, Sylvie Guerder, Hai-Tao He, Philippe Naquet, and Philippe Pierre for helpful discussions and criticism of the manuscript, and Bernard Malissen for support and encouragement.

References

- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
- Pierre, P., and I. Mellman. 1998. Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93:1135.
- Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman, and I. Mellman. 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288:522.
- Townsend, A. R., F. M. Gotch, and J. Davey. 1985. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell* 42:457.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone. 1999. Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr. Opin. Immunol.* 11:314.
- Reimann, J., and R. Schirmbeck. 1999. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol. Rev.* 172:131.
- Castellino, F., P. E. Boucher, K. Eichelberg, M. Mayhew, J. E. Rothman, A. N. Houghton, and R. N. Germain. 2000. Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J. Exp. Med.* 191:1957.
- Singh-Jasuja, H., R. E. Toes, P. Spee, C. Munz, N. Hilf, S. P. Schoenberger, P. Ricciardi-Castagnoli, J. Neeffjes, H. G. Rammensee, D. Arnold-Schild, and H. Schild. 2000. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J. Exp. Med.* 191:1965.
- Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Théry, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena. 1999. Fc γ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189:371.
- Machy, P., K. Serre, and L. Leserman. 2000. Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fc γ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 30:848.
- Rodriguez, A., A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena. 1999. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1:362.
- Bevan, M. J. 1976. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol.* 117:2233.
- Carbone, F. R., C. Kurts, S. R. Bennett, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1998. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol. Today* 19:368.
- Kurts, C., F. R. Carbone, M. Barnden, E. Blanas, J. Allison, W. R. Heath, and J. F. Miller. 1997. CD4⁺ T cell help impairs CD8⁺ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J. Exp. Med.* 186:2057.
- Ossendorp, F., E. Mengede, M. Camps, R. Filius, and C. J. Melief. 1998. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J. Exp. Med.* 187:693.
- Guerder, S., and P. Matzinger. 1992. A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance. *J. Exp. Med.* 176:553.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474.
- Lanzavecchia, A. 1998. Immunology: licence to kill. *Nature* 393:413.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, and C. J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 180:1263.
- Bachmann, M. F., B. R. Wong, R. Josien, R. M. Steinman, A. Oxenius, and Y. Choi. 1999. Trance, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J. Exp. Med.* 189:1025.
- Lu, Z., L. Yuan, X. Zhou, E. Sotomayor, H. I. Levitsky, and D. M. Pardoll. 2000. CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 191:541.
- Fayolle, C., U. M. Abdel-Motal, L. Berg, E. Deriaud, M. Jondal, and C. Leclerc. 1996. Induction of cytotoxic T-cell response by optimal-length peptides does not require CD4⁺ T-cell help. *Immunology* 89:41.
- Serre, K., P. Machy, J.-C. Grivel, G. Jolly, N. Brun, J. Barbet, and L. Leserman. 1998. Efficient presentation of multivalent antigens targeted to various cell surface molecules of dendritic cells and surface Ig of antigen-specific B cells. *J. Immunol.* 161:6059.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1997. Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help. *J. Exp. Med.* 186:65.
- Schonrich, G., U. Kalinke, F. Momburg, M. Malissen, A. M. Schmitt-Verhulst, B. Malissen, G. J. Hammerling, and B. Arnold. 1991. Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 65:293.
- Guimezanes, A., G. A. Barrett-Wilt, P. Gulden-Thompson, J. Shabanowitz, V. H. Engelhard, D. F. Hunt, and A. M. Schmitt-Verhulst. 2001. Identification of endogenous peptides recognized by in vivo or in vitro generated alloreactive cytotoxic T lymphocytes: distinct characteristics correlated with CD8 dependence. *Eur. J. Immunol.* 31:421.
- Ho, W., M. Cooke, C. Goodnow, and M. Davis. 1994. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 179:1539.
- Gillis, S., M. M. Ferm, W. Ou, and K. A. Smith. 1978. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* 120:2027.
- Karre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319:675.
- Winzler, C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V. S. Zimmermann, J. Davoust, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185:317.
- Durie, F. H., R. A. Fava, T. M. Foy, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, and R. J. Noelle. 1993. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science* 261:1328.
- Porgador, A., J. W. Yewdell, Y. Deng, J. R. Bennink, and R. N. Germain. 1997. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 6:715.
- Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A. L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761.
- Matzinger, P. 1991. The JAM test: a simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J. Immunol. Methods* 145:185.
- Van Kaer, L., P. G. Ashton-Rickardt, H. L. Ploegh, and S. Tonegawa. 1992. Tap1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4⁺8⁺ T cells. *Cell* 71:1205.
- Allen, P. M., D. J. Strydom, and E. R. Unanue. 1984. Processing of lysozyme by macrophages: Identification of the determinants recognized by two T-cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2489.
- Nelson, C., S. Petzold, and E. Unanue. 1994. Peptides determine the lifespan of MHC class II molecules in the antigen-presenting cell. *Nature* 371:250.
- Montixi, C., C. Langlet, A. M. Bernard, J. Thimonier, C. Dubois, M. A. Wurbel,

- J. P. Chauvin, M. Pierres, and H. T. He. 1998. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* 17: 5334.
42. London, E., and D. A. Brown. 2000. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta.* 1508:182.
43. Huby, R. D., R. J. Dearman, and I. Kimber. 1999. Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 274:22591.
44. Anderson, H. A., E. M. Hitbold, and P. A. Roche. 2000. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nature Immunol.* 1:156.
45. Macagno, A., M. Gilliet, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, F. O. Nestle, and M. Groettrup. 1999. Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur. J. Immunol.* 29:4037.
46. Miga, A. J., S. R. Masters, B. G. Durell, M. Gonzalez, M. K. Jenkins, C. Maliszewski, H. Kikutani, W. F. Wade, and R. J. Noelle. 2001. Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions. *Eur. J. Immunol.* 31:959.
47. Viner, N. J., C. A. Nelson, B. Deck, and E. R. Unanue. 1996. Complexes generated by the binding of free peptides to class II MHC molecules are antigenically diverse compared with those generated by intracellular processing. *J. Immunol.* 156:2365.
48. Vidalain, P.-A., O. Azocar, C. Servet-Delprat, C. Rabourdin-Combe, D. Gerlier, and S. Manié. 2000. CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *EMBO J.* 19:3304.
49. Lang, P., J. C. Stolpa, B. A. Freiberg, F. Crawford, J. Kappler, A. Kupfer, and J. C. Cambier. 2001. TCR-induced transmembrane signaling by peptide/MHC class II via associated Ig- α/β dimers. *Science* 291:1537.
50. Siegel, C. T., K. Schreiber, S. C. Meredith, G. B. Beck-Engeser, D. W. Lancki, C. A. Lazarski, Y. X. Fu, D. A. Rowley, and H. Schreiber. 2000. Enhanced growth of primary tumors in cancer-prone mice after immunization against the mutant region of an inherited oncoprotein. *J. Exp. Med.* 191:1945.

Discussion de l'article 3

Nous montrons que les lymphocytes T CD4, reconnaissant leur antigène présenté par les DC, permettent à ces dernières d'exprimer les complexes classe I/peptide pour lesquels les lymphocytes T CD8 sont spécifiques. Tout comme nous l'avons précédemment décrit cette présentation aux lymphocytes T CD8 est dépendante du protéasome et de TAP, suggérant que l'antigène internalisé par les FcR, doit être transporté dans le cytoplasme afin que des peptides puissent s'associer aux molécules de classe I naissantes, dans le réticulum endoplasmique. Il semblerait donc que l'événement limitant soit l'accessibilité de l'antigène aux compartiments de chargement en peptides des molécules de classe I, qui est induite lors de l'interaction entre les DC et les lymphocytes T CD4.

Ceci est en accord avec les modèles permettant d'observer soit *in vitro* l'activation de lymphocytes T CD8, soit *in vivo*, l'induction de réponses T cytotoxiques de façon indépendante des lymphocytes T CD4. En effet, l'immunisation de souris avec des peptides qui se fixent directement sur les molécules de classe I (Fayolle et al., 1996a), ou avec des protéines HSP couplée à l'antigène (Huang et al., 2000b), ou avec des toxines bactériennes (*Bordetella pertussis*) couplées à des peptides (Fayolle et al., 1996b), ou avec des archaéosomes contenant l'antigène (Krishnan et al., 2000), génèrent des réponses cytotoxiques efficaces en absence de lymphocytes T CD4. L'élément commun de ces systèmes de transport d'antigènes est leur capacité à délivrer ces derniers directement dans le cytoplasme.

De la même manière, grâce à des expériences complémentaires réalisées en collaboration avec le groupe de Jan Wilschut (Groningen, Pays Bas), nous avons utilisé des virosomes qui sont des enveloppes virales reconstituées, où le matériel génétique est substitué par un antigène. Ces virosomes formés, à partir du virus de l'influenza, conservent les propriétés du virus natif, grâce à l'hémagglutinine, une glycoprotéine présente dans leur enveloppe. Ils se fixent puis entrent dans les cellules, et fusionnent avec les membranes des vésicules de la voie d'endocytose à pH acide, pour délivrer leur contenu (l'antigène) dans le cytoplasme. Des DC prises à jour 5 de culture, présentent alors très efficacement l'antigène, à des lymphocytes T CD8, en absence de lymphocytes T CD4 (Bungener et al., 2002)*. Ce système a été très utile dans notre modèle afin de confirmer que l'événement limitant de la présentation par les DC aux lymphocytes T CD8, pouvait être l'accessibilité de l'antigène exogène aux compartiments classiques de la présentation dans le contexte des molécules de classe I.

* Bungener, L., Serre, K., Bijl, L., Leserman, L., Wilschut, J., Deamen, T. and Machy, P. *Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells : efficient MHC class I but not class II presentation of the antigen is dependent on the membrane fusion activity of the virosomes.* Vaccine, 2002, In press

Les conséquences de l'interaction entre lymphocytes T CD4 et cellules dendritiques sont dépendantes de la forme de l'antigène reçu par ces dernières

Les lymphocytes T CD4 activés, par la reconnaissance de leur antigène, ne permettent pas systématiquement aux DC d'acquérir la propriété de présentation dans le contexte des molécules de classe I. En effet, le signal délivré par les lymphocytes T CD4, lors de leur interaction avec les DC, est très dépendant de la forme d'antigène reçu par ces mêmes DC. Les liposomes contenant l'antigène et capturés par les FcR permettent l'expression des complexes classe II/peptide dans des domaines riches en cholestérol, tout comme celle obtenue avec de fortes concentrations d'antigènes solubles. Ces derniers sont nécessaires aux lymphocytes T CD4 pour délivrer, en retour, un signal dans les DC. En revanche, lorsque les DC sont incubées en présence du peptide (du même antigène) et pour lequel ces lymphocytes T CD4 sont spécifiques, bien qu'ils soient activés (à fortes concentrations), ils ne permettent pas le passage de l'antigène dans le cytoplasme des DC, et donc l'activation des lymphocytes T CD8. Un peptide soluble, qui se fixe directement sur les molécules de classe II, est exclu des microdomaines et il ne permet pas, non plus, l'activation des DC.

Outre les aspects quantitatifs expliquant l'efficacité des FcR à capturer une forme vésiculaire de l'antigène et les aspects qualitatifs, sur l'agrégation de ces récepteurs induisant l'activation des DC, il faut donc tenir compte d'un nouveau paramètre qui est la manière dans laquelle les complexes classe II/peptide sont exprimés à la surface cellulaire.

Dialogue entre les lymphocytes T CD4 et les cellules dendritiques

Nous n'avons pas encore identifié les molécules qui, lors de l'interaction entre les lymphocytes T CD4 et les DC, délivrent le signal permettant à ces dernières de redistribuer les antigènes afin qu'ils soient présentés dans le contexte des molécules de classe I. Néanmoins, des anticorps spécifiques des molécules de classe II, avec des anticorps agonistes spécifiques de CD40, en présence de thapsigargine (qui mobilise le calcium intracellulaire), peuvent remplacer les lymphocytes T CD4 (résultats non montrés). En effet, la combinaison anti-IA^k/anti-CD40/thapsigargine provoque, le passage des antigènes, encore concentrés dans les vésicules endocytiques, dans le cytoplasme, ce qui permet aux DC de présenter des peptides aux lymphocytes T CD8.

Dans certaines études, les lymphocytes T CD4 peuvent être effectivement remplacés par des anticorps agonistes spécifiques de CD40 (Ridge et al., 1998). En revanche, dans un système très proche de celui que nous utilisons, d'autres auteurs ont montré que l'interaction entre les lymphocytes T CD4 et les DC pouvait en partie être indépendante de CD40 (Lu et al., 2000). Ces résultats suggèrent que d'autres molécules que CD40 peuvent être localisées dans ces domaines riches en cholestérol et impliquées dans le signal intracellulaire délivré dans les DC lors de l'interaction avec les lymphocytes T CD4.

Il est possible que les molécules de classe II, concentrées dans ces microdomaines puissent elles mêmes transduire un signal intracellulaire (Huby et al., 1999) responsable du passage de l'antigène dans le cytoplasme. Les conditions, permettant le passage de l'antigène dans le cytoplasme, sont vraisemblablement dépendantes des récepteurs responsables de la capture de l'antigène par les DC. Il a été montré que l'engagement du BCR des lymphocytes B, permettait son internalisation dans les compartiments riches en molécules de classe II nouvellement synthétisées. Lors de leur expression à la surface cellulaire ces molécules de classe II s'associeraient avec les chaînes $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ du BCR, permettant un signal subséquent grâce aux motifs ITAM de ces chaînes lors de l'interaction avec le TCR (Lang et al., 2001). On peut imaginer que le $Fc\gamma RIII$ des DC, qui possède des chaînes α associées portant des motifs ITAM, pourrait jouer le même rôle que le BCR des lymphocytes B. De plus, les molécules de classe II peuvent être engagées, non seulement par le TCR, mais aussi par des molécules exprimées par les lymphocytes T activés, comme LAG-3. Ce dernier permet d'ailleurs d'activer les DC (Avicé et al., 1999).

Conclusions

En résumé, il semblerait que l'élément de restriction, contrôlant l'activation des lymphocytes T CD8 par les DC, ne soit pas seulement l'expression de certaines molécules de costimulation, ou la sécrétion de certaines cytokines, mais l'apparition des complexes classe I/peptide sur la membrane. La présentation par les molécules de classe I semble donc être régulée par les lymphocytes T CD4. Néanmoins, pour recevoir le signal adéquat, les DC doivent présenter des antigènes capables de stimuler des lymphocytes T CD4, par des molécules de classe II concentrées dans des domaines riches en cholestérol. Ces derniers pourraient correspondre aux synapses immunologiques que nous avons décrites dans l'introduction (Figure 20). Ce sont des microdomaines particuliers, où les molécules sont concentrées de façon très organisée à la membrane plasmique, et qui favorisent la signalisation intracellulaire. On peut supposer que ces microdomaines se forment lorsque les DC sont activées par la capture d'antigènes grâce aux FcR. Le contenu des liposomes est libéré dans les compartiments intracellulaires riches en molécules de classe II. Ces dernières sont alors chargées en peptides puis exportées à la surface cellulaire. Si l'expression sur la membrane plasmique se fait par fusion de vésicules d'exocytose, les molécules de classe II pourraient être concentrées dans ces microdomaines avec des molécules de costimulation, comme CD86 (CD40 ?) (Turley et al., 2000), ce qui favoriserait l'interaction avec les lymphocytes T CD4 (Anderson et al., 2000). L'organisation des molécules de classe II à la surface des DC, devrait réguler d'une part l'activation des lymphocytes T CD4 et d'autre part, l'acquisition de certaines fonctions par les DC, telles que la présentation dans le contexte des molécules de classe I.

Article 4

Karine Serre, Laurent Giraudo, Carole Siret, Lee Leserman, and Patrick Machy

CD4 T cell help is required for primary CD8 T cell responses to vesicular antigen delivered to dendritic cells in vivo

European Journal of Immunology, 2006. 36: issue 6: p. 1386-1397.

NB : Au moment de la publication de ma thèse cet article était seulement en préparation. Il a depuis été publié et j'ai décidé de joindre la version publiée qui est la plus récente et donc la plus appropriée, dans ce document.

3)- Présentation aux lymphocytes T CD4 et CD8 *in vivo*

Préambule de l'article 4

La forme de l'antigène reconnu et capturé par les DC a d'importantes conséquences sur les propriétés de présentation de ces cellules. Pour qu'un antigène soit efficacement présenté par des cellules présentatrices d'antigènes *in vitro*, il faut qu'il soit capturé par un récepteur. L'engagement de ce dernier doit d'une part, permettre l'internalisation de l'antigène dans des compartiments dédiés à la présentation antigénique et d'autre part, induire l'activation de la cellule qui l'exprime. De plus, les liposomes permettent de protéger et de concentrer les antigènes dans les cellules. Comme nous l'avons vu grâce aux expériences réalisées *in vitro*, lorsqu'ils sont capturés par les FcR exprimés par les DC, ils permettent l'expression des complexes classe II/peptide dans des microdomaines. Ces derniers sont nécessaires non seulement, à la stimulation de lymphocytes T CD4, mais surtout à la DC pour le passage de l'antigène exogène dans le cytoplasme, ce qui permet l'apprêtement de peptides avec les molécules de classe I. Il est donc important de vérifier que ces résultats correspondent à une réalité physiologique *in vivo*.

Pour cela, dans la continuité des expériences réalisées *in vitro*, nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux étapes précoces de stimulation des lymphocytes T CD4 et lymphocytes T CD8 *in vivo*. Ces lymphocytes T sont marqués avec une molécule fluorescente (CFSE) dont l'intensité de fluorescence se partage de façon égale entre les cellules filles lors de chaque division. Ceci permet de visualiser l'état d'activation des lymphocytes T grâce aux nombres de divisions qu'ils ont effectués. Ces lymphocytes T fluorescents sont transférés dans des souris receveuses, qui sont ensuite immunisées dans les coussinets plantaires arrières avec différentes formes d'antigènes solubles (protéiques ou peptidiques), ou en présence de CFA ou de LPS, ou bien encapsulés dans des liposomes. Nous avons ensuite mesuré la prolifération des lymphocytes T fluorescents.

CD4 T cell help is required for primary CD8 T cell responses to vesicular antigen delivered to dendritic cells *in vivo*

Karine Serre^{*1,2,3}, Laurent Giraudo^{1,2,3}, Carole Siret^{1,2,3}, Lee Leserman^{1,2,3,4} and Patrick Machy^{1,2,3}

¹ Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université de la Méditerranée, Marseille, France

² INSERM, U631, Marseille, France

³ CNRS, UMR, 6102, Marseille, France

⁴ CNRS Groupement de Recherche 2352 "Immunociblage des Tumeurs", Marseille, France

Insight into the mechanisms by which dendritic cells (DC) present exogenous antigen to T cells is of major importance in the design of vaccines. We examined the effectiveness of free antigen as well as antigen with lipopolysaccharide, emulsified in complete Freund's adjuvant, and antigen encapsulated in liposomes in activating adoptively transferred antigen-specific CD4 and CD8 T cells. When contained in liposomes, 100- to 1000-fold lower antigen amounts were as efficient in inducing proliferation and effector functions of CD4 and CD8 T cells in draining lymph nodes as other antigen forms. CD11c⁺/CD11b⁺/CD205^{mod}/CD8α⁻ DC that captured liposomes were activated and presented this form of antigen in an MHC class I- and class II-restricted manner. CD4 T cells differentiated into Th1 and Th2 effector cells. Primary expansion and cytotoxic activity of CD8 T cells were CD4 T cell-dependent and required the transporter associated with antigen processing (TAP). Finally, adoptively transferred CD4 and CD8 T cells were not deleted after primary immunization and rapidly responded to a secondary immunization with antigen-containing liposomes. In conclusion, encapsulation of antigen in liposomes is an efficient way of delivering antigen to DC for priming of both CD4 and CD8 T cell responses. Importantly, primary CD8 T cell responses were CD4 T cell-dependent.

Received 11/3/05

Revised 22/2/06

Accepted 15/3/06

[DOI 10.1002/eji.200526193]

Key words:

Antigen processing/presentation
· Liposome · Primary CTL responses · T cell memory · Vaccination

Introduction

To develop better vaccines, it is important to understand how dendritic cells (DC) recognize Ag and present Ag-derived peptide/MHC complexes to CD4 [1] and CD8 [2, 3] T cells. In some instances targeting Ag to DC augments the immune response to the Ag [4, 5], while

in other circumstances tolerance is induced [4, 6, 7]. Productive responses to Ag depend on appropriate activation of DC, since constitutive presentation of self Ag by DC to T cells in the absence of activating signals is thought to induce tolerance [8]. An important consideration with regard to responses to exogenous Ag includes the efficiency with which Ag is taken up and presented to T cells by DC. Liposomes are useful agents

Correspondence: Dr. Patrick Machy, CIML, Université de la Méditerranée, Case 906, 13288 Marseille Cedex 09, France
Fax: +33-491269430

E-mail: machy@ciml.univ-mrs.fr

Abbreviation: CF: carboxyfluorescein

*** Current address:** The Medical Research Council Centre for Immune Regulation, The Medical School IBR, Immunity and Infection Division, University of Birmingham, Wolfson Drive, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, UK

for studying Ag acquisition and presentation by DC, as they are inert and may be generated to contain a high concentration of Ag that is protected from rapid degradation and dispersion. Liposomal formulations of protein or peptide vaccines are effective in inducing anti-viral and anti-tumor immune responses [9–11].

CD4 T cells play a major role in CD8 T cell responses, “licensing” DC to be effective CD8 T cell stimulators [12–14]. Many models using cell-based Ag [15], viruses [16] and peptides [17] have revealed that CD4 T cells are necessary for the induction of primary effector CD8 T cell responses *in vivo*. Despite these studies, the role of CD4 help in driving primary CTL immune responses has been challenged recently. Reports have dissociated their capacity to activate DC from CD4 help that provokes CD8 T cells to differentiate into memory cells and CD4 help that maintains CD8 memory T cells [18–21]. Even so, detailed information on the CD4 T cell dependence of CTL responses to different forms of exogenous Ag and how CD8 T cells proliferate and acquire cytotoxic activity *in vivo* is still lacking.

Here we have compared *in vivo* immune responses to exogenous free Ag, alone or associated with agents known for their inflammatory activity (the endotoxin LPS or CFA) or their carrier activity (liposomes). We have investigated whether these formulations, when injected subcutaneously (s.c.), induce DC in draining LN to stimulate adoptively transferred Ag-specific CD4 and CD8 T cells. At low doses of Ag, liposomes were much more efficient than the other forms of Ag in activating both CD4 and CD8 T cells. CD11c⁺/CD11b⁺ DC captured Ag-containing liposomes and were most likely responsible for priming of CD4 T cells, leading to the generation of Th1 and Th2 effector cells. Moreover, we found that CD4 T cells that recognize their cognate Ag play an early and major role in inducing proliferation of and acquisition of cytotoxic functions by CD8 T cells. Finally, capture of liposomes by DC did not lead to a state of tolerance, as transferred CD4 and CD8 T cells were able to respond to a second Ag injection. Our results show that Ag-containing liposomes efficiently deliver Ag to DC *in vivo*. These cells are then activated and, as a consequence, drive expansion of CD4 and CD8 effector T cells in primary and secondary immune responses. Importantly, primary expansion of CD8 T cells was CD4 T cell-dependent.

Results

Ag encapsulated in liposomes is very efficient in activating specific CD4 T cells *in vivo*

To assess the efficiency of different forms of Ag in activating T cells *in vivo*, CFSE-labeled HEL-specific

(3A9) or OVA-specific (OT-II) CD4 T cells were adoptively transferred into mice. Different forms of HEL or OVA were injected into the hind footpads of recipient mice, and T cell proliferation was monitored 3 days later in the draining popliteal LN. The extent of cell proliferation was directly related to the amount of Ag administered (Fig. 1A), as revealed by the percentage of specific T cells that were in division (Fig. 1B, C). Ag contained in liposomes induced 3A9 and OT-II T cell proliferation at nanogram doses, which is 100- to 1000-fold lower than the amount of Ag required to induce an equivalent response when administered in other forms (free or in the presence of LPS or CFA). Empty liposomes or irrelevant Ag (BSA)-containing liposomes did not drive 3A9 or OT-II cell proliferation (not shown). These results show that vesicular Ag is very effective in inducing CD4 T cell proliferation.

Fc receptors do not play a role in acquisition and presentation of liposome-encapsulated Ag *in vivo*

Fc receptors have been implicated in the efficient uptake and presentation of IgG-opsonized liposomes by DC *in vitro* [22] and also target presentation of immune complexes *in vivo* [23]. To investigate whether FcR are involved in liposome uptake, we examined proliferation of adoptively transferred OT-II T cells in IgM^{-/-} mice or WT mice immunized with OVA-containing liposomes. IgM^{-/-} mice are deficient for the μ chain of the B cell receptor and have no B cells and thus no circulating Ab [24]. Liposome-encapsulated OVA induced OT-II cell proliferation in IgM^{-/-} animals as efficiently as in WT animals (Fig. 1D). Therefore, IgG FcR play a negligible role in the acquisition of s.c. injected liposomes for Ag presentation to CD4 T cells in draining LN. In addition, these results show that B cells are not responsible for the induction of primary CD4 T cell proliferation after immunization with Ag encapsulated in liposomes.

Liposomes are efficient at inducing a Th1- and Th2-type mixed immune response

We next analyzed the effectiveness of liposomes in generating effector CD4 T cells, defined as cells having up-regulated mRNA specific for cytokines such as IFN- γ (Th1) and IL-4 (Th2). OT-II cells were transferred into mice that were immunized with OVA-containing liposomes. At day 6, popliteal LN cells were separated into two cell fractions, CD45.1⁻/CD4 T cells (host CD4 T cells) and CD45.1⁺/CD4 T cells (OT-II) (Fig. 2A), and expression of cytokines was evaluated with cDNA extracted from each of these cell fractions (Fig. 2B). IFN- γ and IL-4 mRNA were expressed in OT-II cells at levels that were on average 6- and 3-fold higher, respectively, than the levels in host CD4 T cells. IFN- γ

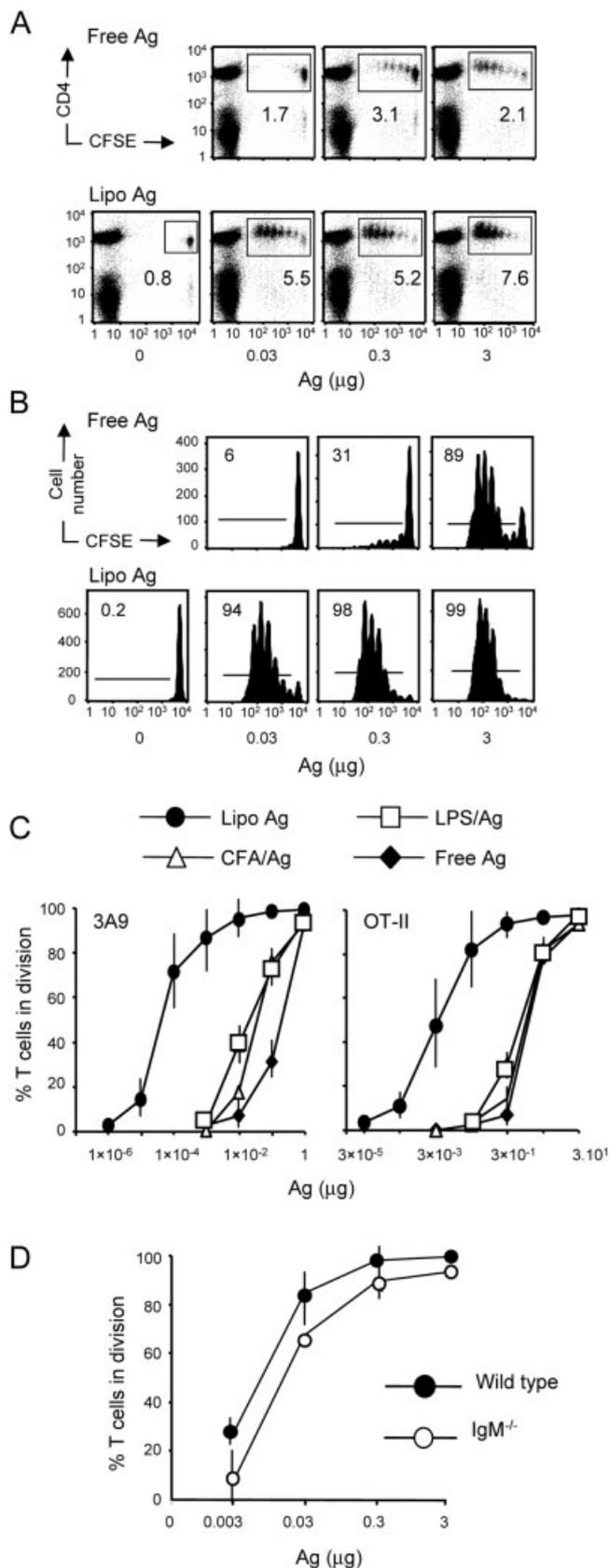


Figure 1. Proliferation of CD4 T cells in draining LN after injection of different forms of the same Ag: in PBS (free Ag), together with LPS or CFA, or encapsulated in liposomes (Lipo Ag). CBA/J or B6 mice received 2×10^6 CFSE-labeled 3A9 or OT-II cells, respectively. Various concentrations of different forms of HEL or OVA were then injected into footpads. 3A9 or OT-II cell proliferation was analyzed 3 days later. (A) Dot plots from LN cell suspensions. The percentage of 3A9 among total cells is indicated. (B) Histograms of CFSE dilution gated on 3A9 cells. The percentage of 3A9 cells that have undergone at least one division is indicated. (C) 3A9 or OT-II cell responses are plotted as a function of the Ag dose and form. The percentages are calculated as in (B). Results are representative of three experiments. (D) OT-II proliferative responses, as a function of the Ag dose administered in liposomes, in WT or IgM^{-/-} mice. Results are representative of two experiments.

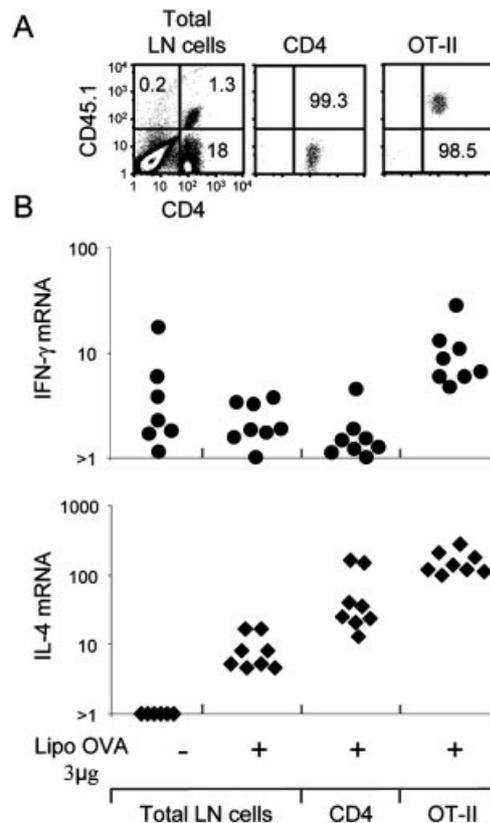


Figure 2. Liposomes induce a mixed Th1 and Th2 immune response. Mice received 2×10^6 CD45.1⁺ OT-II cells and were immunized (or not) with OVA-containing liposomes (equivalent to 3 μg Ag). (A) Popliteal LN were harvested 6 days later, and cells were stained against CD4 and CD45.1 and sorted (or not, Total LN cells) into endogenous CD4 (CD45.1⁺/CD4⁺) and OT-II (CD45.1⁺/CD4⁺) cell populations. (B) Real-time PCR against IFN-γ (top panel) and IL-4 (bottom panel) was performed on cDNA extracted from each of these total or FACS-sorted cell fractions. Cytokine mRNA levels are represented relative to β-actin. Each symbol represents total or sorted cells from two LN derived from one mouse.

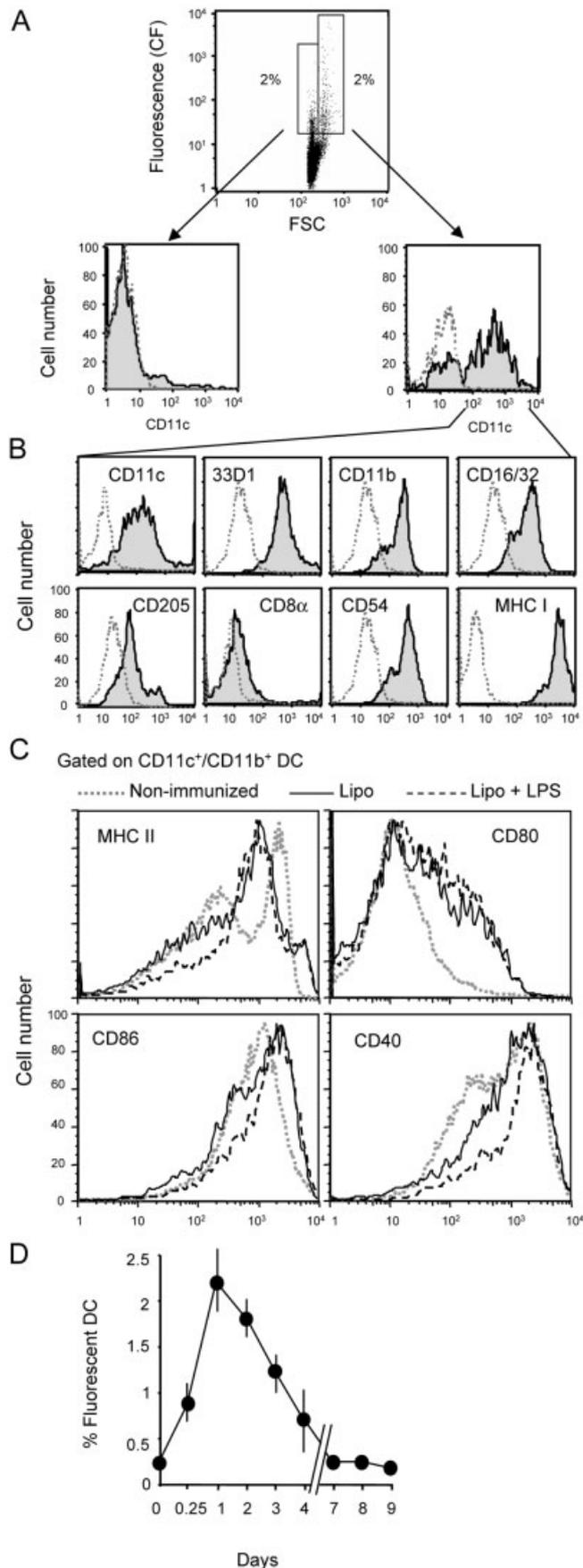


Figure 3. DC are the major population that capture liposomes, and they exhibit an activated phenotype. Fluorescent liposomes (equivalent to 3 μ g Ag) were injected into footpads of ten mice. Popliteal LN were pooled for FACS analysis 24 h later. (A) Total cells were analyzed for size, CF fluorescence and expression of CD11c. (B) Fluorescent CD11c⁺ cells were enriched by negative selection and stained with various Ab (indicated in each histogram). Open histograms indicate background levels of control Ab or streptavidin. (C) Mice were immunized with liposomes in the absence or presence of LPS, and the phenotype of the CD11c⁺/CD11b⁺ DC was compared to total CD11c⁺/CD11b⁺ resident DC from non-immunized mice (dotted line, non-immunized; solid line, liposomes alone; dashed line, liposomes + LPS). (D) Kinetics of the appearance of fluorescent DC in the draining LN. Results are representative of two to three experiments.

mRNA in the LN was almost exclusively associated with the responding OT-II cells, but this was less apparent for IL-4 mRNA. Importantly, OT-II cells have previously been shown to selectively produce IL-4 mRNA, without up-regulating IFN- γ mRNA, in response to alum-precipitated OVA, a well-characterized Th2 inducer [25]. These results show that Ag-containing liposomes promote the generation of both Th1 and Th2 effector CD4 T cells.

DC are the major cell population responsible for the capture of liposomes *in vivo*

Carboxyfluorescein (CF)-containing liposomes were injected into footpads, and fluorescent cells (that had captured the liposomes) in the popliteal LN were analyzed. At 24 h we observed two major fluorescent cell populations that represented 4% of the total cells (Fig. 3A). The first population was positive for DC markers (CD11c, 33D1), with the majority of these cells expressing high levels of CD11b and CD16/32, intermediate levels of CD205 and very low levels of or no CD8 α (Fig. 3B). The second population of fluorescent cells was most likely B cells, as they were CD11c⁻ (Fig. 3A) but expressed B220 and MHC class II or costimulatory molecules at low levels (not shown). In order to determine the maturation stage of the DC, we compared the phenotype of the CD11c⁺/CD11b⁺ DC after immunization with the liposomes, in the absence or presence of LPS, with steady-state LN-resident CD11c⁺/CD11b⁺ DC (Fig. 3C). Total CD11c⁺/CD11b⁺ DC, containing the DC subset that captured the liposomes, up-regulated MHC class II molecules as well as CD80 and CD86 and were among the DC that expressed the highest level of CD40 as compared with CD11c⁺/CD11b⁺ steady-state LN-resident DC. Moreover, the presence of LPS induced a further stage of activation, as demonstrated by a reduction in the frequency of DC that expressed low levels of MHC class

II, CD86 and CD40 molecules. The number of DC that had captured liposomes peaked at 24 h and decreased thereafter (Fig. 3D). No fluorescent cells were detected on day 5 or later. These results show that the cells in the draining LN that capture liposomes after s.c. injection *in*

vivo are CD11c⁺/CD11b⁺/CD205^{mod}/CD8α⁻, a phenotype described for dermal DC [26]. Although the mechanism involved in liposome uptake *in vivo* is still unclear, these DC exhibit an activated phenotype as compared to steady-state LN-resident DC, which can be further increased in the presence of LPS.

DC are the major cell population in draining LN initiating *ex vivo* CD4 and CD8 T cell responses

We next tested the capacity of CD11c⁺/CD11b⁺ DC that had captured liposomes to stimulate CD4 and CD8 T cells *ex vivo*. (CBA × B6) F1 mice were immunized with fluorescent liposomes containing HEL and OVA. At 24 h popliteal LN were removed and fluorescent cells FACS-sorted (based on the staining shown in Fig. 3A). In order to investigate MHC class II-restricted presentation, various numbers of either unseparated cells or cells enriched for CD11c⁺ (DC) or CD11c⁻ (B cells) were incubated with HEL-specific (3A9) CD4 T cells (Fig. 4A). DC were the most efficient cells for MHC class II-restricted presentation; as few as 750 enriched DC were as efficient as 25 000 unseparated cells or 6000 CD11c⁻ cells. Unseparated cells taken from mice injected with free proteins were ineffective in stimulating T cells. This Ag presentation was also observed for cells harvested at 48 h but not at day 4 after immunization (not shown). In order to investigate MHC class I-restricted Ag presentation, various numbers of unseparated cells or enriched CD11c⁺ cells (DC) were incubated with OVA-specific (OT-I) CD8 T cells in the absence or presence of 3A9 cells (Fig. 4B). OT-I cell activation was measured by the induction of specific cytolysis of target cells. Enriched DC were more efficient (6000 cells) in OT-I cell priming than unseparated LN cells (100 000 cells). Addition of 3A9 CD4 T cells that recognized their cognate Ag presented by DC enhanced CD8 T cell activation; in this instance, only 1500 enriched DC were required. There was no cytolysis of target cells in the absence of OT-I cells (not shown). These results suggest that CD4 T cells help MHC class I-restricted exogenous Ag presentation or CD8-priming activities by CD11c⁺/CD11b⁺ DC derived from the LN.

Ag-specific CD4 T cells play a role in primary Ag-specific CD8 T cell activation *in vivo* when Ag is delivered by liposomes

We investigated further the role of CD4 T cells in CD8 T cell priming *in vivo*. We transferred OT-I cells, with or without OT-II cells, into mice that were then immunized with OVA-containing liposomes. OT-I proliferation in the draining LN (detected with fluorescent H-2K^b/SIINFEKL tetramers) had increased 5 days later in an Ag dose-dependent manner (Fig. 5A) in mice that had received

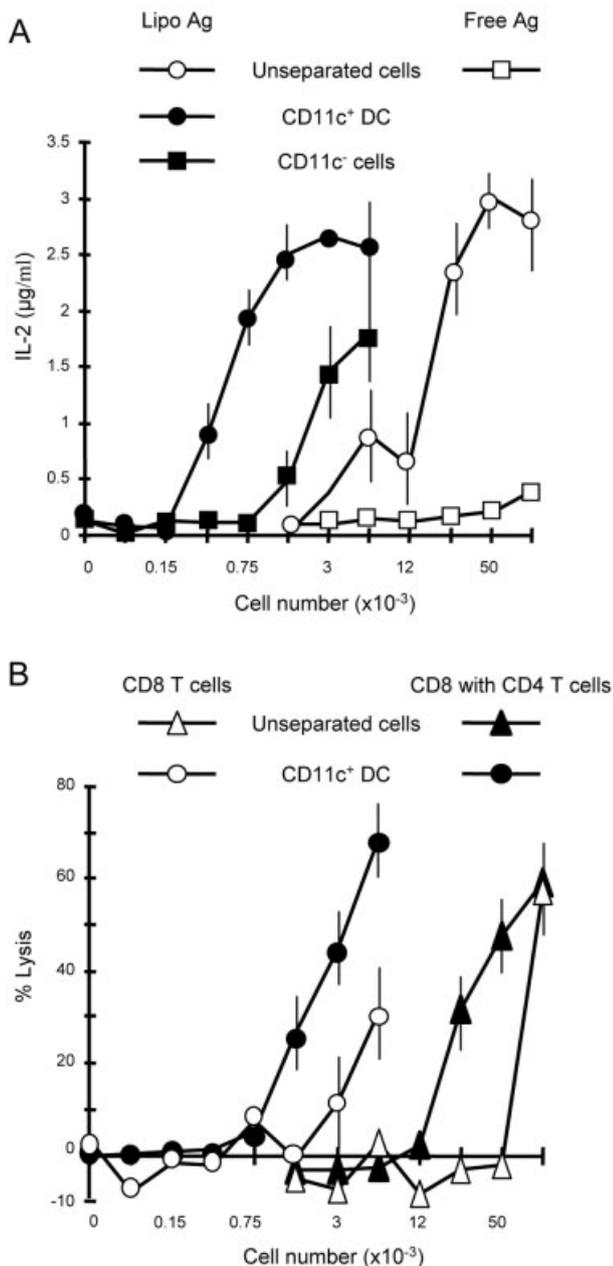


Figure 4. DC capture Ag from liposomes and are responsible for *ex vivo* MHC class II- and class I-restricted Ag presentation. Free HEL Ag or (HEL + OVA + CF)-containing fluorescent liposomes (equivalent to 10 µg of Ag) were injected into the footpads of ten (CBA × B6) F1 mice. (A) One day later, various numbers of unseparated cells or FACS-sorted CF⁺ CD11c⁺ DC or CD11c⁻ cells (as in Fig. 3A) from the popliteal LN were used as APC to stimulate 3A9 cells. Curves show IL-2 secretion. (B) Unseparated cells or FACS-sorted CD11c⁺ DC were mixed with OT-I cells, with or without 3A9 cells, and SIINFEKL-specific cytotoxicity was evaluated.

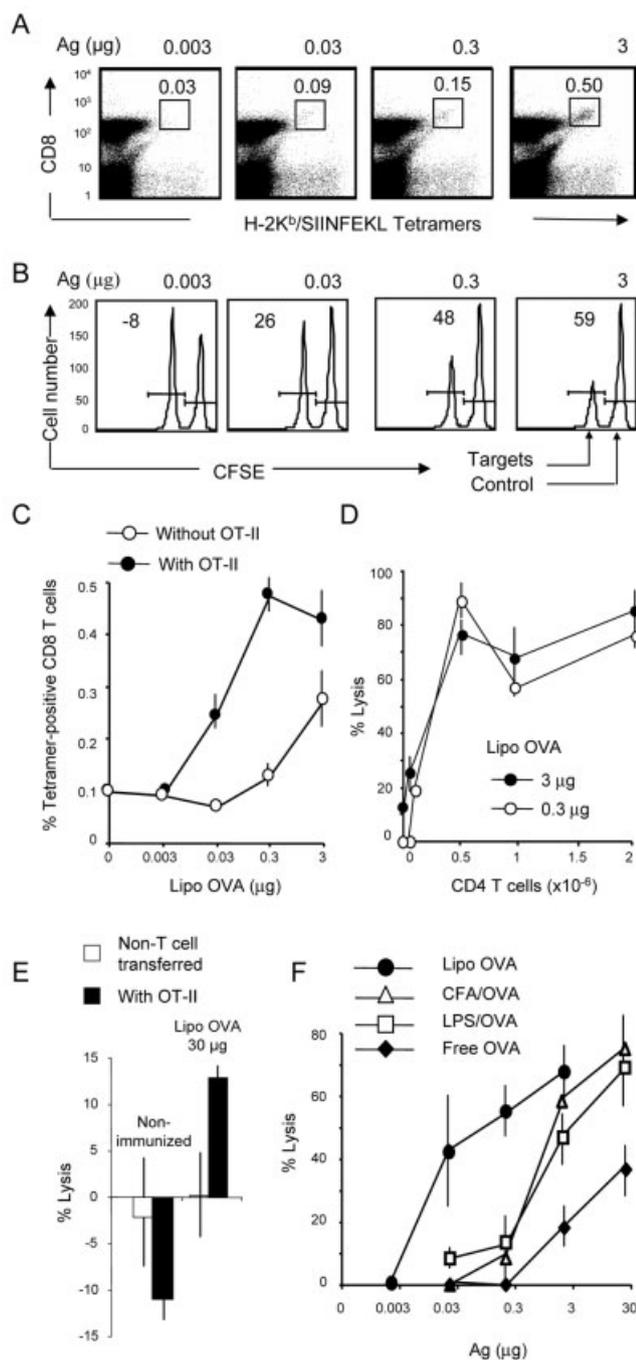


Figure 5. Activation of CD8 T cells *in vivo* is CD4-dependent after injection of Ag contained in liposomes. Mice received 10^5 OT-I and 5×10^5 OT-II cells. Various concentrations of OVA-containing liposomes were then injected. (A) Dot plots represent OT-I cells from draining LN labeled with H-2K^b/SIINFEKL tetramers 5 days after immunization. The quantity of OVA contained in the injected liposomes is shown above each dot plot. The percentage of the OT-I cells among total CD8 T cells is indicated. (B) *In vivo* cytotoxic activity of OT-I cells 1 week after immunization as determined by the lysis of SIINFEKL-pulsed CFSE^{low} target cells. The percentages within the histograms refer to the specific cytolysis. (C) In a separate series of experiments, tetramer binding was determined as in (A). (D) Mice received 10^5 OT-I cells with different numbers of OT-II cells, and CTL function was assessed 1 week after immunization. The percent of cytolysis *in vivo* is plotted as a function of the CD4 T cell number. (E) Normal mice (non-T cell transferred) and mice that received 2×10^6 OT-II cells were immunized with OVA-containing liposomes (30 µg), and *in vivo* cytotoxicity was evaluated 1 week later. (F) Mice received 10^5 OT-I cells with 5×10^5 OT-II cells, and *in vivo* cytotoxicity was evaluated 4 days after immunization as a function of the concentration of different forms of OVA. Results are from three different experiments.

Ag-containing liposomes. Moreover, OT-II cells were also capable of delivering help to induce primary endogenous CD8 T cell cytotoxic responses *in vivo* (Fig. 5E). In this set of experiments, while no cytotoxicity could be detected in normal mice, OT-II cells were able to provide help to endogenous CD8 T cells for low but reproducible responses. Importantly, efficient endogenous CTL responses were induced in normal mice immunized s.c. into footpads with much higher doses of Ag-containing liposomes (not shown). In conclusion, both endogenous OVA-specific CD8 T cells and Tg OVA-specific OT-I cells generated CTL effectors in primary immune responses after immunization with OVA-containing liposome in a CD4 T cell-dependent manner. These findings reveal that our model of adoptively transferred CD4 and CD8 T cells provides biological data that are relevant *in vivo* and offers a good tool to investigate the requirements for the induction of primary CTL responses.

Having defined optimal conditions (Fig. 5D), 10^5 OT-I cells with 5×10^5 OT-II cells were adoptively transferred into recipient mice, and different formulations of Ag were compared for their capacity to induce CD8 T cell activation. Compared to free Ag or Ag injected with LPS or emulsified in CFA, a 100- to 1000-fold lower concentration Ag encapsulated in liposome was sufficient (Fig. 5F). Thus, of the Ag formulations tested, Ag-containing liposomes were the most efficient in inducing CD8 T cell primary activation in a CD4-dependent manner. This finding highlights the importance of Ag delivery into DC, along with CD4 T cell help, in triggering efficient primary CTL responses.

both OT-I and OT-II cells (see below). OT-I cell proliferation was closely related to the induction of specific cytotoxicity *in vivo* (Fig. 5B).

Both the proliferation (Fig. 5C) and the induction of cytotoxicity (Fig. 5D) of OT-I cells were profoundly dependent upon adoptively transferred OT-II cells. The small number of endogenous OVA-specific CD4 T cells [27] was presumably not sufficient to provide help to induce activation of transferred OT-I cells at low Ag doses (0.3 or 3 µg). OVA-specific OT-II CD4 T cells are thus required to induce optimal primary expansion and cytotoxic activities of OT-I cells after immunization with

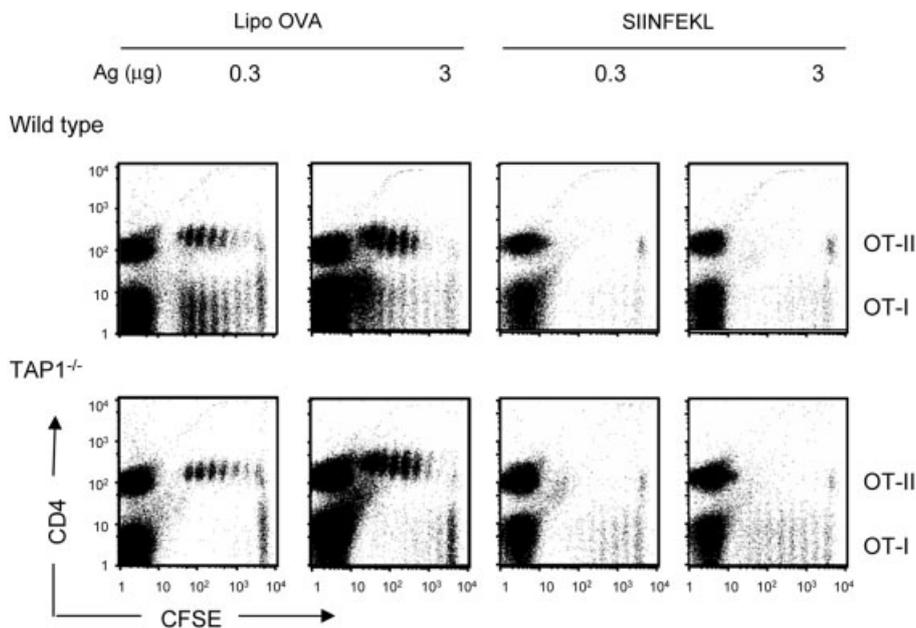


Figure 6. Activation of specific CD8 T cells *in vivo* is TAP1-dependent after injection of Ag in liposomes. WT or TAP1^{-/-} mice received 2×10^6 CFSE-labeled OT-II cells and 2×10^6 CFSE-labeled OT-I cells and were immunized with OVA-containing liposomes or free SIINFEKL peptide. Proliferation of OT-II and OT-I cells was evaluated in LN 3 days later. OT-II cells are CD4⁺/CFSE⁺, while OT-I cells are CD4⁻/CFSE⁺.

Activation of specific CD8 T cells *in vivo* after injection of Ag in liposomes is TAP1-dependent

TAP1^{-/-} mice were used to gain insight into the mechanisms by which OVA-containing liposomes elicit OT-I cell proliferation. TAP1^{-/-} or WT mice received CFSE-labeled OT-I and OT-II cells. Both OT-II (CD4⁺) and OT-I (CD4⁻) cells were induced to divide in WT mice immunized with Ag-containing liposomes (Fig. 6). In contrast, OT-I cells transferred into TAP1^{-/-} mice were not activated by OVA-containing liposomes but proliferated when mice received free SIINFEKL peptide, which binds directly to MHC class I molecules at the cell surface. OT-II cells responded similarly in TAP1^{-/-} mice and WT mice, indicating that TAP1^{-/-} DC had endocytosed OVA-containing liposomes. These results confirm that Ag delivered by liposomes to DC requires release into the cytosol to be loaded, via TAP1 molecules, into the classical pathway for class I-restricted presentation.

Induction of a secondary response to liposome-encapsulated Ag

Finally, it has been reported that in some circumstances targeting Ag to DC induces an expansion phase that is followed by drastic contraction of the pool of responding T cells. This leads to peripheral T cell unresponsiveness by the deletion of the T cells and the loss of effector functions in recall challenges [6, 7]. Although liposomes induce DC maturation (Fig. 3C), we next determined whether DC that capture liposomes have tolerogenic activities. The fate of Tg T cells responding to liposomal Ag was therefore addressed in secondary responses.

Mice received CD45.1⁺ OT-I and OT-II cells. If these mice were not immunized, few of the transferred T cells were recovered in the draining LN, and no *in vivo* cytolysis was observed (Fig. 7A, Group 1). When the mice were immunized once, both OT-II and OT-I cells could be readily detected in draining LN 3 to 5 days later, and cytotoxic responses were obtained (Fig. 7A, Group 2). Without a second immunization, the number of CD45.1⁺ T cells observed in LN 1 month after immunization was as for non-immunized animals, and no cytotoxicity was observed (Fig. 7A, Group 4). When these mice were immunized a second time, both OT-II and OT-I cells were recovered, and cytotoxicity was identical to the primary immune response (Fig. 7A, Group 3). Finally, a kinetic analysis of OT-II cell proliferation and OT-I cell cytotoxic responses after two immunizations (Fig. 7B) showed that both CD4 and CD8 T cell responses were faster and of a shorter duration, as reported for CD8 T cell proliferation [28]. Thus, adoptively transferred T cells were not tolerized or deleted and responded well when mice were immunized a second time with liposome-encapsulated Ag, suggesting that DC that capture Ag-containing liposomes are immunogenic.

Discussion

Immunization of mice with Ag-containing liposomes resulted in a mixed Th1 and Th2 response, along with IgG Ab production (not shown) and the generation of cytotoxic T cells. The majority of the cells taking up the liposomes appear to be dermal DC (CD11c⁺/CD11b⁺/CD205^{mod}/CD8α⁻) [26]. These results are consistent

with reports indicating the importance of skin-derived CD11c⁺/CD11b⁺ DC in CD4 T cell activation after s.c. immunization [29]. Although CD8 α ⁺ DC are reported to

be important for cross-presentation of Ag injected i.v., or following viral skin infection [30–32], in our system CD11c⁺/CD11b⁺ DC that were mostly CD8 α ⁻ were able

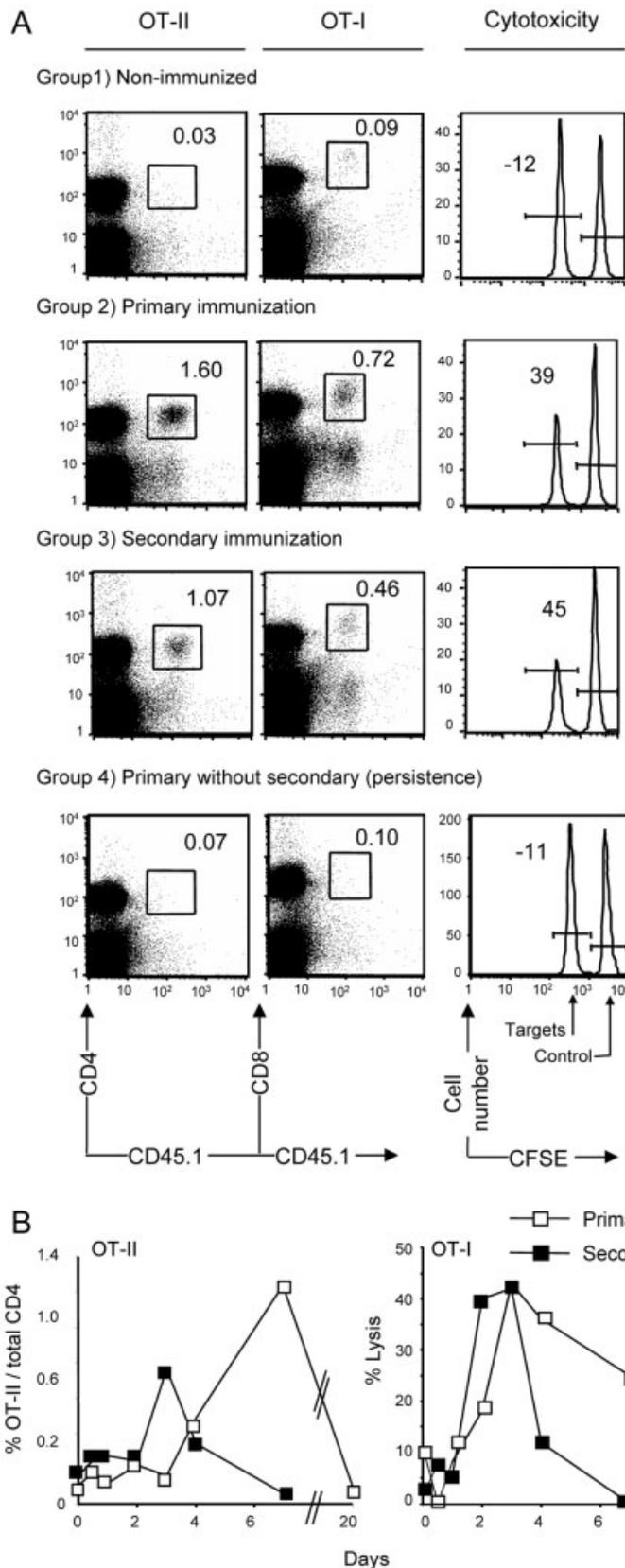


Figure 7. Adoptively transferred CD4 and CD8 T cells are responsive after a second Ag challenge *in vivo*. (A) Mice received CD45.1⁺ OT-I cells (10⁵) and OT-II cells (5 × 10⁵). Groups of mice were not immunized (group 1) or were immunized with 3 μg OVA in liposomes once (groups 2 and 4) or twice (30 days after the first immunization) (group 3). OT-I and OT-II cell proliferation and CTL activity were monitored 3 days after T cells were transferred (group 1), 3–5 days after primary immunization (group 2), 2–4 days after secondary immunization (group 3), or 30 days after primary immunization (group 4). T cells from popliteal LN were probed with CD45.1, CD4 and CD8 Ab. The percentages of OT-II or OT-I cells among total CD4 or CD8 T cells, respectively, in the LN are indicated. In the other half of the mice, *in vivo* cytotoxicity was assessed 3 days after immunization. The percentages above the histograms refer to the specific cytotoxicity. Data are representative of results obtained in three separate experiments. B) Kinetics of presence of OT-II cells and cytotoxicity of OT-I cells in LN of mice tested at various times after immunization. Combined results of two experiments are shown.

to present Ag to both CD4 and CD8 T cells *ex vivo*. However, we have not determined whether DC captured liposomes at the site of s.c. injection or in the draining LN [33]. We also do not know whether LN-resident DC capture Ag from trafficking DC [34]. Nevertheless, Ag-presenting DC expressed an activated phenotype, as shown by the levels of MHC class II and costimulatory molecules, and were immunogenic.

The requirement for CD4 T cell help in the priming of cytotoxic CD8 T cell responses remains insufficiently explained. "Licensing" of DC by CD4 T cells is required to induce their ability to stimulate naive CD8 T cells [12–14]. In addition, CD4 T cell help has been reported to be involved in the development of functional CD8 T cell memory [18–20] and in the maintenance of these cells [21]. However, much of these data have focused on CTL responses induced by infections such as *Listeria monocytogenes*, LCMV or vaccinia virus. Whether CD8 T cell responses (primary expansion, acquisition of functional cytotoxicity, maintenance of memory) against exogenous protein Ag are CD4-dependent is still an open question. Studies using large numbers of adoptively transferred CD8 T cells specific for exogenous Ag, provided by injection of protein-pulsed DC, have reported that CD8 T cell responses are CD4-independent [35]. Here we adoptively transferred low numbers of OT-I cells and demonstrated that after immunization with low doses of Ag encapsulated in liposomes, CD4 T cells were required early during the primary CTL response to induce the expansion of CD8 T cells (Fig. 5C). This correlated with the generation of cytotoxic effectors (Fig. 5D).

Our results confirm and extend data reported by Smith *et al.* [36], who suggested that CD4 T cell help may be especially important in the absence of pathogen-derived signals, and may reconcile the recent controversy as to whether CD4 T cells "license" DC for the induction of primary CTL responses. After immunization, Ag is usually highly concentrated in a limited number of DC [37]. An even higher concentration of Ag in a small cohort of DC is likely to be efficiently achieved by the uptake of liposomes 200 nm in diameter, each containing about 1000 molecules of Ag, as were used in this study. Given the very low amount of liposome-encapsulated Ag that was sufficient for presentation, it is reasonable to believe that the same DC that acquired the liposomes also presented Ag to both CD4 and CD8 T cells.

Although our knowledge of how liposomes interact with cells and the parameters that influence this *in vivo* is limited, numerous serum proteins bind to the liposomal surface [38]. We believe that cell-surface receptors recognizing these opsonins might be involved in liposome uptake and may be responsible for the DC activation triggering efficient Ag processing and pre-

sentation to CD4 T cells. However, contrary to *in vitro* experiments [22] and although all CD11c⁺ DC populations express FcR (Fig. 3B), presentation of Ag delivered by liposomes *in vivo* did not require the participation of circulating Ab, consistent with absence of an implication for FcR involvement in the uptake process (Fig. 1D). Nevertheless, in this context, as liposomes lack intrinsic "danger" signals that might "license" DC directly, CD4 T cell help is fundamental for the triggering of effective primary CTL responses. Inflammatory signals cannot be solely responsible for effective CD8 T cell priming, since CFA or LPS were not as efficient as Ag-containing liposomes, even in the presence of CD4 T cell help (Fig. 5F). The manner by which Ag is delivered into DC and the presence of CD4 T cell help are parameters to consider in designing vaccines.

As yet, little is known as to how DC acquire CD8 T cell-priming functions. DC require activation by stimuli such as immune complexes [23], CD4 T cell help mediated via CD40-CD40L [12], TLR ligands [39] or other undefined signals [40]. We previously proposed that CD4 T cells recognizing their cognate MHC class II/peptide complexes concentrated in cholesterol-rich microdomains stimulate bone marrow-derived DC to release exogenous Ag from endocytic vesicles into their cytosol for class I presentation [41]. In support of this hypothesis, the presentation of liposome-encapsulated Ag in the context of MHC class I molecules is TAP-dependent (Fig. 6) [42]. Moreover, we show that the generation of endogenous CTL effectors during the primary immune response after immunization with OVA-containing liposome is CD4 T cell-dependent. Thus, the CTL response is likely to be controlled by the probability of interaction between Ag-presenting DC and Ag-specific CD4 T cells. CD4 T cells may be dispensable *in vitro* if DC are directly loaded with peptides [42] or if exogenous Ag enters directly into the cytosol [43]. In addition to the DC activation signals mentioned above, CD4 T cells regulating the access of Ag into the classical pathway for class I-restricted presentation might also augment the cross-presentation of exogenous Ag *in vivo*.

Materials and methods

Mice

C57BL/6J (B6) (H-2^b), CBA/J (H-2^k) or (CBA × B6) F1 mice were from IFFA-CREDO (L'Arbresle, France). 3A9 mice have TCR specific for the HEL 46–61 peptide/H-2 I-A^k complex [44]. OT-II mice have TCR specific for the OVA 323–339 peptide/H-2 I-A^b complex [35]. OT-I mice have TCR specific for the OVA 257–264 peptide SIINFEKL/H-2K^b complex [35]. B6 TAP1^{-/-} mice and IgM^{-/-} mice were from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). For some experiments, OT-I and OT-II mice were

crossed to B6 mice congenic for CD45.1 (CDTA, Orléans, France).

Ag, reagents and liposomes

HEL, OVA Grade VII, BSA Grade V, CFA and LPS (*E. coli* 055:B5) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). SIINFEKL was synthesized at the CIML. Liposomes [80 μ moles with respect to lipids: 65% mol/mol dimyristoyl phosphatidylcholine, 35% cholesterol (both from Sigma-Aldrich)] were formed by exposing lipids evaporated from chloroform/methanol (9:1 v/v) to an aqueous solution containing HEL (20 mg/mL; 1.4 mM), OVA (60 mg/mL; 1.4 mM) or BSA (25 mg/mL; 0.7 mM) in PBS containing (or not) 100 mM carboxyfluorescein (CF; Molecular Probes) or containing only CF (empty liposomes). Liposomes were formed by extrusion (Extruder, Northern Lipids, Vancouver, Canada) as described [22]. Ag levels were determined by fluorescence of free and liposome-entrapped CF with reference to the stock solution of Ag and CF. The quantity of liposome-associated Ag used for immunization was obtained by dilution of these liposomes.

Immunization protocols

Mice were immunized s.c. (in 50 μ L) in both hind footpads with Ag in free form dissolved in PBS, emulsified in CFA, with 1–5 μ g LPS or encapsulated in liposomes. Control mice were not injected or received PBS, empty liposomes or BSA-containing liposomes. For secondary responses, mice were immunized twice with Ag-containing liposomes at 1-month intervals.

FACS analysis of DC that captured Ag-containing liposomes from LN

Mice were injected with CF-containing liposomes in the presence (or not) of 5 μ g LPS. Draining popliteal LN were harvested 24 h after immunization, and cell suspensions were subjected to collagenase type I digestion (Sigma) at 37°C for 20 min. DC were also enriched by negative selection using magnetic beads. Cells were incubated with rat mAb specific for B220 (RA3-6B2), CD3 (KT-3) and Thy1 (H155.124.3) in Ca²⁺- and Mg²⁺-free HBSS medium (Sigma) at 4°C for 30 min. Cells not of DC cell lineage were removed with anti-rat Ig-coupled Dynabeads (Dyna, Oslo, Norway). Remaining cells were then incubated with CD11c-PE, CD8 α -PE (PharMingen) or rat mAb (ATCC, Manassas, VA) against 33D1, CD11b (M1/70), CD80 (16-10A1), CD86 (GL-1), CD54 (BE29G1), CD16/32 (24G2), MHC class II (M5/114), CD205 (NLDC-145) or CD40 (FGK45), followed by anti-rat PE (Jackson). Biotinylated mouse anti-MHC class I (5F1) was used with streptavidin-PE (Jackson). Cells were then fixed in 2% formaldehyde and analyzed in a FACScan cytofluorimeter (Becton Dickinson, Mountain View, CA). For *ex vivo* analysis of functions of DC that had captured fluorescent liposomes, cell suspensions from LN were treated as described above and sorted on the basis of forward scatter as cells detected in the FACScan green fluorescent channel.

Ex vivo Ag presentation and cytotoxicity assay

Popliteal LN from (CBA \times B6) F1 mice were harvested 24 h after immunization with fluorescent HEL- and OVA-containing liposomes. Cell suspensions were subjected to collagenase digestion at 37°C for 20 min. DC that had captured fluorescent liposomes were FACS sorted as described above. Dilutions of total or FACS-sorted cells were distributed in 96-well flat-bottom plates in RPMI complete medium. For *ex vivo* Ag presentation, 20 000 3A9 CD4 T cells were added for 48 h. IL-2 in supernatants was determined using the IL-2-dependent cell line CTLL [22]. For *ex vivo* cytotoxic assays, 20 000 OT-I T cells with or without 20 000 3A9 T cells were added for 5 days [41]. Target RMA cells were pulsed with the OVA peptide SIINFEKL (1 μ M) and [³H]-thymidine (0.25 μ Ci/mL) overnight and washed. RMA target cells (5000) were added for 4 h. Spontaneous cytolysis in the presence of cell suspensions of LN from non-immunized mice was indistinguishable from that of RMA cells incubated alone.

In vivo cytotoxicity assay

Target syngeneic spleen cells were divided into two populations. One population (CFSE^{low}) was pulsed with 10 μ M SIINFEKL at 37°C for 2 h and then labeled with 0.5 μ M CFSE (Molecular Probes) at 37°C for 10 min. The other population (CFSE^{high}) was not peptide-pulsed and was labeled with 5 μ M CFSE. The two populations were mixed 1:1 and injected i.v. into mice (20 \times 10⁶ cells/mouse). The next day, popliteal LN were removed. Elimination of SIINFEKL-pulsed CFSE^{low} target cells in the LN cell suspension was analyzed by flow cytometry based on the ratio between the percentage of not pulsed *versus* SIINFEKL-pulsed cells [(CFSE^{low} / CFSE^{high}) \times 100].

Preparation of Ag-specific Tg T cells for adoptive transfer

Pooled LN were harvested from Tg mice. Cells were incubated with rat mAb against B220 (RA3-6B2), MHC class II (M5/114), CD11b (M1/70) and CD16/32 (2.4G2) plus CD8 (H59.101.02) for purification of 3A9 and OT-II cells or plus CD4 (H129.19.6) for purification of OT-I cells. Non-T cells were removed with anti-rat Ig-coupled Dynabeads. T cells were then labeled with 10 μ M CFSE at 37°C for 10 min. Different numbers of T cells (as indicated) were injected i.v. in 200 μ L PBS. Recipient mice were immunized 3 days after adoptive T cell transfer. To follow proliferation of CFSE-labeled T cells, popliteal LN were collected 72 h after immunization and digested with collagenase. Cells were stained with CD4-PE, CD8-PE or PE-labeled H-2K^b/SIINFEKL tetramers (Immunotech, Marseille, France).

Primary and secondary responses were analyzed following the co-transfer of CD45.1⁺ OT-II and OT-I cells into CD45.2⁺ (B6)mice. T cells were probed with CD45.1-PE, CD4-allophycocyanin (APC) and CD8-PerCPy5.5 Ab (PharMingen), and 500 000 events were collected on FACScan cytofluorimeter (Becton Dickinson). Final analysis and graphical output were performed using FlowJo software (TreeStar, Costa Mesa, CA).

FACS sorting of OT-II cells, reverse transcription of mRNA and relative quantification by PCR

Six days after immunization of OT-II cell adoptive transfer recipient mice, popliteal LN cells were harvested, stained with CD45.1-PE and CD4-PerCPCy5.5 and sorted by flow cytometry (MoFlow, DakoCytomation) into endogenous cell (CD4⁺/CD45.1⁻) and OT-II cell (CD4⁺/CD45.1⁺) fractions [25]. RNA was extracted from each fraction using RNazol B (Biogenesis, Poole, UK), and cDNA was prepared as described [25, 45]. Relative quantification of specific cDNA species message was carried out in a multiplex PCR on the ABI 7700 (Applied Biosystems, Warrington, UK). Sequences for β -actin, IL-4 and IFN- γ have been described [45]. Relative quantification of signal per cell was achieved by setting thresholds within the logarithmic phase of the PCR for β -actin and the test gene to determine the cycle number at which the threshold was reached (C_T). The C_T for the target gene was subtracted from the C_T for β -actin, and the relative amount was calculated as $2^{-\Delta C_T}$.

Acknowledgements: These studies were supported by l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (Programme Gen-homme), by a grant from the Association Pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and by contracts QL61-1999-00622 and BMH4-CT97-2503 from the European Community. K. S. was supported by fellowships from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie and from the ARC. We thank Sylvie Guerder, Sandrine Henri, Anne-Marie Schmitt-Verhulst, Marc Bajenoff and Geoffrey Brown for helpful discussions.

References

- Levin, D., Constant, S., Pasqualini, T., Flavell, R. and Bottomly, K., Role of dendritic cells in the priming of CD4⁺ T lymphocytes to peptide antigen *in vivo*. *J. Immunol.* 1993. **151**: 6742–6750.
- Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I. and Brocker, T., Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells *in vivo*. *J. Immunol.* 2001. **166**: 1439–1442.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S. et al., *In vivo* depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 2002. **17**: 211–220.
- Finkelman, F. D., Lees, A., Birnbaum, R., Gause, W. C. and Morris, S. C., Dendritic cells can present antigen *in vivo* in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J. Immunol.* 1996. **157**: 1406–1414.
- Wang, H., Griffiths, M. N., Burton, D. R. and Ghazal, P., Rapid antibody responses by low-dose, single-step, dendritic cell- targeted immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000. **97**: 847–852.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V. et al., Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *J. Exp. Med.* 2001. **194**: 769–779.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C. and Steinman, R. M., Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 2002. **196**: 1627–1638.
- Medzhitov, R. and Janeway, C. A. Jr., Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002. **296**: 298–300.
- Reddy, R., Zhou, F., Nair, S., Huang, L. and Rouse, B. T., *In vivo* cytotoxic T lymphocyte induction with soluble proteins administered in liposomes. *J. Immunol.* 1992. **148**: 1585–1589.
- Ludewig, B., Barchiesi, F., Pericin, M., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H. and Schwendener, R. A., *In vivo* antigen loading and activation of dendritic cells via a liposomal peptide vaccine mediates protective antiviral and anti-tumour immunity. *Vaccine* 2000. **19**: 23–32.
- van Broekhoven, C. L., Parish, C. R., Demangel, C., Britton, W. J. and Altin, J. G., Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. *Cancer Res.* 2004. **64**: 4357–4365.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. and Melief, C. J., T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998. **393**: 480–483.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F. and Matzinger, P., A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998. **393**: 474–478.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. and Heath, W. R., Help for cytotoxic-T-cell responses by cross-priming is mediated via CD40 signalling. *Nature* 1998. **393**: 478–480.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. and Heath, W. R., Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help. *J. Exp. Med.* 1997. **186**: 65–70.
- Battegay, M., Bachmann, M., Burkhart, C., Viville, S., Benoist, C., Mathis, D., Hengartner, H. and Zinkernagel, R., Antiviral immune responses of mice lacking MHC class II or its associated invariant chain. *Cell. Immunol.* 1996. **167**: 115–121.
- Fayolle, C., Deriaud, E. and Leclerc, C., *In vivo* induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires CD4⁺ T cell help. *J. Immunol.* 1991. **147**: 4069–4073.
- Sun, J. C. and Bevan, M. J., Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 2003. **300**: 339–342.
- Shedlock, D. J. and Shen, H., Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003. **300**: 337–339.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G. and Schoenberger, S. P., CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* 2003. **421**: 852–856.
- Sun, J. C., Williams, M. A. and Bevan, M. J., CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nat. Immunol.* 2004. **5**: 927–933.
- Serre, K., Machy, P., Grivel, J. C., Jolly, G., Brun, N., Barbet, J. and Leserman, L., Efficient presentation of multivalent antigens targeted to various cell surface molecules of dendritic cells and surface Ig of antigen-specific B cells. *J. Immunol.* 1998. **161**: 6059–6067.
- den Haan, J. M. and Bevan, M. J., Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 2002. **196**: 817–827.
- Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R. and Rajewsky, K., A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 1991. **350**: 423–426.
- Cunningham, A. F., Serre, K., Toellner, K. M., Khan, M., Alexander, J., Brombacher, F. and MacLennan, I. C., Pinpointing IL-4-independent and IL-4-influenced acquisition and maintenance of Th2 activity by CD4 T cells. *Eur. J. Immunol.* 2004. **34**: 686–694.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K. et al., The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J. Immunol.* 2001. **167**: 741–748.
- Mallet-Designe, V. I., Stratmann, T., Homann, D., Carbone, F., Oldstone, M. B. and Teyton, L., Detection of low-avidity CD4⁺ T cells using recombinant artificial APC: following the antiovalbumin immune response. *J. Immunol.* 2003. **170**: 123–131.
- Ludewig, B., Bonilla, W. V., Dumrese, T., Odermatt, B., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H., Perforin-independent regulation of dendritic cell

- homeostasis by CD8(+) T cells *in vivo*: implications for adaptive immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 2001. **31**: 1772–1779.
- 29 Ingulli, E., Ulman, D. R., Lucido, M. M. and Jenkins, M. K., *In situ* analysis reveals physical interactions between CD11b⁺ dendritic cells and antigen-specific CD4 T cells after subcutaneous injection of antigen. *J. Immunol.* 2002. **169**: 2247–2252.
- 30 Belz, G. T., Smith, C. M., Eichner, D., Shortman, K., Karupiah, G., Carbone, F. R. and Heath, W. R., Cutting edge: conventional CD8 alpha⁺ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J. Immunol.* 2004. **172**: 1996–2000.
- 31 Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M. *et al.*, Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.* 2004. **199**: 9–26.
- 32 den Haan, J. M., Lehar, S. M. and Bevan, M. J., CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 2000. **192**: 1685–1696.
- 33 Itano, A. A., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Ehst, B. D., Ingulli, E., Rudensky, A. Y. and Jenkins, M. K., Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 2003. **19**: 47–57.
- 34 Carbone, F. R., Belz, G. T. and Heath, W. R., Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity. *Trends Immunol.* 2004. **25**: 655–658.
- 35 Mintern, J. D., Davey, G. M., Belz, G. T., Carbone, F. R. and Heath, W. R., Cutting edge: precursor frequency affects the helper dependence of cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 2002. **168**: 977–980.
- 36 Smith, C. M., Wilson, N. S., Waithman, J., Villadangos, J. A., Carbone, F. R., Heath, W. R. and Belz, G. T., Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat. Immunol.* 2004. **5**: 1143–1148.
- 37 Byersdorfer, C. A., Dipaolo, R. J., Petzold, S. J. and Unanue, E. R., Following immunization antigen becomes concentrated in a limited number of APCs including B cells. *J. Immunol.* 2004. **173**: 6627–6634.
- 38 Yan, X., Scherphof, G. L. and Kamps, J. A., Liposome opsonization. *J. Liposome Res.* 2005. **15**: 109–139.
- 39 Datta, S. K., Redecke, V., Prilliman, K. R., Takabayashi, K., Corr, M., Tallant, T., DiDonato, J. *et al.*, A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2003. **170**: 4102–4110.
- 40 Machy, P., Serre, K. and Leserman, L., Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fcgamma receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2000. **30**: 848–857.
- 41 Machy, P., Serre, K., Baillet, M. and Leserman, L., Induction of MHC class I presentation of exogenous antigen by dendritic cells is controlled by CD4⁺ T cells engaging class II molecules in cholesterol-rich domains. *J. Immunol.* 2002. **168**: 1172–1180.
- 42 Wang, B., Norbury, C. C., Greenwood, R., Bennink, J. R., Yewdell, J. W. and Frelinger, J. A., Multiple paths for activation of naive CD8(+) T cells: CD4-independent help. *J. Immunol.* 2001. **167**: 1283–1289.
- 43 Bungener, L., Serre, K., Bijl, L., Leserman, L., Wilschut, J., Daemen, T. and Machy, P., Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells. *Vaccine* 2002. **20**: 2287–2295.
- 44 Ho, W. Y., Cooke, M. P., Goodnow, C. C. and Davis, M. M., Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 1994. **179**: 1539–1549.
- 45 Cunningham, A. F., Fallon, P. G., Khan, M., Vacheron, S., Acha-Orbea, H., MacLennan, I. C., McKenzie, A. N. and Toellner, K. M., Th2 activities induced during virgin T cell priming in the absence of IL-4, IL-13, and B cells. *J. Immunol.* 2002. **169**: 2900–2906.

Discussion de l'article 4

La prolifération, *in vivo*, de lymphocytes T CD4 ou de lymphocytes T CD8 spécifiques d'un antigène est très dépendante de la forme de l'antigène utilisé pour les immunisations.

Présentation dans le contexte des molécules de classe II

Lorsque l'antigène est encapsulé dans des liposomes des quantités très faibles (0,3 à 3ng) sont suffisantes pour induire la prolifération de lymphocytes TCD4, au sein des ganglions drainants. Ces liposomes sont très efficaces pour délivrer un antigène aux DC, afin qu'il soit présenté dans le contexte des molécules de classe II du CMH. Ces résultats se corrént à ceux qui sont obtenus *in vitro*, puisque des quantités beaucoup plus importantes (3µg) d'antigène soluble, sont nécessaires pour induire l'activation de ces mêmes lymphocytes T. La présence de LPS ou de CFA permet d'utiliser 10 à 100 fois moins d'antigène. Ils sont donc moins efficaces que les liposomes qui de surcroît ne sont pas toxiques, contrairement aux adjuvants classiques.

Présentation dans le contexte des molécules de classe I

Les lymphocytes T CD8 OT-I sont beaucoup plus sensibles que les lymphocytes T CD4 OT-II à la forme soluble de l'antigène, injectée par voie sous cutanée. En revanche, la réponse en terme de prolifération, de ces deux types de lymphocytes T, est équivalente lorsque l'antigène est encapsulé dans des liposomes. Cette différence de sensibilité, entre les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 issus de souris transgéniques et spécifiques du même antigène (OVA), a été rapportée par un autre groupe (Li et al., 2001). Les auteurs ont montré que l'injection par voie sanguine de l'antigène soluble permet des stimulations équivalentes des lymphocytes T OT-II et OT-I, tandis que des cellules chargées *in vitro* en antigène sont plus favorables pour l'activation des lymphocytes T OT-I que pour les lymphocytes T OT-II. Il est difficile de dire si cette sensibilité est une propriété intrinsèque, particulière aux lymphocytes T OT-I.

Néanmoins, il est important de noter qu'*in vitro* comme *in vivo*, les lymphocytes T CD8 OT-I sont extrêmement sensibles à la présentation d'antigène pour lequel ils sont spécifiques. Lorsque des DC sont chargées *in vitro*, en peptides exogènes (SIINFEKL) qui se fixent directement sur les molécules de classe I, elles stimulent très efficacement les lymphocytes T OT-I pour de faibles concentrations. Cette efficacité de stimulation n'est pas améliorée en présence d'agents (LPS) capables d'induire la maturation des DC, ni même lorsque ces DC interagissent avec des lymphocytes T CD4 reconnaissant leur antigène. Pourtant, dans un autre modèle, utilisant des DC, issues de la moelle osseuse, et des lymphocytes T CD4 et CD8, de souris transgéniques (spécifiques de l'hémagglutinine du virus de l'influenza), quelle que soit la forme de l'antigène (lysate de tumeur exprimant l'hémagglutinine, antigène soluble, peptide reconnu par les lymphocytes T CD8), les lymphocytes T CD4 jouent un rôle

important, permettant aux DC d'activer les lymphocytes T CD8 (Lu et al., 2000). La sensibilité de ces deux types de lymphocytes T CD8, issus de souris transgéniques, est donc très différente.

Dans ce contexte, les liposomes permettent de diminuer seulement de 10 fois la quantité d'antigène nécessaire à la stimulation des lymphocytes T CD8, *in vivo*, par rapport à l'antigène sous forme soluble. On peut imaginer deux hypothèses : 1) soit qu'il manque des signaux d'activation aux DC, pour activer les lymphocytes T CD8 à de plus faibles concentrations, 2) soit que le système est, en lui-même, suffisamment efficace, compte tenu que les lymphocytes T CD4 endogènes pourraient fournir le "help" aux DC.

En ce qui concerne le manque de signaux délivrés aux DC pour optimiser leur présentation d'antigènes encapsulés dans les liposomes, dans le contexte des molécules de classe I, nous avons co-transféré des lymphocytes T CD4 OT-II et des lymphocytes T CD8 OT-I. Nous n'avons pas observé d'amélioration quant à l'activation des lymphocytes T CD8 OT-I en présence de ces lymphocytes T CD4 OT-II (résultats non montrés). Ceci pourrait provenir du fait que ces deux types de lymphocytes T ont des réponses équivalentes lorsque les souris sont injectées avec des liposomes contenant l'antigène. La dose limite d'antigène permettant d'induire l'activation des lymphocytes T après immunisation semble être du même ordre de grandeur, quel que soit l'antigène ou les lymphocytes T utilisés.

Il serait donc plus probable que le système soit suffisamment efficace par lui-même, et que les lymphocytes T CD4 endogènes jouent un rôle important dans le processus d'activation des DC leur permettant de présenter l'antigène par les molécules de classe I.

Afin de vérifier que l'antigène doit être redistribué dans le cytoplasme pour être présenté par les molécules de classe I naissantes dans le réticulum endoplasmique, nous avons immunisé des souris déficientes en TAP. La prolifération des lymphocytes T CD8 OT-I n'est jamais induite dans ces souris quelle que soit la forme et la quantité d'antigène utilisé lors des immunisations. Partant du principe que les DC doivent redistribuer leurs antigènes dans le cytoplasme, nous avons étudié le rôle des lymphocytes T CD4 endogènes. Dans l'ensemble de la population de lymphocytes T CD4, certains peuvent potentiellement être spécifiques de l'antigène présenté dans le contexte des molécules de classe II et délivrer le signal nécessaire aux DC pour qu'elles acquièrent la propriété d'activer les lymphocytes T CD8. Il faut noter que le peptide SIINFEKL, encapsulé dans les liposomes, ne permet pas aux DC d'activer les lymphocytes T CD8 (article 2 Fig. 4) *in vitro* et, il en est de même *in vivo* (résultats non montrés). De ce fait, nous avons systématiquement utilisé des liposomes contenant l'antigène sous la forme de protéine totale (OVA), et il n'a pas été possible de limiter l'activation des lymphocytes T CD4 endogènes en jouant avec l'utilisation des peptides.

Toutefois, lorsque des souris sont déplétées en lymphocytes T CD4, par injection d'anticorps spécifiques de la molécule CD4, la prolifération des lymphocytes T CD8 est inhibée pour les

faibles concentrations en antigène (OVA) encapsulé dans les liposomes. Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T CD4 endogènes pourraient induire dans les DC, le passage de l'antigène des vésicules d'internalisation vers le cytoplasme. A de fortes concentrations d'antigènes, les lymphocytes T CD8 pourraient par eux-mêmes activer les DC, et fournir leur propre "help". Il a d'ailleurs été montré que des lymphocytes T CD8 induisent l'activation des DC *in vivo* (Ruedl et al., 1999).

Pourquoi les liposomes sont-ils si efficaces *in vivo* ?

Après injections par voie sous cutanée les liposomes, contenant des antigènes, sont capturés par les DC qui présentent ensuite des peptides dérivés de ces antigènes aux lymphocytes T. *In vitro*, comme *in vivo*, l'efficacité des liposomes peut s'expliquer par leur capacité à délivrer un grand nombre de molécules d'antigène, dans des compartiments dédiés à la présentation antigénique, dans les DC. *In vitro*, en absence de reconnaissance spécifique, les liposomes sont peu efficaces pour délivrer un antigène, puisque des concentrations aussi fortes que pour l'antigène sous forme soluble sont nécessaires pour que les DC activent des lymphocytes T. En revanche, lorsqu'ils sont capturés via le FcR, ces mêmes liposomes activent les DC et leur permettent de présenter l'antigène à de très faibles concentrations. Au vue des résultats obtenus *in vivo*, nous pouvons supposer que la capture des liposomes est dépendante de certains récepteurs (FcR ?) bien que nous ne les ayons pas encore identifiés. Les liposomes peuvent être recouverts par des opsonines (immunoglobulines, molécules du complément, protéine C réactive...), pouvant ensuite être reconnus par des récepteurs et permettre l'activation des DC qui les capturent.

Conclusions

Le ciblage d'antigènes sur un récepteur spécifiquement exprimés par les DC, grâce à un anticorps spécifique de DEC-205 couplé à un antigène, s'est révélé extrêmement efficace pour induire la prolifération des lymphocytes T CD4 ayant été au préalable transférés dans des souris receveuses (Hawiger et al., 2001). Cependant, les auteurs ont également montré que même si cette activation est plus efficace qu'après immunisation avec le peptide en présence de CFA, le nombre de lymphocytes T CD4 produits décroît rapidement et les cellules restantes ne répondent plus à une nouvelle immunisation. Ces résultats suggèrent que l'expansion d'une population de lymphocytes T spécifiques d'un antigène n'est pas un événement qui doit être systématiquement corrélé à l'induction d'une immunité, mais qu'il peut également aboutir à l'induction d'une tolérance. En effet, après prolifération, ces lymphocytes T peuvent pour une grande partie être éliminés, et les cellules restantes ne plus répondre à l'antigène. Ainsi, une tolérance contre l'antigène est générée lorsque l'antigène est ciblé sur les DC sans induire leur activation. Actuellement, il est postulé que le contrôle de la tolérance périphérique par les DC pourrait reposer sur leur potentiel à induire l'activation de lymphocytes T régulateurs capables de produire de l'IL-10 (Tr). Néanmoins, la coinjection de

cette protéine chimérique avec un anticorps agoniste spécifique de CD40, permet de soutenir l'activation des lymphocytes T CD4 et d'induire une immunité. Il est raisonnable de penser que l'engagement de CD40 active les DC, ce qui permet de transformer ces cellules "tolérogènes" en cellules "immunogènes".

Des expériences complémentaires sont donc nécessaires dans notre système, afin de vérifier, pour chaque formulation d'antigène, que les lymphocytes T activés sont responsables d'une immunité protectrice et mémoire. L'efficacité des liposomes dans l'induction de réponses protectrices anti-virales ou anti-tumorales a cependant été reportée (Ludewig et al., 2000). Nous envisageons deux approches.

La première est de suivre le devenir, après transfert adoptif, des lymphocytes T en fonction de la forme de l'antigène utilisé pour les immunisations. Le marqueur fluorescent (CFSE) étant perdu après 8 à 9 divisions au bout de quatre jours, nous utiliserons un marqueur génétique afin de suivre plus longuement les lymphocytes T après activation. Les souris transgéniques pour leurs TCR spécifiques de l'OVA (OT-II et OT-I) sur fond B6 exprimant l'allèle CD45.2 (Ly5.2) sont en croisement avec des souris homozygotes pour l'allèle CD45.1 (Ly5.1). Ainsi, les lymphocytes T pourront être analysés à plus long terme après transfert adoptif, sur la base de l'expression de CD45.1, tandis que les cellules des souris receveuses exprimeront toutes CD45.2. Nous pourrions contrôler d'une part, si la forte prolifération induite après immunisation conduit à un nombre conséquent de lymphocytes T après quelques jours et d'autre part, le profil de sécrétion de cytokines de ces lymphocytes T (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10...). Ceci nous permettra de définir l'influence de la forme de l'antigène sur le devenir (survie ?) et sur la polarisation (Th1, Th2 ?) des lymphocytes T.

La seconde est de mesurer l'influence d'une population de lymphocytes T activés et mémoires sur une population naïve. Les souris seront transférées en lymphocytes T de spécificité connue, puis immunisées. Nous analyserons ensuite l'influence des lymphocytes T mémoires produits lors de cette première immunisation sur des lymphocytes T naïfs nouvellement transférés. Si la première immunisation a généré une immunité mémoire la seconde réponse devrait être identique ou supérieure, en revanche si une tolérance (émergence de lymphocytes T régulateurs produisant de l'IL-10 ?) a été initialement induite la seconde réponse devrait être nettement inhibée.

La caractérisation des antigènes capables d'induire l'activation de lymphocytes T CD4 et CD8, responsables de la mise en place d'une immunité contre des antigènes choisis, est d'un intérêt primordial dans le cadre de la vaccination ou d'immunothérapie contre le cancer.

Discussion

IV)- Discussion

Les cellules dendritiques

Elles sont extrêmement efficaces pour présenter des antigènes exogènes dans le contexte des molécules de classe II. Vraisemblablement, lorsqu'un antigène est capturé par les DC, il est systématiquement présenté aux lymphocytes T CD4. Il est important de noter, d'ores et déjà, qu'en revanche, la présentation aux lymphocytes T CD8 nécessite des signaux supplémentaires. Même si les DC présentent "facilement" des antigènes exogènes dans le contexte des molécules de classe II, la forme de l'antigène qu'elle rencontre, a des conséquences très importantes : 1) sur la façon dont les complexes classe II/peptide sont organisés à la surface cellulaire, 2) sur leur état d'activation, 3) sur le signal qu'elles reçoivent, en retour, lors de leur interaction avec des lymphocytes T CD4, 4) sur le devenir des lymphocytes T CD4. En effet, un antigène soluble est présenté efficacement, mais nécessite de très fortes concentrations (tolérogène ?). Au contraire, lorsque l'antigène est encapsulé dans des liposomes qui sont capturés par un récepteur (FcR ?) exprimé par les DC, leur potentiel à stimuler des lymphocytes T CD4 est grandement amélioré pour de très faibles concentrations (immunogène ?).

Différents paramètres contrôlent l'interaction existant entre des DC et des lymphocytes T CD4. Tout d'abord, la quantité d'antigène internalisé, va conditionner : le nombre de complexes classe II/peptide exprimés en surface, ensuite, la manière dont ces complexes sont organisés à la membrane plasmique, (à savoir : concentrés dans des microdomaines riches en cholestérol, ou bien dispersés à la surface cellulaire), et enfin, l'état d'activation des DC et notamment leur niveau d'expression des molécules de costimulation régulant la stimulation des lymphocytes T CD4. Un dialogue s'instaure entre les DC et les lymphocytes T CD4. Il a d'importantes conséquences sur le devenir des DC et, par exemple, sur leur capacité à présenter l'antigène dans le contexte des molécules de classe I, ainsi que sur le devenir des lymphocytes T CD4 activés.

Lorsque les DC capturent des antigènes grâce au FcR, elles les présentent par leurs molécules de classe II, organisées en microdomaines riches en cholestérol. Pour de faibles concentrations, l'activation des lymphocytes T CD4 est très efficace. Ceux-ci renverraient un signal aux DC qui permettrait aux antigènes, encore concentrés dans les vésicules endocytiques, de passer dans le cytoplasme et d'être ensuite dégradés par le système classique faisant intervenir le protéasome (Figure 28). Les peptides ainsi générés seraient transportés dans le réticulum endoplasmique grâce au transporteur TAP, et pourraient alors se fixer sur les molécules de classe I naissantes. Les complexes classe I/peptide seraient alors exportés à la surface membranaire, permettant ainsi aux DC de présenter aux lymphocytes T CD8, l'antigène exogène contenu dans les liposomes internalisés. Il a été montré dans le laboratoire que la combinaison d'anticorps, anti-classe II/anti-CD40/thapsigargine (Ca²⁺), pouvait se substituer aux lymphocytes T CD4, suggérant que ce signal de retour serait envoyé par les

molécules de classe II et par CD40. La nécessité de la thapsigargine laisse supposer que d'autres molécules pourraient également intervenir dans cette signalisation, induisant un influx calcique.

Le système nous a permis *in vitro* de dissocier, la forme des antigènes reçus par les DC, pour lesquels les lymphocytes T CD4, ou les lymphocytes T CD8 sont spécifiques. Ainsi, lorsque les DC présentent un peptide, qui se fixe "passivement" sur les molécules de classe II dispersées à la membrane plasmique, l'activation des lymphocytes T CD4 se produit aussi mais pour de fortes concentrations. Néanmoins, ceux-ci ne semblent pas renvoyer un signal de retour aux DC qui ne présentent pas aux lymphocytes T CD8 un autre antigène qu'elles auraient acquis via les liposomes opsonisés.

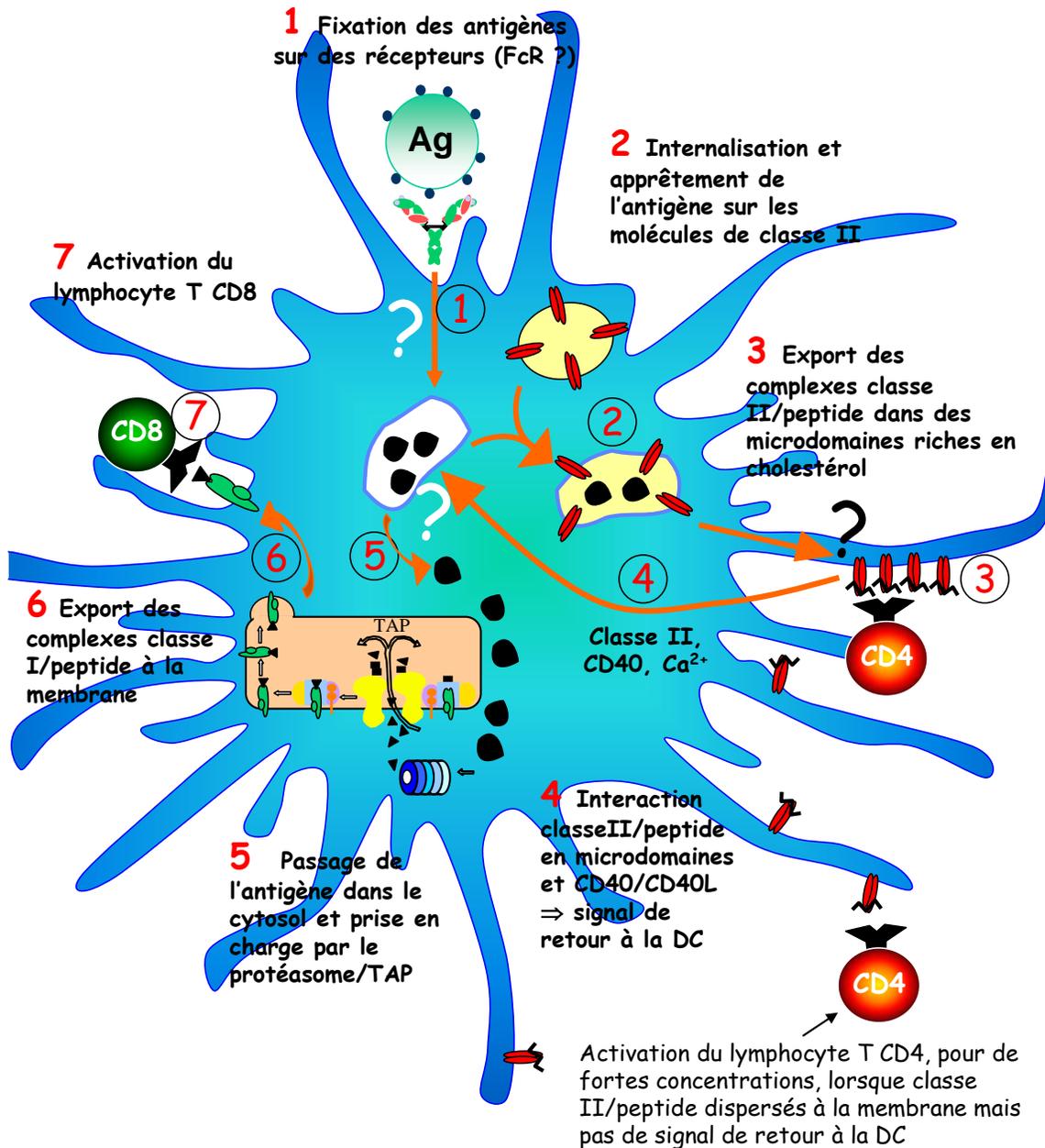


Figure 28 : Rôle des lymphocytes T CD4 dans l'acquisition de la propriété de présentation par les molécules de classe I, par les cellules dendritiques.

Copyright © 2002 Dr Karine SERRE

De nombreuses interrogations subsistent cependant encore, tout au long de ce scénario, et notamment sur les bases moléculaires précises des différentes étapes. Tout d'abord, sur l'identification de récepteurs (outre le FcR) qui peuvent rendre compte de la capture de grandes quantités d'antigènes et de leur concentration dans des compartiments de présentation permettant l'expression des complexes classe II/peptide dans des microdomaines, et surtout de l'activation des DC. Ensuite, les mécanismes permettant l'exportation des molécules de classe II chargées en peptides dans les microdomaines riches en cholestérol ne sont pas identifiés. De plus, la composition de ces structures moléculaires n'est pas caractérisée. En particulier, la présence de molécules de costimulation et de transduction de signaux, qui pourraient être associées aux molécules de classe II, et qui seraient impliquées dans ce signal, qui entraînerait le passage de l'antigène des vésicules endocytiques vers le cytosol. Même s'il semble que les molécules de classe II et CD40 jouent un rôle important, la part respective des molécules impliquées reste encore à déterminer. De même, la caractérisation des compartiments qui contiennent encore l'antigène et le mécanisme précis de translocation dans le cytosol, sont à élucider.

Enfin, les DC présentant un antigène par des molécules de classe II, qu'elles soient concentrées dans des domaines riches en cholestérol ou dispersées à la surface, interagissent toujours avec des lymphocytes T CD4. Il sera intéressant d'analyser plus en détail les conséquences, pour les DC, notamment sur leurs productions de cytokines (IL-12, IL-10, ...), de cette interaction avec les lymphocytes T CD4, selon qu'elles expriment des molécules de classe II dans des microdomaines ou dispersées à la surface. Les signaux qu'elles reçoivent des lymphocytes T CD4 restent à déterminer en ce qui concerne leur physiologie, la présentation antigénique, le trafic vésiculaire, et leur survie.

Les lymphocytes T CD4

Il est possible que les informations qu'ils reçoivent soient différentes selon qu'ils sont activés par des DC exprimant des molécules de classe II organisées dans des microdomaines ou dispersées à la membrane plasmique. Il a été proposé, que la densité des complexes classe II/peptide, à la surface de la cellule présentatrice, pourrait conduire à une polarisation différentielle vers Th1 (forte densité) ou Th2 (faible densité) (Murray, 1998, Constant and Bottomly, 1997) et en particulier selon l'expression de CD40L (Ruedl et al., 2000). Nous pouvons imaginer que, lorsque les molécules de classe II sont concentrées dans des microdomaines, la densité soit forte, tandis que lorsqu'elles sont dispersées à la surface, la densité soit faible.

Il a été montré dans le laboratoire, que l'organisation des molécules de classe II à la surface cellulaire avait une influence importante sur le programme de différenciation des lymphocytes T CD4 (Figure 29).

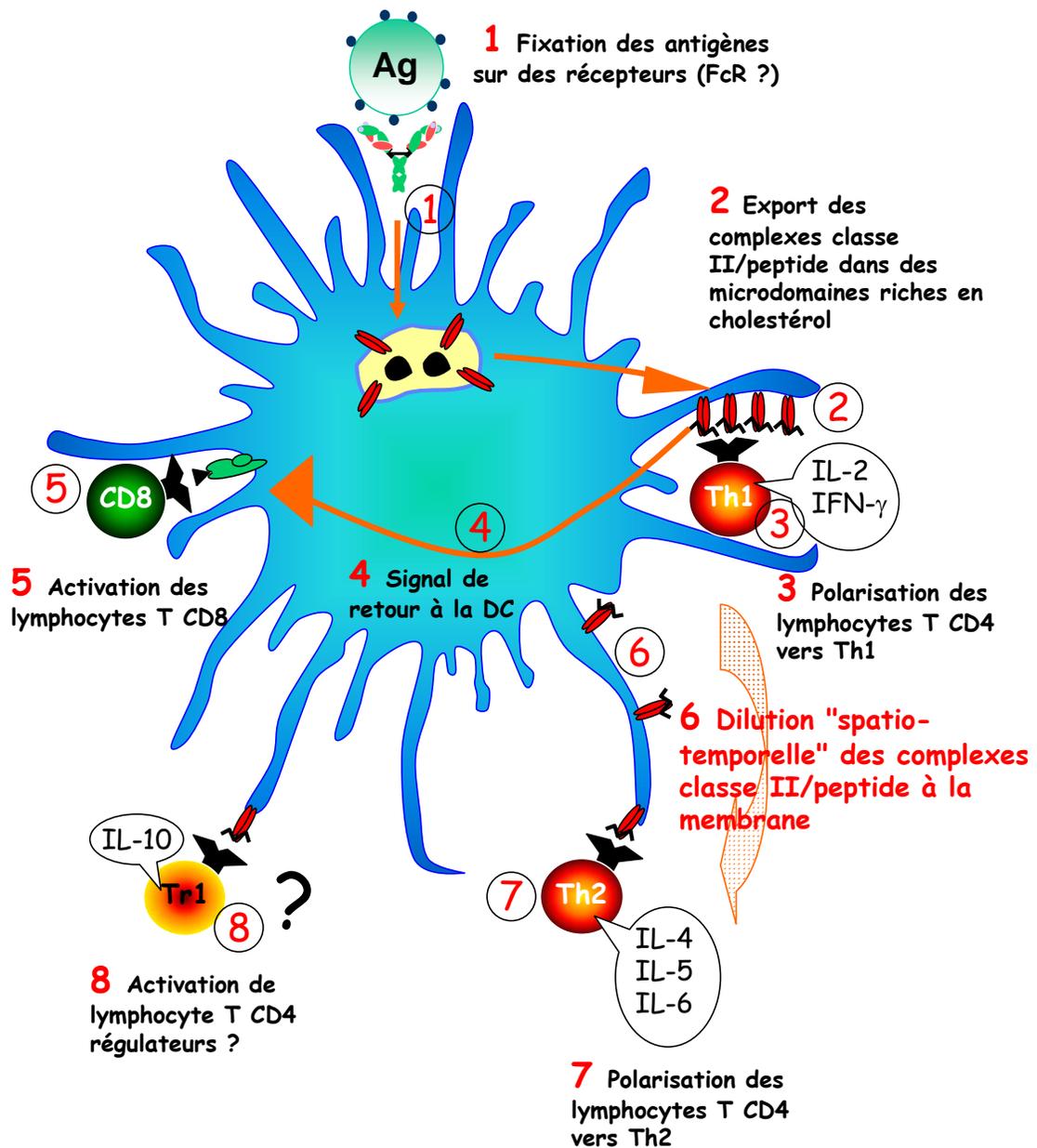


Figure 29 : Propriétés des cellules dendritiques à polariser des lymphocytes T CD4 vers Th1 ou Th2, en fonction de l'organisation des molécules de classe II exprimées à leur surface membranaire.

Copyright © 2002 Dr Karine SERRE

Lorsque les lymphocytes T CD4 sont activés par des DC, ayant leurs molécules de classe II concentrées dans des domaines riches en cholestérol, ils entreraient dans un programme de différenciation de type Th1. Au contraire, lorsque les complexes classe II/peptide sont dispersés à la surface des DC (incubations avec des peptides, déplétion en cholestérol par la methyl β cyclodextrine, "dilution spatio-temporelle") les lymphocytes T CD4 sont activés mais s'engagent dans un programme de différenciation de type Th2. Ces résultats corrélerent avec d'autres études qui ont récemment montré que des lymphocytes T CD4 activés et polarisés vers Th1, avaient leurs TCR organisés en "raft", alors que des lymphocytes T CD4 polarisés vers Th2 avaient leurs TCR exclus de ces structures (Balamuth et al., 2001). Il est possible que ce soit la manière dont les molécules de classe II sont organisées à la surface de la DC qui puisse influencer le programme de différenciation dans lequel s'engage les lymphocytes T CD4 lors de leur activation. De plus, des expériences de microscopie en fluorescence suggèrent que les molécules de classe II, qui sont exportées de l'intérieur de la DC vers la surface cellulaire, sont tout d'abord concentrées dans les microdomaines riches en cholestérol, mais qu'ensuite elles se disperseraient le long de la membrane. Cette "dilution" des molécules de classe II, à la surface membranaire au cours du temps, a été corrélée, à la perte du potentiel à polariser vers Th1 au profit de l'acquisition du potentiel à polariser vers Th2. Une autre étude a proposé cette possibilité pour une même DC, d'induire un programme de différenciation des lymphocytes T CD4 vers Th1 au début de l'activation puis vers Th2 au cours du temps (Langenkamp et al., 2000). Les auteurs ont corrélé les capacités de polarisation des lymphocytes T CD4 des DC, à leur capacité à produire de l'IL-12 après activation. Cette production s'achevant après quelques heures, temps à partir duquel les DC qui présentent toujours vont induire une réponse de type Th2.

Il serait intéressant de comprendre au niveau des lymphocytes T CD4 les bases moléculaires responsables de la différenciation vers Th1 ou Th2 selon le type de stimulation, c'est-à-dire par des complexes classe II/peptide concentrés dans les microdomaines, ou bien, répartis à la surface des DC. Plusieurs aspects restent à caractériser : 1) les molécules impliquées en surface et leur organisation dans la membrane et en particulier le rôle de la synapse immunologique dans ces deux types de stimulation, 2) les signaux intracellulaires (phosphorylations des ITAM du complexe TCR, cinétique et amplitude de l'influx calcique, facteurs de transcription recrutés...) qui conduisent à l'expression différentielle de certains gènes et à la sécrétion de certains profil de cytokines.

La réponse immune

En périphérie à l'état d'équilibre (Figure 30A), les DC immatures scrutent leur environnement. En absence de signaux de l'inflammation, elles internalisent des antigènes de l'hôte de manière "passive" (macropinocytose, capture de corps apoptotiques, antigène soluble?...), c'est-à-dire sans que cela ne déclenche leur activation. Sous l'influence de stimuli, qui ne sont pas encore identifiés, mais qui pourraient être tout simplement le renouvellement

classique des DC (demi-vie), ou bien de petits stress induits sans signaux de "danger" (injection d'antigène soluble?), elles migrent spontanément vers les organes lymphoïdes. Là, elles présentent dans le contexte des molécules de classe II, aux lymphocytes T CD4, les antigènes qu'elles ont internalisé en périphérie. Ce processus permet probablement de maintenir à la fois, l'homéostasie des lymphocytes T, mais aussi la tolérance périphérique contre les antigènes du soi. Les mécanismes responsables de la tolérance périphérique des clones auto-réactifs, peuvent être la délétion (Kurts et al., 1998), ou bien le développement d'un état de non réponse (anergie) (Adelstein et al., 1991). De plus, des lymphocytes T "régulateurs", ayant un potentiel à inhiber des réponses se mettant en place ont été identifiés (Shevach, 2000). A l'heure actuelle, le terme de lymphocytes T régulateurs est utilisé pour décrire un certain nombre de populations capables de réguler des réponses *in vitro* et *in vivo*. Parmi celles-ci, il existe une population de lymphocytes T CD4 dont les propriétés d'inhibition des réponses immunes reposent sur leur capacité à produire de grande quantité d'IL-10 et de TGF- β : ce sont les lymphocytes Tr1 (Groux et al., 1997). De plus en plus d'évidences suggèrent que les DC "immatures", qui ont migré de façon spontanée peuvent interagir avec des lymphocytes T CD4 et induire leur différenciation en lymphocytes Tr1 (Jonuleit et al., 2001). Ces DC pourraient être considérées comme "tolérogènes" (Roncarolo et al., 2001). Les lymphocytes Tr1 ainsi activés pourraient maintenir un état de tolérance et agir à différents niveaux (périphérie ou ganglion) en produisant des cytokines immunosuppressives (IL-10 et TGF- β) assurant ainsi un statut supprimeur. Cependant, les mécanismes d'activation de ces lymphocytes Tr ne sont pas encore caractérisés.

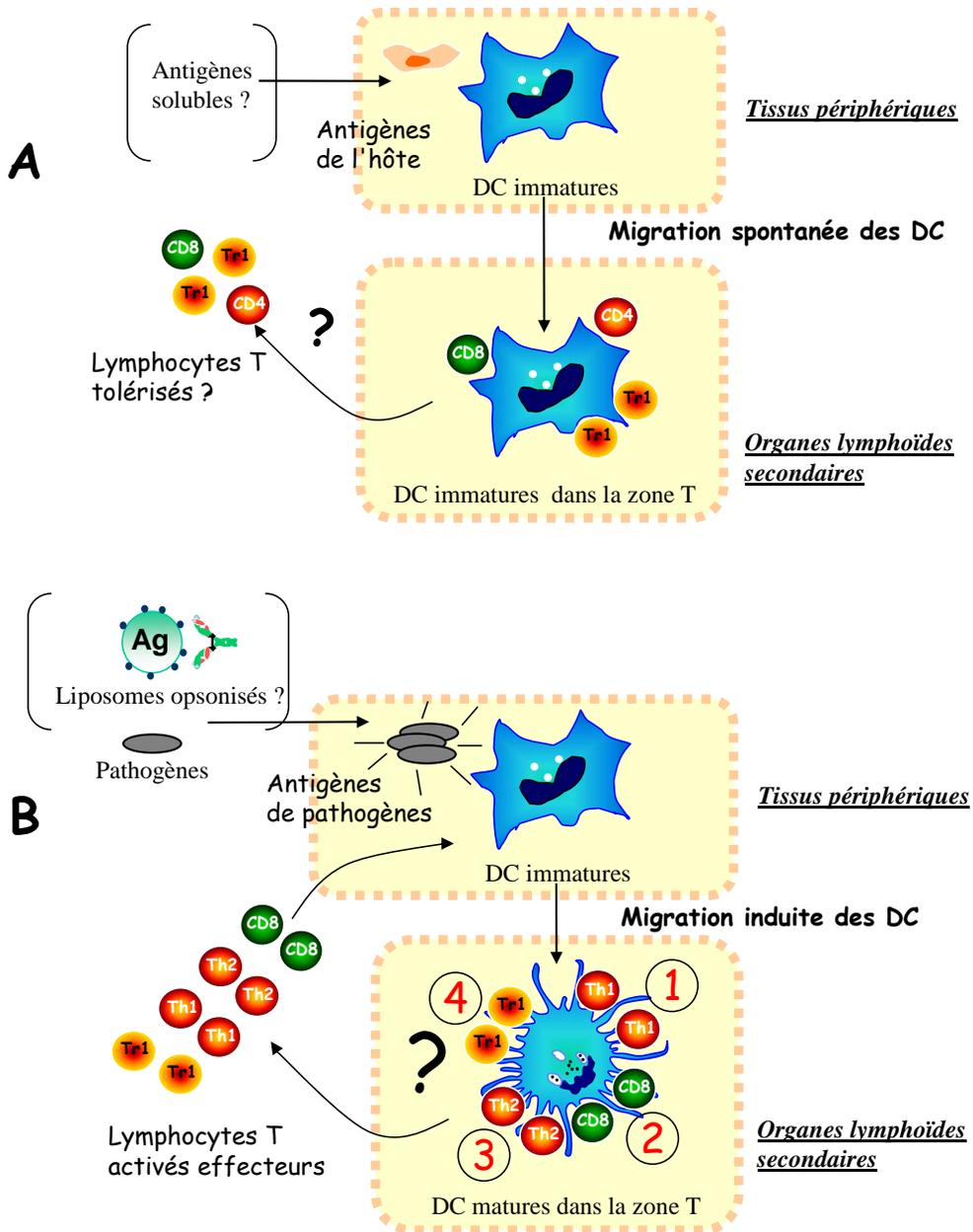


Figure 30 : Contrôle de la tolérance périphérique et de l'induction d'une immunité par les cellules dendritiques.
Copyright © 2002 Dr Karine SERRE

Lors d'une infection (ou lors d'une immunisation par voie sous cutanée), la forme de l'antigène va avoir d'importantes conséquences sur la quantité d'antigène capturé par les DC immatures en périphérie, et sur leur état d'activation (Figure 30B). Elles internalisent tout d'abord de grandes quantités d'antigènes de manière "active" (FcR?, CR?...), c'est-à-dire qui déclenche leur stimulation et le processus de maturation. A ce stade, pour induire une immunité, les antigènes doivent être reconnus et internalisés par des récepteurs ayant trois propriétés. Tout d'abord, ils doivent permettre la concentration des antigènes dans des compartiments dédiés à la présentation antigénique. Ensuite, ils doivent favoriser l'expression des complexes, de molécules de classe II associées à des peptides, dans des microdomaines riches en cholestérol à la membrane plasmique des DC. Enfin, ils doivent être agrégés et induire l'activation et la migration des DC, de sorte à ce que celles-ci soient "immunogènes". Les FcR rendent compte de ces trois propriétés lorsqu'ils sont ciblés, *in vitro*, par des liposomes contenant l'antigène. Sous l'influence du pathogène, et de la forme de l'antigène, et de l'environnement local "stressé" par l'infection, les DC engagent un processus de maturation pour rejoindre le ganglion lymphatique drainant. Elles transportent, ainsi aux lymphocytes T, des informations concernant la structure antigénique invasive (présentation de peptides dérivés de protéines en association avec les molécules du CMH), et des informations sur la capacité de l'antigène et du microenvironnement à activer les DC (expression de molécules de costimulation). Là, les DC qui sont alors matures, devraient être capables d'induire l'activation des lymphocytes T CD4. La forme de l'antigène qu'elles ont rencontré en périphérie, va conditionner la manière dont leurs molécules de classe II sont organisées à leur surface, ainsi que probablement leur capacité à produire de l'IL-12. Lors de la mise en place de la réponse primaire, les premières DC qui arrivent vont rencontrer des lymphocytes T CD4 naïfs. Si elles ont capturé des antigènes sous formes vésiculaires, via un récepteur adéquat (FcR?), les molécules de classe II sont alors concentrées à leur surface. Durant leur interaction avec les lymphocytes T CD4 ceux-ci délivreraient un signal dans les DC pour qu'elles présentent les antigènes dans le contexte des molécules de classe I et devraient, de façon concomitante, se différencier vers Th1. Les DC, qui présenteraient alors l'antigène par leurs molécules de classe I, pourraient activer des lymphocytes T CD8. Il a été montré que les lymphocytes T CD4 Th1 permettaient aux DC d'exprimer des molécules les protégeant de la mort par apoptose qui peut être induite par des lymphocytes T CD8 (Medema et al., 2001). Le rôle des lymphocytes T CD4 pourrait donc être plus important et ne pas se limiterait pas à l'induction de la capacité de présenter un antigène dans le contexte des molécules de classe I. Durant ce processus, si les DC sont toujours vivantes, leurs molécules de classe II se disperseraient à leur membrane. Si elles interagissent à présent avec de nouveaux lymphocytes T CD4, elles devraient induire leur activation et l'engagement de leur programme de différenciation vers Th2. Il reste encore à définir dans ce scénario la possibilité que les DC activent des lymphocytes T régulateurs, et à comprendre les mécanismes.

Enfin, au-delà de l'intérêt fondamental, ces études peuvent aussi permettre de mieux comprendre et d'optimiser les approches vaccinales visant à générer une réponse immune. A l'heure actuelle, elles peuvent être basées sur l'utilisation de DC incubées *ex vivo* avec des antigènes (peptide associé aux molécules de classe II libre ou encapsulé dans des liposomes) et ensuite réinjectées, ou sur l'injection directe des peptides ou des liposomes. Dans les deux cas, on peut aisément concevoir que le type de réponse obtenu avec des peptides soit qualitativement différent de celui obtenu avec des liposomes, le premier étant plutôt tolérogène (lymphocytes T régulateurs ? Th2 ?) et le second plutôt immunogène (Th1 ?), avec dans ce dernier cas seulement une activation efficace de la DC pour qu'elle puisse activer des lymphocytes T CD8.

Bibliographie

V)- Bibliographie

- Adelstein, S., Pritchard-Briscoe, H., Anderson, T. A., Crosbie, J., Gammon, G., Loblay, R. H., Basten, A., and Goodnow, C. C. (1991). Induction of self-tolerance in T cells but not B cells of transgenic mice expressing little self antigen, *Science* 251, 1223-5.
- Adema, G. J., Hartgers, F., Verstraten, R., de Vries, E., Marland, G., Menon, S., Foster, J., Xu, Y., Nooyen, P., McClanahan, T., *et al.* (1997). A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells, *Nature* 387, 713-7.
- Aderem, A., and Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, *Nature* 406, 782-7.
- Agger, R., Witmer-Pack, M., Romani, N., Stossel, H., Swiggard, W. J., Metlay, J. P., Storzynsky, E., Freimuth, P., and Steinman, R. M. (1992). Two populations of splenic dendritic cells detected with M342, a new monoclonal to an intracellular antigen of interdigitating dendritic cells and some B lymphocytes, *J Leukoc Biol* 52, 34-42.
- Aiba, S., and Katz, S. I. (1990). Phenotypic and functional characteristics of in vivo-activated Langerhans cells, *J Immunol* 145, 2791-6.
- Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N. (1998a). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes, *J Exp Med* 188, 1359-68.
- Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998b). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs, *Nature* 392, 86-9.
- Allavena, P., Piemonti, L., Longoni, D., Bernasconi, S., Stoppacciaro, A., Ruco, L., and Mantovani, A. (1998). IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages, *Eur J Immunol* 28, 359-69.
- Allen, P. M., Babbitt, B. P., and Unanue, E. R. (1987). T-cell recognition of lysozyme: the biochemical basis of presentation, *Immunol Rev* 98, 171-87.
- Allen, P. M., Strydom, D. J., and Unanue, E. R. (1984). Processing of lysozyme by macrophages: identification of the determinant recognized by two T-cell hybridomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2489-93.
- Alving, C., Koulchin, V., Glenn, G., and Rao, M. (1995). Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides., *Immunol Rev* 145, 5-31.
- Amigorena, S., and Bonnerot, C. (1999a). Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing, *Immunol Rev* 172, 279-84.
- Amigorena, S., and Bonnerot, C. (1999b). Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and class II molecules, *Semin Immunol* 11, 385-90.
- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., and Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function, *Nature* 390, 175-9.
- Anderson, H. A., Hiltbold, E. M., and Roche, P. A. (2000). Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation, *Nat Immunol* 1, 156-62.
- Anderson, K. V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response, *Curr Opin Immunol* 12, 13-9.
- Anjuere, F., del Hoyo, G. M., Martin, P., and Ardavin, C. (2000a). Langerhans cells develop from a lymphoid-committed precursor, *Blood* 96, 1633-7.
- Anjuere, F., Martin, P., Ferrero, I., Fraga, M. L., del Hoyo, G. M., Wright, N., and Ardavin, C. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse, *Blood* 93, 590-8.

- Anjuere, F., Martinez del Hoyo, G., Martin, P., and Ardavin, C. (2000b). Langerhans cells acquire a CD8+ dendritic cell phenotype on maturation by CD40 ligation, *J Leukoc Biol* 67, 206-9.
- Ardavin, C. (1997). Thymic dendritic cells, *Immunol Today* 18, 350-61.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population, *Nature* 362, 761-3.
- Arkema, A., Huckriede, A., Schoen, P., Wilschut, J., and Daemen, T. (2000). Induction of cytotoxic T lymphocyte activity by fusion-active peptide- containing virosomes, *Vaccine* 18, 1327-33.
- Arndt, S. O., Vogt, A. B., Markovic-Plese, S., Martin, R., Moldenhauer, G., Wolpl, A., Sun, Y., Schadendorf, D., Hammerling, G. J., and Kropshofer, H. (2000). Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells, *Embo J* 19, 1241-1251.
- Austyn, J. M., Hankins, D. F., Larsen, C. P., Morris, P. J., Rao, A. S., and Roake, J. A. (1994). Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney, *J Immunol* 152, 2401-10.
- Avice, M. N., Sarfati, M., Triebel, F., Delespesse, G., and Demeure, C. E. (1999). Lymphocyte Activation Gene-3, a MHC Class II Ligand Expressed on Activated T Cells, Stimulates TNF-alpha and IL-12 Production by Monocytes and Dendritic Cells, *J Immunol* 162, 2748-2753.
- Bachmann, M. F., Lutz, M. B., Layton, G. T., Harris, S. J., Fehr, T., Rescigno, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1996). Dendritic cells process exogenous viral proteins and virus-like particles for class I presentation to CD8+ cytotoxic T lymphocytes, *Eur J Immunol* 26, 2595-600.
- Balamuth, F., Leitenberg, D., Unternaehrer, J., Mellman, I., and Bottomly, K. (2001). Distinct patterns of membrane microdomain partitioning in Th1 and th2 cells, *Immunity* 15, 729-38.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392, 245-52.
- Bangham, A. D., and Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, *J Mol Biol* 8, 660-668.
- Bangham, A. D., Standish, M. M., and Watkins, J. C. (1965). Diffusion of swollen lipids, *J Mol Biol* 16.
- Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA- based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements, *Immunol Cell Biol* 76, 34-40.
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway, *Int Immunol* 12, 1539-46.
- Bates, E. E., Fournier, N., Garcia, E., Valladeau, J., Durand, I., Pin, J. J., Zurawski, S. M., Patel, S., Abrams, J. S., Lebecque, S., *et al.* (1999). APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, *J Immunol* 163, 1973-83.
- Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R. M., and Bhardwaj, N. (1996). Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood, *J Immunol Methods* 196, 121-35.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses by cross-priming is mediated via CD40 signalling, *Nature* 393, 478-80.
- Bharadwaj, D., Stein, M. P., Volzer, M., Mold, C., and Du Clos, T. W. (1999). The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II, *J Exp Med* 190, 585-90.
- Bieber, T., de la Salle, H., Wollenberg, A., Hakimi, J., Chizzonite, R., Ring, J., Hanau, D., and de la Salle, C. (1992). Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI), *J Exp Med* 175, 1285-90.
- Bjorck, P., and Kincade, P. W. (1998). CD19+ pro-B cells can give rise to dendritic cells in vitro, *J Immunol* 161, 5795-9.

- Blom, B., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (2000). Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells, *J Exp Med* 192, 1785-96.
- Bonnerot, C., and Daeron, M. (1994). Biological activities of murine low-affinity Fc receptors for IgG, *Immunomethods* 4, 41-7.
- Boog, C. J., Kast, W. M., Timmers, H. T., Boes, J., de Waal, L. P., and Melief, C. J. (1985). Abolition of specific immune response defect by immunization with dendritic cells, *Nature* 318, 59-62.
- Borkowski, T. A., Letterio, J. J., Farr, A. G., and Udey, M. C. (1996). A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells, *J Exp Med* 184, 2417-22.
- Borrow, P., Tishon, A., Lee, S., Xu, J., Grewal, I. S., Oldstone, M. B., and Flavell, R. A. (1996). CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8+ CTL response, *J Exp Med* 183, 2129-42.
- Bottomly, K. (1999). T cells and dendritic cells get intimate, *Science* 283, 1124-5.
- Brandl, M. (2001). Liposomes as drug carriers: a technological approach, *Biotechnol Annu Rev* 7, 59-85.
- Brocker, T., Riedinger, M., and Karjalainen, K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo, *J Exp Med* 185, 541-50.
- Brossart, P., and Bevan, M. J. (1997). Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines, *Blood* 90, 1594-9.
- Brown, B. K., Li, C., Cheng, P. C., and Song, W. (1999). Trafficking of the Igalpha/Igbeta heterodimer with membrane Ig and bound antigen to the major histocompatibility complex class II peptide-loading compartment, *J Biol Chem* 274, 11439-46.
- Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Thielemans, K., Goldman, M., and Willems, F. (1997). Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor, *Eur J Immunol* 27, 756-62.
- Bungener, L., Serre, K., Bijl, L., Leserman, L., Wilschut, J., Deamen, T., and Machy, P. (2002). Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells : efficient MHC class I but not class II presentation of the antigen is dependent on the membrane fusion activity of the virosomes, *Vaccine In press*.
- Busch, R., Doebele, R. C., Patil, N. S., Pashine, A., and Mellins, E. D. (2000). Accessory molecules for MHC class II peptide loading, *Curr Opin Immunol* 12, 99-106.
- Cambier, J. C. (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), *J Immunol* 155, 3281-5.
- Capel, P. J., van de Winkel, J. G., van den Herik-Oudijk, I. E., and Verbeek, J. S. (1994). Heterogeneity of human IgG Fc receptors, *Immunomethods* 4, 25-34.
- Carroll, M. C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity, *Annu Rev Immunol* 16, 545-68.
- Carroll, M. C., and Fischer, M. B. (1997). Complement and the immune response, *Curr Opin Immunol* 9, 64-9.
- Castellino, F., Boucher, P. E., Eichelberg, K., Mayhew, M., Rothman, J. E., Houghton, A. N., and Germain, R. N. (2000). Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways, *J Exp Med* 191, 1957-64.
- Caux, C., Massacrier, C., Dubois, B., Valladeau, J., Dezutter-Dambuyant, C., Durand, I., Schmitt, D., and Saeland, S. (1999). Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors, *J Leukoc Biol* 66, 781-91.

- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A., and Banchereau, J. (1997). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF α : II. Functional analysis, *Blood* *90*, 1458-70.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking, *J Exp Med* *180*, 1263-72.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C.-D., C, De Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yonead, K., Imamura, S., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1996). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF α , *J Exp Med* *184*, 695-706.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells, *Nature* *388*, 782-7.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent Th1 polarization, *Nat Immunol* *1*, 305-10.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999a). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon, *Nat Med* *5*, 919-23.
- Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., and Lanzavecchia, A. (1999b). Maturation, Activation, and Protection of Dendritic Cells Induced by Double-stranded RNA, *J Exp Med* *189*, 821-829.
- Chan, V. W., Kothakota, S., Rohan, M. C., Panganiban-Lustan, L., Gardner, J. P., Wachowicz, M. S., Winter, J. A., and Williams, L. T. (1999). Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells, *Blood* *93*, 3610-6.
- Chen, D., and Androlewicz, M. J. (2001). Heat shock protein 70 moderately enhances peptide binding and transport by the transporter associated with antigen processing, *Immunol Lett* *75*, 143-8.
- Cheng, P. C., Steele, C. R., Gu, L., Song, W., and Pierce, S. K. (1999). MHC class II antigen processing in B cells: accelerated intracellular targeting of antigens, *J Immunol* *162*, 7171-80.
- Citterio, S., Rescigno, M., Foti, M., Granucci, F., Aggujaro, D., Gasperi, C., Matyszak, M. K., Girolomoni, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). Dendritic cells as natural adjuvants, *Methods* *19*, 142-7.
- Clark, G. J., Angel, N., Kato, M., Lopez, J. A., MacDonald, K., Vuckovic, S., and Hart, D. N. (2000). The role of dendritic cells in the innate immune system, *Microbes Infect* *2*, 257-72.
- Clarke, S. R. (2000). The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity, *J Leukoc Biol* *67*, 607-14.
- Constant, S. L., and Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches, *Annu Rev Immunol* *15*, 297-322.
- Cox, A. L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R. A., Darrow, T. L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., and Slingluff, C. L., Jr. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines, *Science* *264*, 716-9.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., and Diedrich, G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex, *Immunol Rev* *172*, 21-8.
- Crowley, M., Inaba, K., Witmer-Pack, M., and Steinman, R. M. (1989). The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus, *Cell Immunol* *118*, 108-25.
- Crowley, M. T., Reilly, C. R., and Lo, D. (1999). Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen, *J Immunol* *163*, 4894-900.
- Cumberbatch, M., Dearman, R. J., and Kimber, I. (1997a). Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration, *Immunology* *92*, 388-95.

- Cumberbatch, M., Dearman, R. J., and Kimber, I. (1997b). Stimulation of Langerhans cell migration in mice by tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta, *Adv Exp Med Biol* 417, 121-4.
- Cumberbatch, M., and Kimber, I. (1990). Phenotypic characteristics of antigen-bearing cells in the draining lymph nodes of contact sensitized mice, *Immunology* 71, 404-10.
- Cyster, J. G. (1999). Chemokines and the Homing of Dendritic Cells to the T Cell Areas of Lymphoid Organs, *J Exp Med* 189, 447-450.
- d'Ostiani, C. F., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P., and Romani, L. (2000). Dendritic Cells Discriminate between Yeasts and Hyphae of the Fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of t helper cell immunity in vitro and in vivo, *J Exp Med* 191, 1661-1674.
- Dadaglio, G., Nelson, C. A., Deck, M. B., Petzold, S. J., and Unanue, E. R. (1997). Characterization and quantitation of peptide-MHC complexes produced from hen egg lysozyme using a monoclonal antibody, *Immunity* 6, 727-38.
- Daeron, M. (1997). Fc receptor biology, *Annu Rev Immunol* 15, 203-34.
- Daeron, M., Latour, S., Malbec, O., Espinosa, E., Pina, P., Pasmans, S., and Fridman, W. H. (1995). The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of FcγRIIB, regulates negatively BCR-, TCR- and FcR-dependent cell activation, *Immunity* 3, 635-646.
- Davoust, J., and Banchereau, J. (2000). Naked antigen-presenting molecules on dendritic cells, *Nat Cell Biol* 2, E46-E48.
- De Bruijn, M., Nieland, J., Harding, C., and Melief, C. (1992). Processing and presentation of intact hen egg-white lysozyme by dendritic cells, *Eur J Immunol* 22, 2347-2352.
- de la Salle, H., Galon, J., Bausinger, H., Spehner, D., Bohbot, A., Cohen, J., Cazenave, J. P., Fridman, W. H., Sautes, C., and Hanau, D. (1997). Soluble CD16/Fc gamma RIII induces maturation of dendritic cells and production of several cytokines including IL-12, *Adv Exp Med Biol* 417, 345-52.
- De Smedt, T., Butz, E., Smith, J., Maldonado-Lopez, R., Pajak, B., Moser, M., and Maliszewski, C. (2001). CD8α(-) and CD8α(+) subclasses of dendritic cells undergo phenotypic and functional maturation in vitro and in vivo, *J Leukoc Biol* 69, 951-8.
- De Smedt, T., Pajak, B., Klaus, G. G., Noelle, R. J., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1998). Antigen-specific T lymphocytes regulate lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo, *J Immunol* 161, 4476-9.
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo, *J Exp Med* 184, 1413-24.
- De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1997). Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function, *Eur J Immunol* 27, 1229-35.
- Dempsey, P. W., Allison, M. E., Akkaraju, S., Goodnow, C. C., and Fearon, D. T. (1996). C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity, *Science* 271, 348-50.
- den Haan, J. M., Lehar, S. M., and Bevan, M. J. (2000). CD8(+) but Not CD8(-) Dendritic Cells Cross-prime Cytotoxic T Cells In Vivo, *J Exp Med* 192, 1685-1696.
- Deo, Y. M., Graziano, R. F., Repp, R., and van de Winkel, J. G. (1997). Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies, *Immunol Today* 18, 127-35.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells, *J Exp Med* 193, 233-8.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites, *J Exp Med* 188, 373-86.

- Dieu-Nosjean, M. C., Vicari, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1999). Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines, *J Leukoc Biol* 66, 252-62.
- Ding, L., Linsley, P. S., Huang, L. Y., Germain, R. N., and Shevach, E. M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression, *J Immunol* 151, 1224-34.
- Dubois, B., Bridon, J. M., Fayette, J., Barthelemy, C., Banchereau, J., Caux, C., and Briere, F. (1999). Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation, *J Leukoc Biol* 66, 224-30.
- Dubois, B., Vanbervliet, B., Fayette, J., Massacrier, C., Van Kooten, C., Briere, F., Banchereau, J., and Caux, C. (1997). Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes, *J Exp Med* 185, 941-51.
- Dufresne, I., Desormeaux, A., Bestman-Smith, J., Gourde, P., Tremblay, M. J., and Bergeron, M. G. (1999). Targeting lymph nodes with liposomes bearing anti-HLA-DR Fab' fragments, *Biochim Biophys Acta* 1421, 284-94.
- El Mir, S., and Triebel, F. (2000). A soluble lymphocyte activation gene-3 molecule used as a vaccine adjuvant elicits greater humoral and cellular immune responses to both particulate and soluble antigens, *J Immunol* 164, 5583-9.
- Enk, A. H., Saloga, J., Becker, D., M, B. P. m., and Knop, J. (1994). Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo, *J Exp Med* 179, 1397-402.
- Espósito-Farese, M. E., Sautes, C., de la Salle, H., Latour, S., Bieber, T., de la Salle, C., Ohlmann, P., Fridman, W. H., Cazenave, J. P., Teillaud, J. L., and et al. (1995). Membrane and soluble Fc gamma RII/III modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens, *J Immunol* 155, 1725-36.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J Immunol* 148, 2207-16.
- Fanger, N. A., Voigtlaender, D., Liu, C., Swink, S., Wardwell, K., Fisher, J., Graziano, R. F., Pfefferkorn, L. C., and Guyre, P. M. (1997). Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells, *J Immunol* 158, 3090-8.
- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., and Guyre, P. M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells, *J Immunol* 157, 541-548.
- Faustman, D. L., Steinman, R. M., Gebel, H. M., Hauptfeld, V., Davie, J. M., and Lacy, P. E. (1984). Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3864-8.
- Fayette, J., Dubois, B., Vandenabeele, S., Bridon, J. M., Vanbervliet, B., Durand, I., Banchereau, J., Caux, C., and Briere, F. (1997). Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2, *J Exp Med* 185, 1909-18.
- Fayolle, C., Abdel-Motal, U. M., Berg, L., Deriaud, E., Jondal, M., and Leclerc, C. (1996a). Induction of cytotoxic T-cell response by optimal-length peptides does not require CD4+ T-cell help, *Immunology* 89, 41-5.
- Fayolle, C., Osickova, A., Osicka, R., Henry, T., Rojas, M. J., Saron, M. F., Sebo, P., and Leclerc, C. (2001). Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective antiviral immunity, *J Virol* 75, 7330-8.
- Fayolle, C., Sebo, P., Ladant, D., Ullmann, A., and Leclerc, C. (1996b). In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8+ T cell epitopes, *J Immunol* 156, 4697-706.
- Ferlazzo, G., Semino, C., Spaggiari, G. M., Meta, M., Mingari, M. C., and Melioli, G. (2000). Dendritic cells efficiently cross-prime HLA class I-restricted cytolytic T lymphocytes when pulsed

- with both apoptotic and necrotic cells but not with soluble cell-derived lysates, *Int Immunol* *12*, 1741-1747.
- Forquet, F., Barois, N., Machy, P., Trucy, J., Zimmermann, V. S., Leserman, L., and Davoust, J. (1999). Presentation of antigens internalized through the B cell receptor requires newly synthesized MHC class II molecules, *J Immunol* *162*, 3408-16.
- Foti, M., Granucci, F., Aggujaro, D., Liboi, E., Luini, W., Minardi, S., Mantovani, A., Sozzani, S., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site, *Int Immunol* *11*, 979-86.
- Fulcher, D. A., Lyons, A. B., Korn, S. L., Cook, M. C., Koleda, C., Parish, C., Fazekas de St. Groth, B., and Basten, A. (1996). The fate of self-reactive B cells depends primarily on the degree of antigen receptor engagement and availability of T cell help, *J Exp Med* *183*, 2313-28.
- Galibert, L., Maliszewski, C. R., and Vandenabeele, S. (2001). Plasmacytoid monocytes/T cells: a dendritic cell lineage?, *Semin Immunol* *13*, 283-9.
- Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells, *Nat Med* *5*, 1249-55.
- Galy, A., Morel, F., Hill, B., and Chen, B. P. (1998). Hematopoietic progenitor cells of lymphocytes and dendritic cells, *J Immunother* *21*, 132-41.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset, *Immunity* *3*, 459-73.
- Geissmann, F., Launay, P., Pasquier, B., Lepelletier, Y., Leborgne, M., Lehuen, A., Brousse, N., and Monteiro, R. C. (2001). A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes, *J Immunol* *166*, 346-52.
- Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J. P., Dy, M., Brousse, N., and Hermine, O. (1998). TGF-beta1, in the presence of GM-CSF and IL-4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells, *J Exp Med* *187*, 961-6.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages, *Cell* *79*, 143-56.
- Geuze, H. J. (1998). The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning, *Immunol Today* *19*, 282-7.
- Giolomoni, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Dendritic cells hold promise for immunotherapy, *Immunol Today* *18*, 102-4.
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K., *et al.* (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice, *Nature* *334*, 676-682.
- Gothelf, Y., Sharon, N., and Gazit, E. (1986). A subset of human cord blood mononuclear cells is similar to Langerhans cells of the skin: a study with peanut agglutinin and monoclonal antibodies, *Hum Immunol* *15*, 164-74.
- Grabbe, S., Beissert, S., Schwarz, T., and Granstein, R. (1995). Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy?, *Immunol Today* *16*, 117-121.
- Gregoriadis, G. (1990). Immunological adjuvants: a role for liposomes, *Immunol Today* *11*, 89-97.
- Gregoriadis, G. (1995). Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems, *Trends Biotechnol* *13*, 527-37.
- Gregoriadis, G., McCormack, B., Obrenovic, M., Saffie, R., Zadi, B., and Perrie, Y. (1999). Vaccine entrapment in liposomes, *Methods* *19*, 156-62.
- Gregory, C. D. (2000). CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system, *Curr Opin Immunol* *12*, 27-34.

- Gretz, J. E., Anderson, A. O., and Shaw, S. (1997). Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex, *Immunol Rev* *156*, 11-24.
- Gretz, J. E., Kaldjian, E. P., Anderson, A. O., and Shaw, S. (1996). Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node. The reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic, *J Immunol* *157*, 495-499.
- Gretz, J. E., Norbury, C. C., Anderson, A. O., Proudfoot, A. E., and Shaw, S. (2000). Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex, *J Exp Med* *192*, 1425-40.
- Grouard, G., Durand, I., Filgueira, L., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1996). Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres, *Nature* *384*, 364-7.
- Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand, *J Exp Med* *185*, 1101-11.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis, *Nature* *389*, 737-42.
- Guerder, S., and Matzinger, P. (1992). A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance, *J Exp Med* *176*, 553-64.
- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., and Nakano, H. (1999). Mice Lacking Expression of Secondary Lymphoid Organ Chemokine Have Defects in Lymphocyte Homing and Dendritic Cell Localization, *J Exp Med* *189*, 451-460.
- Guyre, C. A., Barreda, M. E., Swink, S. L., and Fanger, M. W. (2001). Colocalization of Fc gamma RI-targeted antigen with class I MHC: implications for antigen processing, *J Immunol* *166*, 2469-78.
- Guyre, P. M., Graziano, R. F., Goldstein, J., Wallace, P. K., Morganelli, P. M., Wardwell, K., and Howell, A. L. (1997). Increased potency of Fc-receptor-targeted antigens, *Cancer Immunol Immunother* *45*, 146-8.
- Haig, D. M., Hopkins, J., and Miller, H. R. (1999). Local immune responses in afferent and efferent lymph, *Immunology* *96*, 155-63.
- Hamano, Y., Arase, H., Saisho, H., and Saito, T. (2000). Immune complex and Fc receptor-mediated augmentation of antigen presentation for in vivo Th cell responses, *J Immunol* *164*, 6113-9.
- Harkiss, G. D., Hopkins, J., and McConnell, I. (1990). Uptake of antigen by afferent lymph dendritic cells mediated by antibody, *Eur J Immunol* *20*, 2367-73.
- Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response, *Blood* *90*, 3245-87.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo, *J Exp Med* *194*, 769-80.
- Hazenbos, W. L., Heijnen, I. A., Meyer, D., Hofhuis, F. M., Renardel de Lavalette, C. R., Schmidt, R. E., Capel, P. J., van de Winkel, J. G., Gessner, J. E., van den Berg, T. K., and Verbeek, J. S. (1998). Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16), *J Immunol* *161*, 3026-32.
- Heath, W. R., and Carbone, F. R. (1999). Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming, *Curr Opin Immunol* *11*, 314-8.
- Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity, *Annu Rev Immunol* *19*, 47-64.
- Heijnen, I. A., van Vugt, M. J., Fanger, N. A., Graziano, R. F., de Wit, T. P., Hofhuis, F. M., Guyre, P. M., Capel, P. J., Verbeek, J. S., and van de Winkel, J. G. (1996). Antigen targeting to myeloid-specific human Fc gamma RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice, *J Clin Invest* *97*, 331-338.

- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes, *J Immunol* *167*, 741-8.
- Hertz, C., Kiertcher, S., Godowski, P., Bouis, D., Norgard, M., Roth, M., and Modlin, R. (2001). Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll- like receptor 2, *J Immunol* *166*, 2444-50.
- Ho, W. Y., Cooke, M. P., Goodnow, C. C., and Davis, M. M. (1994). Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells, *J Exp Med* *179*, 1539-49.
- Hochrein, H., O'Keeffe, M., Luft, T., Vandenabeele, S., Grumont, R. J., Maraskovsky, E., and Shortman, K. (2000). Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells, *J Exp Med* *192*, 823-33.
- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., and O'Keeffe, M. (2001). Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets, *J Immunol* *166*, 5448-55.
- Hodgkin, P. D., Lee, J. H., and Lyons, A. B. (1996). B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number, *J Exp Med* *184*, 277-81.
- Hoefsmit, E. C., Duijvestijn, A. M., and Kamperdijk, E. W. (1982). Relation between langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells, *Immunobiology* *161*, 255-65.
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection, *Cell* *76*, 17-27.
- Hornig, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway, *Nat Immunol* *2*, 835-41.
- Howard, C. J., and Hope, J. C. (2000). Dendritic cells, implications on function from studies of the afferent lymph veiled cell, *Vet Immunol Immunopathol* *77*, 1-13.
- Howard, C. J., Sopp, P., Brownlie, J., Kwong, L. S., Parsons, K. R., and Taylor, G. (1997). Identification of two distinct populations of dendritic cells in afferent lymph that vary in their ability to stimulate T cells, *J Immunol* *159*, 5372-82.
- Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. (2000a). A Discrete Subpopulation of Dendritic Cells Transports Apoptotic Intestinal Epithelial Cells to T Cell Areas of Mesenteric Lymph Nodes, *J Exp Med* *191*, 435-444.
- Huang, Q., Richmond, J. F., Suzue, K., Eisen, H. N., and Young, R. A. (2000b). In vivo cytotoxic T lymphocyte elicitation by mycobacterial heat shock protein 70 fusion proteins maps to a discrete domain and is CD4(+) T cell independent, *J Exp Med* *191*, 403-8.
- Huby, R. D., Dearman, R. J., and Kimber, I. (1999). Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts, *J Biol Chem* *274*, 22591-6.
- Ignatius, R., Mahnke, K., Rivera, M., Hong, K., Isdell, F., Steinman, R. M., Pope, M., and Stamatatos, L. (2000). Presentation of proteins encapsulated in sterically stabilized liposomes by dendritic cells initiates CD8(+) T-cell responses in vivo, *Blood* *96*, 3505-3513.
- Inaba, K., Inaba, M., Romano, N., Aya, H., Deguchi, M., Lkehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. (1992a). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony stimulating factor, *J Exp Med* *176*, 1693-1702.
- Inaba, K., Metlay, J. P., Crowley, M. T., and Steinman, R. M. (1990). Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen- specific, MHC-restricted T cells in situ [published erratum appears in *J Exp Med* 1990 Oct 1;172(4):1275], *J Exp Med* *172*, 631-40.
- Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F., and Steinman, R. M. (1997). High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes, *J Exp Med* *186*, 665-72.

- Inaba, K., Steinman, R. M., Pack, M. W., Aya, H., Inaba, M., Sudo, T., Wolpe, S., and Schuler, G. (1992b). Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood, *J Exp Med* *175*, 1157-67.
- Inaba, K., Swiggard, W. J., Inaba, M., Meltzer, J., Mirza, A., Sasagawa, T., Nussenzweig, M. C., and Steinman, R. M. (1995). Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes, *Cell Immunol* *163*, 148-56.
- Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, C., Germain, R. N., Mellman, I., and Steinman, R. M. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli, *J Exp Med* *191*, 927-36.
- Inaba, K., Young, J. W., and Steinman, R. M. (1987). Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells, *J Exp Med* *166*, 182-94.
- Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., *et al.* (1999). A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells, *J Immunol* *163*, 1409-19.
- Iwasaki, A., and Kelsall, B. L. (2000). Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine, *J Exp Med* *191*, 1381-94.
- Izon, D., Rudd, K., DeMuth, W., Pear, W. S., Clendenin, C., Lindsley, R. C., and Allman, D. (2001). A common pathway for dendritic cell and early B cell development, *J Immunol* *167*, 1387-92.
- Janeway, C. A., Jr. (2001). Inaugural Article: How the immune system works to protect the host from infection: A personal view, *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7461-8.
- Jeannin, P., Renno, T., Goetsch, L., Miconnet, I., Aubry, J. P., Delneste, Y., Herbault, N., Baussant, T., Magistrelli, G., Soulas, C., *et al.* (2000). OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway, *Nat Immunol* *1*, 502-9.
- Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Itano, A., and Pape, K. A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells, *Annu Rev Immunol* *19*, 23-45.
- Jiang, W., Swiggart, W., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R., and Nussenzweig, M. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing, *Nature* *375*, 151-155.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells, *J Exp Med* *192*, 1213-22.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K., and Enk, A. H. (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells, *Trends Immunol* *22*, 394-400.
- Josien, B. R., Li, H. L., Ingulli, E., Sarma, S., B, R. W., Vologodskaia, M., Steinman, R. M., and Choi, Y. (2000). TRANCE, a Tumor Necrosis Factor Family Member, Enhances the Longevity and Adjuvant Properties of Dendritic Cells In Vivo, *J Exp Med* *191*, 495-502.
- Josien, R., Wong, B. R., Li, H. L., Steinman, R. M., and Choi, Y. (1999). TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells, *J Immunol* *162*, 2562-8.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J. Y., and Liu, Y. J. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity, *J Exp Med* *192*, 219-26.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A., Bazan, F., and Liu, Y. J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens, *J Exp Med* *194*, 863-70.
- Kaisho, T., and Akira, S. (2001). Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice, *Trends Immunol* *22*, 78-83.

- Kalinski, P., Hilkens, C. M. U., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal, *Immunol Today* 20, 561-567.
- Kamath, A. T., Pooley, J., O'Keeffe, M. A., Vremec, D., Zhan, Y., Lew, A. M., D'Amico, A., Wu, L., Tough, D. F., and Shortman, K. (2000). The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations, *J Immunol* 165, 6762-70.
- Karttunen, J. T., Trowsdale, J., and Lehner, P. J. (1999). TAP dances with ATP, *Curr Biol* 9, R820-4.
- Kashihara, M., Ueda, M., Horiguchi, Y., Furukawa, F., Hanaoka, M., and Imamura, S. (1986). A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells, *J Invest Dermatol* 87, 602-7.
- Kato, M., Neil, T. K., Clark, G. J., Morris, C. M., Sorg, R. V., and Hart, D. N. J. (1998). cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells, *Immunogenetics* 47, 442-50.
- Kelleher, P., Maroof, A., and Knight, S. C. (1999). Retrovirally induced switch from production of IL-12 to IL-4 in dendritic cells, *Eur J Immunol* 29, 2309-18.
- Kelsall, B. L., and Strober, W. (1996). Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch, *J Exp Med* 183, 237-47.
- Knight, S. C., Krejci, J., Malkovsky, M., Colizzi, V., Gautam, A., and Asherson, G. L. (1985). The role of dendritic cells in the initiation of immune responses to contact sensitizers. I. In vivo exposure to antigen, *Cell Immunol* 94, 427-34.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kämpgen, E., Romani, N., and Schuler, G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10, *J Exp Med* 184, 741-746.
- Kohrgruber, N., Halanek, N., Groger, M., Winter, D., Rappersberger, K., Schmitt-Egenolf, M., Stingl, G., and Maurer, D. (1999). Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines, *J Immunol* 163, 3250-9.
- Kopp, E. B., and Medzhitov, R. (1999). The Toll-receptor family and control of innate immunity, *Curr Opin Immunol* 11, 13-8.
- Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., and Rock, K. L. (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4942-6.
- Kraal, G., Breel, M., Janse, M., and Bruin, G. (1986). Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody, *J Exp Med* 163, 981-97.
- Kripke, M. L., Munn, C. G., Jeevan, A., Tang, J. M., and Bucana, C. (1990). Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization, *J Immunol* 145, 2833-8.
- Krishnan, L., Sad, S., Patel, G. B., and Sprott, G. D. (2000). Archaeosomes Induce Long-Term CD8(+) Cytotoxic T Cell Response to Entrapped Soluble Protein by the Exogenous Cytosolic Pathway, in the Absence of CD4(+) T Cell Help, *J Immunol* 165, 5177-5185.
- Kronin, V., Winkel, K., Suss, G., Kelso, A., Heath, W., Kirberg, J., von Boehmer, H., and Shortman, K. (1996). A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production, *J Immunol* 157, 3819-27.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G. (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, 3026-37.
- Kurts, C., Heath, W. R., Kosaka, H., Miller, J. F., and Carbone, F. R. (1998). The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross- presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo- 1), *J Exp Med* 188, 415-20.
- Lang, P., Stolpa, J. C., Freiberg, B. A., Crawford, F., Kappler, J., Kupfer, A., and Cambier, J. C. (2001). TCR-induced transmembrane signaling by peptide/MHC class II via associated Ig-alpha/beta dimers, *Science* 291, 1537-40.

- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells, *Nat Immunol* *1*, 311-6.
- Lanzavecchia, A. (1998). Immunology. Licence to kill, *Nature* *393*, 413-4.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2001a). Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination, *Nat Immunol* *2*, 487-92.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2001b). The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics, *Curr Opin Immunol* *13*, 291-8.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2001c). Regulation of T cell immunity by dendritic cells, *Cell* *106*, 263-6.
- Larsen, C. P., Morris, P. J., and Austyn, J. M. (1990). Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection, *J Exp Med* *171*, 307-14.
- Latek, R. R., and Unanue, E. R. (1999). Mechanisms and consequences of peptide selection by the I-Ak class II molecule, *Immunol Rev* *172*, 209-28.
- Lee, K. D., Oh, Y. K., Portnoy, D. A., and Swanson, J. A. (1996). Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*, *J Biol Chem* *271*, 7249-52.
- Leenen, P. J., Radosevic, K., Voerman, J. S., Salomon, B., van Rooijen, N., Klatzmann, D., and van Ewijk, W. (1998). Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover, *J Immunol* *160*, 2166-73.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 14614-9.
- Li, M., Davey, G. M., Sutherland, R. M., Kurts, C., Lew, A. M., Hirst, C., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2001). Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo, *J Immunol* *166*, 6099-103.
- Lieberam, I., and Forster, I. (1999). The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells, *Eur J Immunol* *29*, 2684-94.
- Liu, L., Zhang, M., Jenkins, C., and MacPherson, G. G. (1998). Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression, *J Immunol* *161*, 1146-55.
- Liu, Y. J., Kadowaki, N., Risoan, M. C., and Soumelis, V. (2000). T cell activation and polarization by DC1 and DC2, *Curr Top Microbiol Immunol* *251*, 149-59.
- Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V., and Gilliet, M. (2001). Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation, *Nat Immunol* *2*, 585-9.
- Lu, L., Hsieh, M., Oriss, T. B., Morel, P. A., Starzl, T. E., Rao, A. S., and Thomson, A. W. (1995). Generation of DC from mouse spleen cell cultures in response to GM-CSF: immunophenotypic and functional analyses, *Immunology* *84*, 127-34.
- Lu, Z., Yuan, L., Zhou, X., Sotomayor, E., Levitsky, H. I., and Pardoll, D. M. (2000). CD40-independent Pathways of T Cell Help for Priming of CD8(+) Cytotoxic T Lymphocytes, *J Exp Med* *191*, 541-550.
- Lucas, K., Vremec, D., Wu, L., and Shortman, K. (1998). A linkage between dendritic cell and T-cell development in the mouse thymus: the capacity of sequential T-cell precursors to form dendritic cells in culture, *Dev Comp Immunol* *22*, 339-49.
- Ludewig, B., Barchiesi, F., Pericin, M., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H., and Schwendener, R. A. (2000). In vivo antigen loading and activation of dendritic cells via a liposomal peptide vaccine mediates protective antiviral and anti-tumour immunity, *Vaccine* *19*, 23-32.
- Ludewig, B., Graf, D., Gelderblom, H. R., Becker, Y., Kroczeck, R. A., and Pauli, G. (1995). Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin- 10, *Eur J Immunol* *25*, 1943-50.

- Luft, T., Pang, K. C., Thomas, E., Hertzog, P., Hart, D. N., Trapani, J., and Cebon, J. (1998). Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells, *J Immunol* *161*, 1947-53.
- Lutz, M. B., Rovere, P., Kleijmeer, M. J., Rescigno, M., Assmann, C. U., Oorschot, V. M., Geuze, H. J., Trucy, J., Demandolx, D., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Intracellular routes and selective retention of antigens in mildly acidic cathepsin D/lysosome-associated membrane protein-1/MHC class II- positive vesicles in immature dendritic cells, *J Immunol* *159*, 3707-16.
- Lyons, A. B., and Parish, C. R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry, *J Immunol Methods* *171*, 131-7.
- Macagno, A., Gilliet, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Nestle, F. O., and Groettrup, M. (1999). Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation, *Eur J Immunol* *29*, 4037-42.
- MacAry, P. A., Lindsay, M., Scott, M. A., Craig, J. I., Luzio, J. P., and Lehner, P. J. (2001). Mobilization of MHC class I molecules from late endosomes to the cell surface following activation of CD34-derived human Langerhans cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 3982-7.
- Macatonia, S. E., Knight, S. C., Edwards, A. J., Griffiths, S., and Fryer, P. (1987). Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies, *J Exp Med* *166*, 1654-67.
- Machy, P., Serre, K., Baillet, M., and Leserman, L. (2002). Induction of MHC class I presentation of exogenous antigen by dendritic cells is controlled by CD4+ T cells engaging class II molecules in cholesterol-rich domains, *J Immunol* *In press*.
- Machy, P., Serre, K., and Leserman, L. (2000). Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fcγ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells, *Eur J Immunol* *30*, 848-57.
- MacPherson, G., Kushnir, N., and Wykes, M. (1999). Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis, *Immunol Rev* *172*, 325-34.
- MacPherson, G. G. (1989). Properties of lymph-borne (veiled) dendritic cells in culture. I. Modulation of phenotype, survival and function: partial dependence on GM-CSF, *Immunology* *68*, 102-7.
- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S. L., Nussenzweig, M., and Steinman, R. M. (2000). The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, DEC-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation via Major Histocompatibility Complex Class II-positive Lysosomal Compartments, *J Cell Biol* *151*, 673-684.
- Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. (1999a). CD8α⁺ and CD8α⁻ Subclasses of Dendritic Cells Direct the Development of Distinct T Helper Cells In Vivo, *J Exp Med* *189*, 587-592.
- Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., Maliszewski, C. R., and Moser, M. (1999b). Role of CD8α⁺ and CD8α⁻ dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo, *J Leukoc Biol* *66*, 242-6.
- Maldonado-Lopez, R., and Moser, M. (2001). Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses, *Semin Immunol* *13*, 275-82.
- Mandelboim, O., Berke, G., Fridkin, M., Feldman, M., Eisenstein, M., and Eisenbach, L. (1994). CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma [published erratum appears in *Nature* 1997 Dec 11;390(6660):643] [published erratum retracted in *Nature* 1998 Mar 19;392(6673):311], *Nature* *369*, 67-71.
- Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors, *Blood* *97*, 3333-41.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E. R., Lyman, S. D., Shortman, K., and McKenna, H. J. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified, *J Exp Med* *184*, 1953-62.

- Marquez, C., Trigueros, C., Franco, J. M., Ramiro, A. R., Carrasco, Y. R., Lopez-Botet, M., and Toribio, M. L. (1998). Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells, *Blood* *91*, 2760-71.
- Martin, P., del Hoyo, G. M., Anjuere, F., Ruiz, S. R., Arias, C. F., Marin, A. R., and Ardavin, C. (2000). Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors, *Blood* *96*, 2511-9.
- Marzo, A. L., Kinnear, B. F., Lake, R. A., Frelinger, J. J., Collins, E. J., Robinson, B. W., and Scott, B. (2000). Tumor-specific CD4(+) T cells have a major "Post-Licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity, *J Immunol* *165*, 6047-55.
- Mathur, A., Lynch, R. G., and Kohler, G. (1988). Expression, distribution and specificity of Fc receptors for IgM on murine B cells, *J Immunol* *141*, 1855-62.
- Matsuno, K., Ezaki, T., Kudo, S., and Uehara, Y. (1996). A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph, *J Exp Med* *183*, 1865-78.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family., *Annu Rev Immunol* *12*, 991-1045.
- Matzinger, P. (1998). An innate sense of danger, *Semin Immunol* *10*, 399-415.
- Maurer, D., Ebner, C., Reininger, B., Petzelbauer, P., Fiebiger, E., and Stingl, G. (1997). Mechanisms of Fc epsilon RI-IgE-facilitated allergen presentation by dendritic cells, *Adv Exp Med Biol* *417*, 175-8.
- Maurer, D., Fiebiger, E., Reininger, B., Ebner, C., Petzelbauer, P., Shi, G. P., Chapman, H. A., and Stingl, G. (1998). Fc epsilon receptor I on dendritic cells delivers IgE-bound multivalent antigens into a cathepsin S-dependent pathway of MHC class II presentation, *J Immunol* *161*, 2731-9.
- Maurer, D., Fiebiger, S., Ebner, C., Reininger, B., Fischer, G. F., Wichlas, S., Jouvin, M. H., Schmitt-Egenolf, M., Kraft, D., Kinet, J. P., and Stingl, G. (1996). Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation, *J Immunol* *157*, 607-16.
- Mayordomo, J. I., Zorina, T., Storkus, W. J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L. D., Melief, C. J., Ildstad, S. T., Kast, W. M., Deleo, A. B., and et al. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity, *Nat Med* *1*, 1297-302.
- Mayordomo, J. I., Zorina, T., Storkus, W. J., Zitvogel, L., Garcia-Prats, M. D., DeLeo, A. B., and Lotze, M. T. (1997). Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines, *Stem Cells* *15*, 94-103.
- McIlroy, D., Troadec, C., Grassi, F., Samri, A., Barrou, B., Autran, B., Debre, P., Feuillard, J., and Hosmalin, A. (2001). Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors, *Blood* *97*, 3470-7.
- Medema, J. P., Schuurhuis, D. H., Rea, D., van Tongeren, J., de Jong, J., Bres, S. A., Laban, S., Toes, R. E., Toebes, M., Schumacher, T. N., et al. (2001). Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells, *J Exp Med* *194*, 657-67.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* *388*, 394-7.
- Meister, M., Lemaître, B., and Hoffmann, J. A. (1997). Antimicrobial peptide defense in Drosophila, *Bioessays* *19*, 1019-26.
- Melcher, A., Todryk, S., Hardwick, N., Ford, M., Jacobson, M., and Vile, R. G. (1998). Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression, *Nat Med* *4*, 581-7.
- Mellman, I., and Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells. specialized and regulated antigen processing machines, *Cell* *106*, 255-8.

- Merad, M., Fong, L., Bogenberger, J., and Engleman, E. G. (2000). Differentiation of myeloid dendritic cells into CD8alpha-positive dendritic cells in vivo, *Blood* *96*, 1865-72.
- Metcalf, D., Shortman, K., Vremec, D., Mifsud, S., and Di Rago, L. (1996). Effects of excess GM-CSF levels on hematopoiesis and leukemia development in GM-CSF/max 41 double transgenic mice, *Leukemia* *10*, 713-9.
- Metlay, J. P., Witmer-Pack, M. D., Agger, R., Crowley, M. T., Lawless, D., and Steinman, R. M. (1990). The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies, *J Exp Med* *171*, 1753-71.
- Meyer, D., Schiller, C., Westermann, J., Izui, S., Hazenbos, W. L., Verbeek, J. S., Schmidt, R. E., and Gessner, J. E. (1998). FcgammaRIII (CD16)-deficient mice show IgG isotype-dependent protection to experimental autoimmune hemolytic anemia, *Blood* *92*, 3997-4002.
- Mi, L. Z., Wang, H. W., and Sui, S. F. (1997). Interaction of rabbit C-reactive protein with phospholipid monolayers studied by microfluorescence film balance with an externally applied electric field, *Biophys J* *73*, 446-51.
- Miga, A. J., Masters, S. R., Durell, B. G., Gonzalez, M., Jenkins, M. K., Maliszewski, C., Kikutani, H., Wade, W. F., and Noelle, R. J. (2001). Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154- CD40 interactions, *Eur J Immunol* *31*, 959-65.
- Milone, M. C., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (1998). The mannose receptor mediates induction of IFN-alpha in peripheral blood dendritic cells by enveloped RNA and DNA viruses, *J Immunol* *161*, 2391-9.
- Moghimi, S. M., and Hunter, A. C. (2001). Recognition by macrophages and liver cells of opsonized phospholipid vesicles and phospholipid headgroups, *Pharm Res* *18*, 1-8.
- Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A. M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M. A., Chauvin, J. P., Pierres, M., and He, H. T. (1998). Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains, *Embo J* *17*, 5334-48.
- Moser, M., and Murphy, K. M. (2000). Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development, *Nat Immunol* *1*, 199-205.
- Moser, M., Sornasse, T., De Smedt, T., Van Mechelen, M., Heynderickx, M., Flamand, V., De Becker, G., Thielemans, K., Urbain, J., and Leo, O. (1995). Dendritic cells can be used as physiological adjuvant in vivo, *Adv Exp Med Biol* *378*, 501-5.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J Immunol* *136*, 2348-57.
- Mourad, W., al-Daccak, R., Chatila, T., and Geha, R. S. (1993). Staphylococcal superantigens as inducers of signal transduction in MHC class II-positive cells, *Semin Immunol* *5*, 47-55.
- Murray, J. S. (1998). How the MHC selects Th1/Th2 immunity, *Immunol Today* *19*, 157-63.
- Muzio, M., Natoli, G., Sacconi, S., Levrero, M., and Mantovani, A. (1998). The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), *J Exp Med* *187*, 2097-101.
- Nakamura, T., Kubagawa, H., Ohno, T., and Cooper, M. D. (1993). Characterization of an IgM Fc-binding receptor on human T cells, *J Immunol* *151*, 6933-41.
- Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M. D. (2001). Cd11c(+)b220(+)gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells, *J Exp Med* *194*, 1171-8.
- Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells, *Nat Med* *4*, 328-32.
- Ngo, V. N., Lucy Tang, H., and Cyster, J. G. (1998). Epstein-Barr Virus-induced Molecule 1 Ligand Chemokine Is Expressed by Dendritic Cells in Lymphoid Tissues and Strongly Attracts Naive T Cells and Activated B Cells, *J Exp Med* *188*, 181-91.

- Niedermann, G., Geier, E., Lucchiari-Hartz, M., Hitziger, N., Ramsperger, A., and Eichmann, K. (1999). The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens, *Immunol Rev* 172, 29-48.
- Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G., and Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells, *Eur J Immunol* 27, 280-8.
- Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Fay, J., and Palucka, K. (2000). Dendritic cell based tumor vaccines, *Immunol Lett* 74, 5-10.
- O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W. J., Betjes, M., Bhardwaj, N., and Steinman, R. M. (1994). Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature, *Immunology* 82, 487-93.
- O'Doherty, U., Steinman, R. M., Peng, M., Cameron, P. U., Gezelter, S., Kopeloff, I., Swiggard, W. J., Pope, M., and Bhardwaj, N. (1993). Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium, *J Exp Med* 178, 1067-76.
- Oehler, L., Majdic, O., Pickl, W. F., Stockl, J., Riedl, E., Drach, J., Rappersberger, K., Geissler, K., and Knapp, W. (1998). Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics, *J Exp Med* 187, 1019-28.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex, *J Immunol* 164, 558-61.
- Ohashi, P. S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C. T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice, *Cell* 65, 305-17.
- Okada, H., Tahara, H., Shurin, M. R., Attanucci, J., Giezeman-Smits, K. M., Fellows, W. K., Lotze, M. T., Chambers, W. H., and Bozick, M. E. (1998). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a tumor-specific peptide elicit effective anti-tumor immunity against intracranial neoplasms, *Int J Cancer* 78, 196-201.
- Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P. A., Carballido, J., Picker, L. J., and Lund-Johansen, F. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12551-6.
- Oussoren, C., and Storm, G. (1997). Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection: III. Influence of surface modification with poly(ethyleneglycol), *Pharm Res* 14, 1479-84.
- Oussoren, C., Velinova, M., Scherphof, G., van der Want, J. J., van Rooijen, N., and Storm, G. (1998). Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection . IV. Fate of liposomes in regional lymph nodes, *Biochim Biophys Acta* 1370, 259-72.
- Oussoren, C., Zuidema, J., Crommelin, D. J., and Storm, G. (1997). Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose, *Biochim Biophys Acta* 1328, 261-72.
- Palliser, D. (2001). Unraveling the mechanisms by which heat shock proteins activate the immune system, *Curr Opin Mol Ther* 3, 25-30.
- Palucka, K., and Banchereau, J. (1999a). Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity, *J Clin Immunol* 19, 12-25.
- Palucka, K., and Banchereau, J. (1999b). Linking innate and adaptive immunity, *Nat Med* 5, 868-70.
- Palucka, K. A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., and Gluckman, J. C. (1999). Lipopolysaccharide can block the potential of monocytes to differentiate into dendritic cells, *J Leukoc Biol* 65, 232-40.
- Pamer, E., and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing, *Annu Rev Immunol* 16, 323-58.
- Pardoll, D. M., and Topalian, S. L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity, *Curr Opin Immunol* 10, 588-94.

- Patel, H. M. (1992). Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 9, 39-90.
- Pearson, A. M. (1996). Scavenger receptors in innate immunity, *Curr Opin Immunol* 8, 20-8.
- Pierre, P., and Mellman, I. (1998). Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells, *Cell* 93, 1135-45.
- Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., and Mellman, I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells, *Nature* 388, 787-92.
- Poggi, A., Rubartelli, A., Moretta, L., and Zocchi, M. R. (1997). Expression and function of NKRP1A molecule on human monocytes and dendritic cells, *Eur J Immunol* 27, 2965-70.
- Pooley, J. L., Heath, W. R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8(-) dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8(+) dendritic cells, *J Immunol* 166, 5327-30.
- Porgador, A., Yewdell, J. W., Deng, Y., Bennink, J. R., and Germain, R. N. (1997). Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide- MHC class I complexes using a monoclonal antibody, *Immunity* 6, 715-26.
- Preckel, T., Fung-Leung, W. P., Cai, Z., Vitiello, A., Salter-Cid, L., Winqvist, O., Wolfe, T. G., Von Herrath, M., Angulo, A., Ghazal, P., *et al.* (1999). Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28^{-/-} mice, *Science* 286, 2162-5.
- Pricop, L., Rabinowich, H., Morel, P. A., Sulica, A., Whiteside, T. L., and Herberman, R. B. (1993). Characterization of the Fc mu receptor on human natural killer cells. Interaction with its physiologic ligand, human normal IgM, specificity of binding, and functional effects, *J Immunol* 151, 3018-29.
- Prigent, P., El Mir, S., Dreano, M., and Triebel, F. (1999). Lymphocyte activation gene-3 induces tumor regression and antitumor immune responses, *Eur J Immunol* 29, 3867-76.
- Prigozy, T. I., Sieling, P. A., Clemens, D., Stewart, P. L., Behar, S. M., Porcelli, S. A., Brenner, M. B., Modlin, R. L., and Kronenberg, M. (1997). The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules, *Immunity* 6, 187-97.
- Pulendran, B., Kumar, P., Cutler, C. W., Mohamadzadeh, M., Van Dyke, T., and Banchereau, J. (2001a). Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo, *J Immunol* 167, 5067-76.
- Pulendran, B., Lingappa, J., Kennedy, M. K., Smith, J., Teepe, M., Rudensky, A., Maliszewski, C. R., and Maraskovsky, E. (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand- treated mice, *J Immunol* 159, 2222-31.
- Pulendran, B., Palucka, K., and Banchereau, J. (2001b). Sensing pathogens and tuning immune responses, *Science* 293, 253-6.
- Pulendran, B., Smith, J. L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C. R. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1036-1041.
- Qin, Z., Noffz, G., Mohaupt, M., and Blankenstein, T. (1997). Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells, *J Immunol* 159, 770-6.
- Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M., and Muller, W. A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking, *Science* 282, 480-3.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., and Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *J Exp Med* 183, 1161-72.
- Ravetch, J. V. (1997). Fc receptors, *Curr Opin Immunol* 9, 121-5.
- Ravetch, J. V., and Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors, *Annu Rev Immunol* 19, 275-90.

- Re, F., and Strominger, J. L. (2001). Toll-like receptor 2 (tlr2) and tlr4 differentially activate human dendritic cells, *J Biol Chem* 276, 37692-9.
- Reddy, R., Zhou, F., Nair, S., Huang, L., and Rouse, B. T. (1992). In vivo cytotoxic T lymphocyte induction with soluble proteins administered in liposomes, *J Immunol* 148, 1585-9.
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., They, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fcγ Receptor-mediated Induction of Dendritic Cell Maturation and Major Histocompatibility Complex Class I-restricted Antigen Presentation after Immune Complex Internalization, *J Exp Med* 189, 371-380.
- Reid, S. D., Penna, G., and Adorini, L. (2000). The control of T cell responses by dendritic cell subsets, *Curr Opin Immunol* 12, 114-21.
- Reimann, J., and Schirmbeck, R. (1999). Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation, *Immunol Rev* 172, 131-52.
- Reis e Sousa, C., and Germain, R. N. (1999). Analysis of adjuvant function by direct visualization of antigen presentation in vivo: endotoxin promotes accumulation of antigen-bearing dendritic cells in the T cell areas of lymphoid tissue, *J Immunol* 162, 6552-61.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas, *J Exp Med* 186, 1819-29.
- Reis e Sousa, C., Stahl, P. D., and Austyn, J. M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro, *J Exp Med* 178, 509-19.
- Reis e Sousa, C., Yap, G., Schulz, O., Rogers, N., Schito, M., Aliberti, J., Hieny, S., and Sher, A. (1999). Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology, *Immunity* 11, 637-47.
- Res, P., Martinez-Caceres, E., Cristina Jaleco, A., Staal, F., Noteboom, E., Weijer, K., and Spits, H. (1996). CD34⁺CD38^{dim} cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells, *Blood* 87, 5196-206.
- Res, P. C., Couwenberg, F., Vyth-Dreese, F. A., and Spits, H. (1999). Expression of pTα mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus, *Blood* 94, 2647-57.
- Rescigno, M., Citterio, S., They, C., Rittig, M., Medaglini, D., Pozzi, G., Amigorena, S., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5229-34.
- Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Foti, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). Coordinated events during bacteria-induced DC maturation, *Immunol Today* 20, 200-3.
- Rescigno, M., Piguet, V., Valzasina, B., Lens, S., Zubler, R., French, L., Kindler, V., Tschopp, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2000). Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1β, and the production of interferon γ in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses, *J Exp Med* 192, 1661-8.
- Richards, R. L., Rao, M., Wassef, N. M., Glenn, G. M., Rothwell, S. W., and Alving, C. R. (1998). Liposomes containing lipid A serve as an adjuvant for induction of antibody and cytotoxic T-cell responses against RTS,S malaria antigen, *Infect Immun* 66, 2859-65.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell, *Nature* 393, 474-8.
- Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y. J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation, *Science* 283, 1183-6.
- Roake, J. A., Rao, A. S., Morris, P. J., Larsen, C. P., Hankins, D. F., and Austyn, J. M. (1995). Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1, *J Exp Med* 181, 2237-47.

- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells, *Nat Cell Biol* 1, 362-368.
- Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., and Schuler, G. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability, *J Immunol Methods* 196, 137-51.
- Romani, N., and Schuler, G. (1992). The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system, *Springer Semin Immunopathol* 13, 265-79.
- Roncarolo, M. G., Levings, M. K., and Traversari, C. (2001). Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells, *J Exp Med* 193, F5-9.
- Roth, C., Rochlitz, C., and Kourilsky, P. (1994). Immune response against tumors, *Adv Immunol* 57, 281-351.
- Rubartelli, A., Poggi, A., and Zocchi, M. R. (1997). The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium, *Eur J Immunol* 27, 1893-900.
- Ruedl, C., and Bachmann, M. F. (1999). CTL priming by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo, *Eur J Immunol* 29, 3762-7.
- Ruedl, C., Bachmann, M. F., and Kopf, M. (2000). The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand, *Eur J Immunol* 30, 2056-64.
- Ruedl, C., Kopf, M., and Bachmann, M. F. (1999). CD8(+) T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells in vivo, *J Exp Med* 189, 1875-84.
- Saeland, E., van Royen, A., Hendriksen, K., Vile-Weekhout, H., Rijkers, G. T., Sanders, L. A., and van de Winkel, J. G. (2001). Human C-reactive protein does not bind to Fc gamma RIIa on phagocytic cells, *J Clin Invest* 107, 641-3.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex Class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products, *J Exp Med* 182, 389-400.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α , *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1999). Mobilizing Dendritic Cells for Tolerance, Priming, and Chronic Inflammation, *J Exp Med* 189, 611-614.
- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function, *Eur J Immunol* 29, 1617-25.
- Salomon, B., Cohen, J. L., Masurier, C., and Klatzmann, D. (1998). Three populations of mouse lymph node dendritic cells with different origins and dynamics, *J Immunol* 160, 708-17.
- Salomon, B., Lores, P., Pioche, C., Racz, P., Jami, J., and Klatzmann, D. (1994). Conditional ablation of dendritic cells in transgenic mice, *J Immunol* 152, 537-48.
- Santambrogio, L., Sato, A. K., Carven, G. J., Belyanskaya, S. L., Strominger, J. L., and Stern, L. J. (1999). Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15056-61.
- Sato, M., Iwakabe, K., Kimura, S., and Nishimura, T. (1999). Functional skewing of bone marrow-derived dendritic cells by Th1- or Th2-inducing cytokines, *Immunol Lett* 67, 63-8.
- Saunders, D., Lucas, K., Ismaili, J., Wu, L., Maraskovsky, E., Dunn, A., and Shortman, K. (1996). Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, *J Exp Med* 184, 2185-96.

- Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., and Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells, *J Exp Med* *191*, 423-34.
- Schlecht, G., Leclerc, C., and Dadaglio, G. (2001). Induction of CTL and nonpolarized Th cell responses by CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells, *J Immunol* *167*, 4215-21.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions, *Nature* *393*, 480-3.
- Schuler, G., and Steinman, R. M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro, *J Exp Med* *161*, 526-46.
- Schuler, G., and Steinman, R. M. (1997). Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors, *J Exp Med* *186*, 1183-7.
- Schulz, O., Edwards, D. A., Schito, M., Aliberti, J., Manickasingham, S., Sher, A., and Reis e Sousa, C. (2000). CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal, *Immunity* *13*, 453-62.
- Semple, S. C., Chonn, A., and Cullis, P. R. (1998). Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo, *Adv Drug Deliv Rev* *32*, 3-17.
- Serre, K., Giraudo, L., Leserman, L., and Machy, P. (2002). Dendritic cells efficiently capture and present antigen encapsulated in liposomes, to CD4 and CD8 T cells, in vivo, Manuscript en préparation.
- Serre, K., Machy, P., Grivel, J. C., Jolly, G., Brun, N., Barbet, J., and Leserman, L. (1998). Efficient presentation of multivalent antigens targeted to various cell surface molecules of dendritic cells and surface Ig of antigen-specific B cells, *J Immunol* *161*, 6059-67.
- Shen, L., van Egmond, M., Siemasko, K., Gao, H., Wade, T., Lang, M. L., Clark, M., van De Winkel, J. G., and Wade, W. F. (2001). Presentation of ovalbumin internalized via the immunoglobulin-A Fc receptor is enhanced through Fc receptor gamma-chain signaling, *Blood* *97*, 205-13.
- Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., and Rock, K. L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules, *J Immunol* *158*, 2723-30.
- Shevach, E. M. (2000). Regulatory T cells in autoimmunity, *Annu Rev Immunol* *18*, 423-49.
- Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroyama, T., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., Endo, Y., Fujita, T., *et al.* (2000). Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes, *Nat Immunol* *1*, 441-6.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood, *Science* *284*, 1835-7.
- Singh-Jasuja, H., Scherer, H. U., Hilf, N., Arnold-Schild, D., Rammensee, H. G., Toes, R. E., and Schild, H. (2000). The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor, *Eur J Immunol* *30*, 2211-2215.
- Smith, A. L., and de St Groth, B. F. (1999). Antigen-pulsed CD8alpha+ Dendritic Cells Generate an Immune Response after Subcutaneous Injection without Homing to the Draining Lymph Node, *J Exp Med* *189*, 593-598.
- Solheim, J. C. (1999). Class I MHC molecules: assembly and antigen presentation, *Immunol Rev* *172*, 11-9.
- Sorg, R. V., G. K. g., and Wernet, P. (1999). Identification of Cord Blood Dendritic Cells as an Immature CD11c- Population, *Blood* *93*, 2302-2307.
- Sornasse, T., Flamand, V., De Becker, G., Bazin, H., Tielemans, F., Thielemans, K., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1992). Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo, *J Exp Med* *175*, 15-21.
- Sotzik, F., Rosenberg, Y., Boyd, A. W., Honeyman, M., Metcalf, D., Scollay, R., Wu, L., and Shortman, K. (1994). Assessment of CD4 expression by early T precursor cells and by dendritic cells in the human thymus, *J Immunol* *152*, 3370-7.

- Speidel, K., Osen, W., Faath, S., Hilgert, I., Obst, R., Braspenning, J., Momburg, F., Hammerling, G. J., and Rammensee, H. G. (1997). Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens in vivo: conditions, efficiency, and relation to antibody responses, *Eur J Immunol* 27, 2391-9.
- Spits, H., Blom, B., Jaleco, A. C., Weijer, K., Verschuren, M. C., van Dongen, J. J., Heemskerk, M. H., and Res, P. C. (1998). Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells, *Immunol Rev* 165, 75-86.
- Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K., and Uittenbogaart, C. H. (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, 1775-84.
- Stahl, P. D., and Ezekowitz, R. A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense, *Curr Opin Immunol* 10, 50-5.
- Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells, *Blood* 93, 1634-42.
- Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells, *J Immunol* 159, 4772-80.
- Steinman, R. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Ann Rev Immunol* 9, 271-296.
- Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution, *J Exp Med* 137, 1142-62.
- Steinman, R. M., Pack, M., and Inaba, K. (1997). Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs, *Immunol Rev* 156, 25-37.
- Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The Induction of Tolerance by Dendritic Cells That Have Captured Apoptotic Cells, *J Exp Med* 191, 411-416.
- Steinman, R. M., and Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5132-6.
- Summers, K. L., Hock, B. D., McKenzie, J. L., and Hart, D. N. (2001). Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils, *Am J Pathol* 159, 285-95.
- Suss, G., and Shortman, K. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis., *J Exp Med* 183, 1789-96.
- Suzue, K., Zhou, X., Eisen, H. N., and Young, R. A. (1997). Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13146-51.
- Swiggard, W. J., Mirza, A., Nussenzweig, M. C., and Steinman, R. M. (1995). DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence, *Cell Immunol* 165, 302-11.
- Szabolcs, P., Avigan, D., Gezelter, S., Ciocon, D. H., Moore, M. A., Steinman, R. M., and Young, J. W. (1996). Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate, *Blood* 87, 4520-30.
- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R., and Ravetch, J. V. (1994). FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects., *Cell* 76, 519-29.
- Tan, M. C., Mommaas, A. M., Drijfhout, J. W., Jordens, R., Onderwater, J. J., Verwoerd, D., Mulder, A. A., van der Heiden, A. N., Scheidegger, D., Oomen, L. C., *et al.* (1997). Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells, *Eur J Immunol* 27, 2426-35.
- Tanaka, K., and Kasahara, M. (1998). The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28, *Immunol Rev* 163, 161-76.

- Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R., and Udey, M. C. (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin, *Nature* *361*, 82-5.
- Tang, H. L., and Cyster, J. G. (1999). Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells, *Science* *284*, 819-22.
- Teh, Y. M., and Neuberger, M. S. (1997). The immunoglobulin (Ig)alpha and Igbeta cytoplasmic domains are independently sufficient to signal B cell maturation and activation in transgenic mice, *J Exp Med* *185*, 1753-8.
- Thery, C., and Amigorena, S. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells, *Curr Opin Immunol* *13*, 45-51.
- Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73, *J Cell Biol* *147*, 599-610.
- Thoma-Uszynski, S., Kiertcher, S. M., Ochoa, M. T., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Miyake, K., Godowski, P. J., Roth, M. D., and Modlin, R. L. (2000). Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10, *J Immunol* *165*, 3804-10.
- Thomas, R., Davis, L. S., and Lipsky, P. E. (1993). Isolation and characterization of human peripheral blood dendritic cells, *J Immunol* *150*, 821-34.
- Thomas, R., and Lipsky, P. (1994). Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells., *J Immunol* *153*, 4016-28.
- Thomson, A. W., and Lu, L. (1999). Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance?, *Immunol Today* *20*, 27-32.
- Timmerman, J. M., and Levy, R. (1999). Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy, *Annu Rev Med* *50*, 507-29.
- Toes, R. E., Ossendorp, F., Offringa, R., and Melief, C. J. (1999). CD4 T cells and their role in antitumor immune responses, *J Exp Med* *189*, 753-6.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G., and Weissman, I. L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor, *Science* *290*, 2152-4.
- Turley, S. J., Inaba, K., Garrett, W. S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R. M., and Mellman, I. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells, *Science* *288*, 522-7.
- Uebel, S., and Tampe, R. (1999). Specificity of the proteasome and the TAP transporter, *Curr Opin Immunol* *11*, 203-8.
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., and Liu, M. A. (1994). Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules, *Eur J Immunol* *24*, 1590-6.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, H., and Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells, *J Biol Chem* *276*, 31332-9.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules, *Immunity* *12*, 71-81.
- van Kooten, C., and Banchereau, J. (1997). Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells, *Curr Opin Immunol* *9*, 330-7.
- van Kooten, C., and Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand, *J Leukoc Biol* *67*, 2-17.
- van Wilsem, E. J., Breve, J., Kleijmeer, M., and Kraal, G. (1994). Antigen-bearing Langerhans cells in skin draining lymph nodes: phenotype and kinetics of migration, *J Invest Dermatol* *103*, 217-20.
- Verhasselt, V., Buelens, C., Willems, F., De Groote, D., Haeffner-Cavaillon, N., and Goldman, M. (1997). Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of

- costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway, *J Immunol* *158*, 2919-25.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lanzavecchia, A. (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains, *Science* *283*, 680-2.
- Vogel, L. A., and Noelle, R. J. (1998). CD40 and its crucial role as a member of the TNFR family, *Semin Immunol* *10*, 435-42.
- Vremec, D., Lieschke, G. J., Dunn, A. R., Robb, L., Metcalf, D., and Shortman, K. (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs, *Eur J Immunol* *27*, 40-4.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen, *J Immunol* *164*, 2978-86.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes, *J Immunol* *159*, 565-73.
- Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D. J., Ardavin, C. F., Wu, L., and Shortman, K. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells, *J Exp Med* *176*, 47-58.
- Wells, A. D., and Malkovsky, M. (2000). Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view, *Immunol Today* *21*, 129-32.
- Wernersson, S., Karlsson, M. C., Dahlstrom, J., Mattsson, R., Verbeek, J. S., and Heyman, B. (1999). IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gamma RII-deficient mice, *J Immunol* *163*, 618-22.
- Winkel, K., Sotzik, F., Vremec, D., Cameron, P. U., and Shortman, K. (1994). CD4 and CD8 expression by human and mouse thymic dendritic cells, *Immunol Lett* *40*, 93-9.
- Winterhalter, M., and Lasic, D. D. (1993). Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution, *Chem Phys Lipids* *64*, 35-43.
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures, *J Exp Med* *185*, 317-28.
- Witmer, M. D., and Steinman, R. M. (1984). The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cells: light-microscopic immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node, and Peyer's patch, *Am J Anat* *170*, 465-81.
- Witmer-Pack, M. D., Swiggard, W. J., Mirza, A., Inaba, K., and Steinman, R. M. (1995). Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues, *Cell Immunol* *163*, 157-62.
- Wu, L., Li, C. L., and Shortman, K. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny, *J Exp Med* *184*, 903-11.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B. (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation, *Immunity* *8*, 723-32.
- Yang, D., Chen, Q., Stoll, S., Chen, X., Howard, O. M., and Oppenheim, J. J. (2000). Differential Regulation of Responsiveness to fMLP and C5a Upon Dendritic Cell Maturation: Correlation with Receptor Expression, *J Immunol* *165*, 2694-2702.
- Yang, R. B., Mark, M. R., Gray, A., Huang, A., Xie, M. H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W. I., Gurney, A. L., and Godowski, P. J. (1998). Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling, *Nature* *395*, 284-8.
- Young, A. J. (1999). The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node in vivo, *Semin Immunol* *11*, 73-83.
- Zanetti, M. (1992). Antigenized antibodies, *Nature* *355*, 476-7.

- Zhang, Y., Zhang, Y. Y., Ogata, M., Chen, P., Harada, A., Hashimoto, S., and Matsushima, K. (1999). TGF-beta1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte/macrophage differentiation pathway, *Blood* *93*, 1208-20.
- Zhong, G., Reis e Sousa, C., and Germain, R. N. (1997). Production, specificity, and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide-major histocompatibility complex class II complexes formed by processing of exogenous protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13856-61.
- Zhou, F., Rouse, B. T., and Huang, L. (1992). Induction of cytotoxic T lymphocytes in vivo with protein antigen entrapped in membranous vehicles, *J Immunol* *149*, 1599-604.
- Zhou, L., and Tedder, T. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells., *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 2588-92.
- Zimmermann, V. S., Rovere, P., Trucy, J., Serre, K., Machy, P., Forquet, F., Leserman, L., and Davoust, J. (1999). Engagement of B cell receptor regulates the invariant chain-dependent MHC class II presentation pathway, *J Immunol* *162*, 2495-502.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes, *Nat Med* *4*, 594-600.