

Université de Nantes

Faculté de Médecine et Techniques Médicales

**Etude de la présentation croisée d'antigènes de tumeurs par cellules
dendritiques ayant phagocyté des cellules mortes**

Thèse de Doctorat

Ecole doctorale : Chimie-Biologie

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immuno-Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

Frédéric EBSTEIN

Le 23 mars 2005, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : Pascale JEANNIN, Professeur, Angers
Frédéric BERARD, MCU-PH, HDR, Lyon

Examineurs : Karin TARTE, MCU-PH, HDR, Rennes
Khaled MEFLAH, Professeur, Nantes

Directeur de Thèse : Marc GREGOIRE, Directeur de Recherche à l'INSERM, Nantes

Inserm Unité 601

Directeur : Marc BONNEVILLE

Sommaire

I. Introduction	1
I.1. Surveillance immunitaire et détection des tumeurs	1
I.1.1 Les phases de l'immunosurveillance	2
I.1.1.a. Phase d'élimination	3
I.1.1.b. Phase d'équilibre	5
I.1.1.c. Phase d'échappement	5
I.1.2. Mécanismes d'échappement des tumeurs au système immunitaire	5
I.1.2.a. Phénomène de tolérance	7
I.1.2.b. Influence des facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales	7
I.1.2.c. Défaut d'activation des lymphocytes T	8
I.1.2.d. Résistance à l'apoptose :	8
I.1.2.e. Lymphocytes T régulateurs	9
I.1.2.f. Localisation des tumeurs	10
I.2. Antigènes de tumeurs	10
I.2.1. Antigènes partagés	11
I.2.2. Antigènes de différenciation	12
I.2.3. Antigènes résultant de mutations	13
I.2.4. Antigènes de tumeurs sur-exprimés et antigènes ubiquitaires	14
I.2.5. Antigènes viraux	15
I.3. Immunothérapie anti-tumorale	15
I.3.1. Immunothérapie passive	15
I.3.1.a. Les lymphocytes	16
I.3.1.b. Les macrophages	16
I.3.1.c. Les anticorps	17
I.3.2. Immunothérapie active :	17
I.3.2.a. Injections d'antigènes de tumeurs :	18
I.3.2.b. Injections de cellules tumorales	19
I.3.2.c. Injection de cellules dendritiques exprimant des antigènes de tumeurs	23
I.4. Biologie des cellules dendritiques	26
I.4.1. Origine des DC et génération in vitro et in vivo	28
I.4.1.a. Génération de DC à partir des monocytes du sang	30
I.4.1.b. Génération de DC à partir des cellules souches hématopoïétiques CD34+	30
I.4.2. Capture des antigènes	31
I.4.3. Apprêtement et présentation croisée d'antigènes exogènes	33
I.4.5. Activation, maturation et migration des DC	35
I.4.6 Interactions des DC avec les lymphocytes T	38
I.5. Les cellules mortes en tant que sources d'antigènes de tumeurs	42
I.5.1. Cellules tumorales apoptotiques	43
I.5.2. Oncolysats cellulaires	47
I.5.4. Apoptose et HSP	49
II. Objectifs du travail de thèse	54
II.1. Analyse de l'immunogénicité des cellules tumorales apoptotiques in vivo	54
II.2. Analyse de l'immunogénicité des cellules tumorales apoptotiques in vitro dans un modèle humain de MPM	55
II.3. Recherche d'antigènes associés aux tumeurs dans le MPM	56
II.4. Analyse de la présentation croisée de l'antigène MUC1 à partir de DC ayant phagocyté des cellules mortes de MPM	56
II.5. Analyse de la présentation croisée des antigènes Melan-A/MART-1, gp-100 et NA17-A à partir de DC ayant phagocyté des cellules mortes de mélanome (Collaboration avec l'équipe du prof. F. Jotereau)	57

II.6. Analyse de l'activité immunosuppressive d'un composé de carboxamide (JM34) sur la maturation des DC (Collaboration avec l'équipe du prof. F. Lang).....	57
III. Résultats.....	58
III.1. Analyse de l'immunogénicité des cellules tumorales apoptotiques in vivo.....	58
III.2. Analyse de l'immunogénicité des cellules tumorales apoptotiques in vitro dans un modèle humain de MPM.....	70
III.3. Recherche d'antigènes associés aux tumeurs dans le MPM.....	82
Sequence.....	110
III.4. Analyse de la présentation croisée de l'antigène MUC1 à partir de DC ayant phagocyté des cellules mortes de MPM.....	112
III.4.1. Production de cellules tumorales apoptotiques/oncolysats cellulaires.....	112
III.4.2. Génération des DC.....	113
III.4.3. Phagocytose de corps apoptotiques/lysats cellulaires.....	113
III.4.4. Maturation expérimentale des DC.....	114
III.4.5. Sensibilisation des lymphocytes T CD8+ autologues.....	114
III.4.6. Conclusion.....	115
III.5. Analyse de la présentation croisée des antigènes Melan-A/MART-1, gp-100 et NA17-A à partir de DC ayant phagocyté des cellules mortes de mélanome (Collaboration avec l'équipe du prof. F. Jotereau).....	116
III.5.1. Sources d'antigènes de tumeurs.....	116
III.5.2. Génération des DC.....	116
III.5.3. Phagocytose de lysats cellulaires.....	117
III.5.4. Maturation expérimentale des DC.....	117
III.5.5. Sensibilisation des lymphocytes T CD8+ autologues.....	118
III.5.6. Conclusion.....	118
III.6. Analyse de l'activité immunosuppressive d'un composé de carboxamide (JM34) sur la maturation des DC (Collaboration avec l'équipe du prof. F. Lang).....	120
IV. Discussion-Perspectives.....	132
V. Références bibliographiques.....	141
<i>Etude de la présentation croisée d'antigènes de tumeurs par cellules dendritiques ayant phagocyté des cellules mortes.....</i>	175
Résumé.....	175
<i>Study of the cross-presentation of tumour antigens from dendritic cells loaded with dead cells..</i>	175
Abstract.....	175

Abbreviations :

Ac: Anticorps

ADCC : Antibody dependant cellular cytotoxicity

ADN : Acide désoxyribonucléique

APRIL : a proliferation-inducing ligand

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BAFF : B cell activating factor of the TNF family

BDCA : Blood DC antigen

CASP-8 : Caspase-8

CCR : CC chemokine receptor

CD : Cluster Differentiation

CDK : Cyclin-dependant kinase

CEA : Carcinoembryonic antigen

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CTL : Cytotoxic T cell

CTLA4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen 4

DC : Dendritic cell

ER : Endoplasmic reticulum

Fc : Fragment commun aux immunoglobulines

FLICE : Fas-associated death domain-like interleukin-1 β converting enzyme

FLT3L : fms-like tyrosine kinase 3 ligand

FOXP3 : Forkhead box P3

GM-CSF : Granulocyte macrophage-colony stimulating factor

GVDH : Graft versus host disease

HIV : Human immunodeficiency virus

HLA : Human leukocyte antigen

HPV : Human papillomavirus

HSP : Heat shock proteins

ICAM : Intercellular adhesion molecule

IDO : indoleamine 2,3 dioxygenase

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukin

IFN : Interferon
IP : Iodure de propidium
LC : Langerhans cells
Lef-1 : lymphoid enhancer factor-1
LOX-1 : Lectin-like receptor for oxidized-LDL
MØ : Macrophage
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MCM : Monocyte-conditioned medium
MIP : Macrophage inflammatory protein
NK : Natural killers
pDC : Plasmacytoid dendritic cell
PN : Polynucléaire neutrophil
PS : Phosphatidylsérine
RANK : Receptor activator of nuclear factor kappa B
SCF : Stem cell factor
SR : Scavenger receptor
TAP : Transporter associated with antigen processing
TCR : T cell receptor
TGF : Transforming growth factor
TIL : Tumour-infiltrating lymphocytes
TLR : Toll-like receptor
TNF : Tumour necrosis factor
TPO : Thromboerythropoïetine
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRANCE : Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine
TSP : Thrombospondine
VNR : Vitronectin receptor

Liste des figures

Figure 1 : Les 3 phases de l'immunosurveillance.

Figure 2 : Un modèle proposé de la phase d'élimination.

Figure 3 : Classification des antigènes tumoraux reconnus par les CTL.

Figure 4 : Modèle de stratégie d'immunothérapie active.

Figure 5 : Les différentes sous-populations de DC.

Figure 6 : Génération in vitro de différents types de DC.

Figure 7 : Les multiples voies de présentation croisée.

Figure 8 : Molécules impliquées dans la formation de la synapse immunologique.

Figure 9 : Voies donnant naissance aux DC tolérogènes.

Figure 10 : Diversité des interactions entre DC et cellules apoptotiques.

Figure 11 : Exemples de libération de signaux dangers par des cellules nécrotiques et cellules apoptotiques tardives.

Figure 12 : Analyse des activités DEVDase et LDH des préparations apoptotiques et d'oncolysat cellulaire.

Figure 13 : Analyse de la qualité de l'enrichissement des monocytes et lymphocytes T CD8+.

Figure 14 : Analyse de la phagocytose des préparations apoptotiques et nécrotiques par les DC immatures.

Figure 15 : Analyse de l'expression des marqueurs de maturation.

Figure 16 : Analyse de la sécrétion de TNF- α par lymphocytes T CD8+ sensibilisés en réponse aux deux peptides de MUC1.

Figure 17 : Analyse de la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8+ sensibilisés en réponse aux deux peptides de MUC1.

Figure 18 : Analyse de la mort cellulaire de la lignée M136 par 4 cycles rapides de congélation/décongélation.

Figure 19 : Analyse de la purification des monocytes par élutriation.

Figure 20 : Analyse de la phagocytose de l'oncolysat cellulaire M136 par les DC immatures au cours du temps.

Figure 21 : Analyse de l'expression des marqueurs de maturation par cytométrie en flux.

Figure 22 : Analyse de la fréquence des lymphocytes T spécifiques anti-Melan-A/MART-1, anti-NA17-A et anti-gp100 par double marquage CD8/tétramère au cours des stimulations.

Figure 23 : Phagocytose de corps apoptotiques et leurs conséquences éventuelles pour la réponse immunitaire.

Figure 24 : Modèle proposé de recrutement des antigènes exogènes dérivés de cellules apoptotiques enrichies en HSP.

Figure 25 : Modèle simplifié de la structure protéique de MUC1.

Liste des Tables

Table I : Récepteurs de capture d'antigènes exprimés par les DC.

Table II : Essais cliniques publiés utilisant les DC comme stratégie de vaccination.

I. Introduction

I.1. Surveillance immunitaire et détection des tumeurs

Paul Ehrlich fut le premier à envisager que le système immunitaire pouvait réprimer une fréquence potentiellement importante de tumeurs (Ehrlich, 1909). Toutefois, l'idée que le système immunitaire pouvait exercer un contrôle des maladies néoplasiques n'a pas été poursuivie jusqu'à la moitié du XX^{ème} siècle. Dans une certaine mesure, l'hypothèse initialement formulée par Ehrlich nécessitait le développement de l'immunologie fondamentale. Le concept de surveillance immunitaire fut ensuite poursuivi par Sir Macfarlane Burnet en 1957 (Burnet, 1957), même si celui-ci a fait l'objet de nombreuses critiques, notamment à cause de données expérimentales démontrant que des souris *nude*, pourtant défailtantes sur le plan immunitaire, n'avaient pas d'incidence particulièrement plus élevée de tumeurs. Cependant, il a été suggéré ultérieurement que l'implication du système immunitaire, pour sa partie réponse innée, pouvait compenser l'incapacité de développer la réponse acquise et ainsi expliquer la fréquence normale d'apparition de tumeurs chez ces souris (Stutman, 1979a; Stutman, 1979b). Au même moment, Lewis Thomas suggéra qu'une des fonctions principales de l'immunité cellulaire était de maintenir l'homéostasie des organismes multicellulaires complexes en les protégeant des éventuels développements de maladies néoplasiques (Thomas, 1959). Ainsi, il a été spéculé que les lymphocytes pouvaient agir telles des sentinelles dans la reconnaissance et l'élimination des cellules transformées de l'organisme (Burnet, 1970).

Clairement, il ne peut y avoir de surveillance immunitaire s'il n'y a pas de structures antigéniques distinctes exprimées à la surface des cellules tumorales et spécifiquement reconnues par le système immunitaire. Le développement tumoral est associé à l'acquisition de mutations génétiques, l'expression de nouveaux antigènes ou la sur-expression de molécules qui sont toutes des cibles potentiellement reconnues par le système immunitaire. Des données cliniques semblent corroborer cette hypothèse dans la mesure où l'infiltration lymphocytaire corrèle très souvent avec une meilleure survie des patients atteints de cancer

(Marrogi et al., 1997; Naito et al., 1998; Nakano et al., 2001; Schumacher et al., 2001; Zhang et al., 2003). En outre, l'incidence très importante de maladies tumorales chez des patients recevant des thérapies immunosuppressives chroniques après transplantations d'organes suggère un rôle actif de la surveillance immunitaire contre les tumeurs (Sanchez et al., 2002; Tenderich et al., 2001). Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par la très grande fréquence de lymphomes chez des patients atteints d'infection HIV (Goedert et al., 1998).

I.1.1 Les phases de l'immunosurveillance

Récemment, l'équipe de Robert Schreiber a suggéré que le concept de surveillance immunitaire était la résultante de 3 processus : élimination, équilibre et échappement (Dunn et al., 2002) (Figure 1). La surveillance immunitaire proprement dite intervient au cours de la phase d'élimination, alors que la sélection des variants tumoraux se passe pendant la phase d'équilibre. Ceci pouvant conduire à l'échappement et par conséquent à l'apparition clinique de tumeurs.

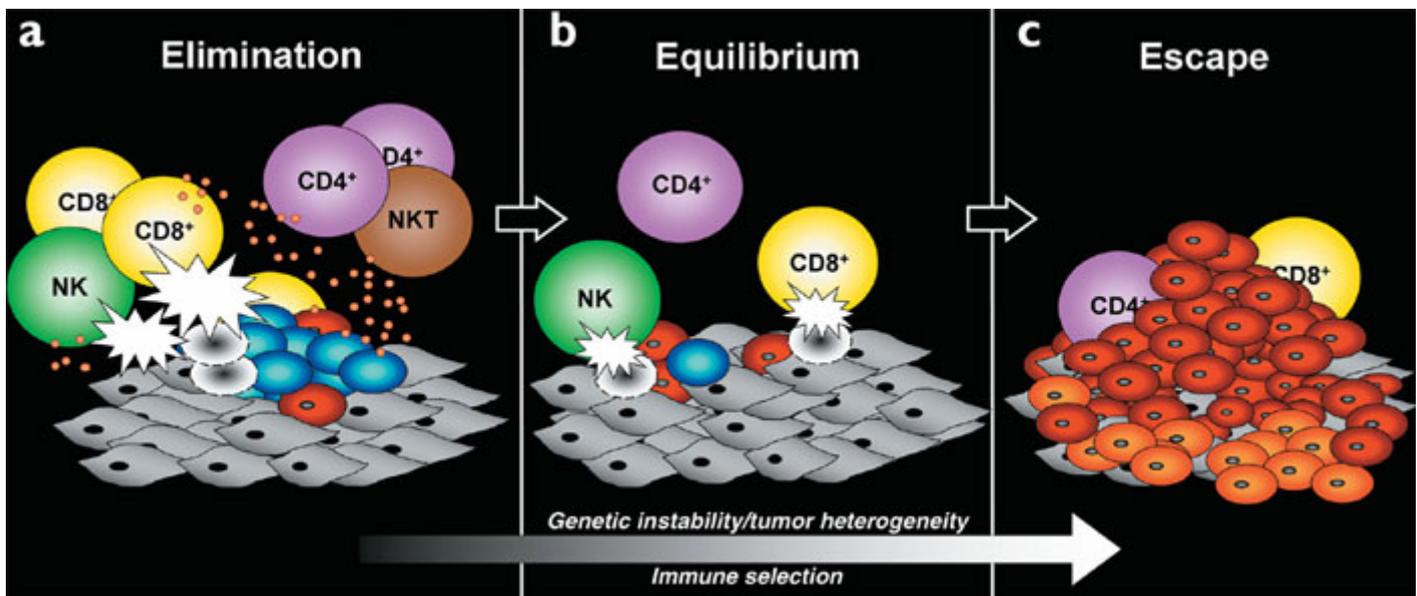


Figure 1 : Les 3 phases de l'immunosurveillance.
D'après GP. Dunn et al, 2002.

I.1.1.a. Phase d'élimination

Dans la première phase dite d'élimination, les tumeurs solides qui atteignent une certaine taille commencent à proliférer de manière anarchique et à produire des facteurs angiogéniques afin d'assurer la vascularisation nécessaire à leur survie (Hanahan and Folkman, 1996) (Figure 2a). Cette croissance tumorale provoque alors la rupture des tissus environnants induisant ainsi des signaux inflammatoires. Ces derniers participent alors au recrutement des cellules du système immunitaire inné (NKT, NK, lymphocytes T $\gamma\delta$, M \emptyset et DC) jusqu'au site tumoral (Girardi et al., 2001; Matzinger, 1994; Smyth et al., 2001). Les cellules transformées sont alors reconnues par les leucocytes infiltrant qui sont stimulés pour produire de l'IFN- γ (Cerwenka et al., 2000; Diefenbach et al., 2001; Yokoyama, 2000). Dans la deuxième phase, l'IFN- γ peut induire à son tour la sécrétion de différentes chémokines (CXCL-10, CXCL9 et CXCL11) par les tumeurs elles mêmes et par les tissus environnants (Cole et al., 1998; Liao et al., 1995; Luster and Ravetch, 1987). Une partie de ces chémokines douées d'activité angiostatique vont bloquer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, favorisant l'apoptose des cellules tumorales (Coughlin et al., 1998; Luster and Leder, 1993; Qin and Blankenstein, 2000; Sgadari et al., 1996). Les débris tumoraux cellulaires sont alors phagocytés soit par les M \emptyset , soit par les DC qui vont migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. D'autre part, l'escalade de production de chémokines durant le processus inflammatoire permet un recrutement encore plus important de cellules NK et de M \emptyset au niveau du site tumoral (Figure 2b). Dans la troisième phase, les cellules NK infiltrant les tumeurs et les M \emptyset vont de nouveau produire de l'IFN- γ et de l'IL-12 et participer à l'élimination des tumeurs par des mécanismes impliquant TRAIL, perforine et des intermédiaires oxygénés (Bancroft et al., 1991; Ikeda et al., 2002; Takeda et al., 2002; Trinchieri and Scott, 1995). Aux niveaux des ganglions, les lymphocytes T CD4+ activés peuvent sécréter de l'IFN- γ sous l'influence des DC et ainsi faciliter le développement des lymphocytes T CD8+ (Ferlazzo et al., 2002; Gerosa et al., 2002; Pardoll, 2002) (Figure 2c). Dans la quatrième phase, les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ spécifiques de tumeurs vont migrer vers le site tumoral, où les CTL vont détruire les cellules tumorales dont l'immunogénicité a été amplifiée par la sécrétion locale d'IFN- γ (Shankaran et al., 2001) (Figure 2d).

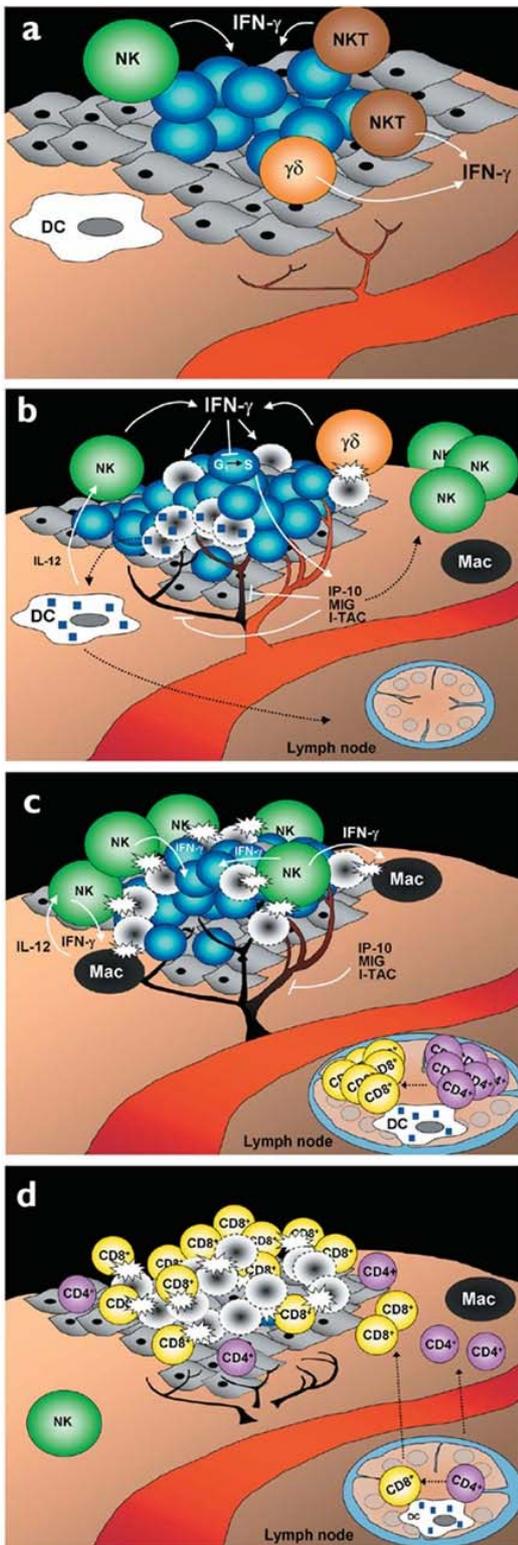


Figure 2 : Un modèle proposé de la phase d'élimination du processus d'immunosurveillance. D'après GP. Dunn et al, 2002.

I.1.1.b. Phase d'équilibre

A l'issue de première phase, le système immunitaire ainsi que les variants tumoraux qui ont survécu au processus d'élimination entrent dans une phase dite d'équilibre. Au cours de celle-ci, les lymphocytes T et l'IFN- γ exercent une pression sélective efficace sur les cellules tumorales génétiquement instables. Durant cette période de sélection "Darwinienne", de nombreux variants tumoraux sont détruits, mais de nouveaux variants émergent avec de nouvelles mutations augmentant leur résistance aux attaques immunitaires. Il est vraisemblable que ce processus d'équilibre est très long et intervient sur une période de plusieurs années.

*Figure 3 : Classification des antigènes tumoraux reconnus par le système immunitaire.
D'après E. Gilboa, 1999.*

I.1.1.c. Phase d'échappement

Enfin, dans le processus d'échappement, les variants tumoraux qui ont acquis au fil des mutations une insensibilité aux détections et/ou éliminations immunologiques grâce à leurs modifications génétiques, commencent à proliférer de manière incontrôlée. Ce résultat est cliniquement observé par l'apparition d'une tumeur maligne qui, le cas échéant, peut conduire à la mort de l'individu.

I.1.2. Mécanismes d'échappement des tumeurs au système immunitaire

La question est de comprendre pourquoi, si les tumeurs sont immunogènes, elles continuent à se développer ? Quels sont les paramètres qui empêchent la réaction immunitaire de se mettre en place afin de détruire la tumeur ? Grâce à l'expression d'antigènes spécifiques exprimés par les tumeurs, le système immunitaire a, en théorie, la propriété de reconnaître les cellules tumorales comme cellules du non-soi. Cependant, celles-ci peuvent neutraliser la réponse immunitaire et échapper ainsi à cette reconnaissance en esquivant les principaux

systèmes de détection. Comme mentionné précédemment, la réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les cellules tumorales. Elle n'implique pas la reconnaissance spécifique de l'antigène et de ce fait elle nécessite pas de sensibilisation préalable. Les MØ, les DC, les cellules NK, les granulocytes et les neutrophiles sont les principaux acteurs de cette première ligne de défense (Bancroft, 1993). Leur fonction est de répondre immédiatement afin de limiter la prolifération tumorale. Ces cellules identifiées par leurs capacités cytotoxiques sont également caractérisées par leur aptitude à sécréter de nombreuses cytokines et chémokines. *In vivo*, ces cellules reconnaissent et lysent de nombreux types de cellules tumorales (Trinchieri, 1989). Des observations cliniques chez l'Homme ont permis de mettre en évidence dans des modèles murins la capacité des cellules NK à détruire sans mécanisme spécifique des cellules tumorales injectées ou viro-induites (Wustrom and Zenner, 1985). Cependant, il est clairement admis que pour rejeter une tumeur, l'organisme doit faire appel à tous ses moyens de défense. Des travaux effectués chez la souris ont en effet montré que bien qu'indispensable au rejet tumoral, l'immunité naturelle est une réponse précoce qui précède et prépare le développement de l'immunité adaptative via la mise en place d'un réseau cytokinique impliqué dans l'activation de nombreuses cellules immunitaires (Palucka and Banchereau, 1999).

Ainsi il est possible de détecter et même d'amplifier des clones T CD8⁺ spécifiques vis-à-vis de certains antigènes de tumeurs. Ainsi, grâce à l'utilisation de complexes CMH/peptide solubles, Lee et ses collaborateurs ont pu démontrer la présence de lymphocytes T CD8⁺ circulants spécifiques d'antigènes tumoraux chez 60% de patients atteints de mélanome (Lee et al., 1999). En effet, cette étude a permis la détection de lymphocytes T anti-MART-1 et anti-tyrosinase avec des fréquences significatives de 0,16% et 2,2%, respectivement (Lee et al., 1999). L'analyse des lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TIL) révèle que 30% d'entre eux sont tout à fait capables de réagir contre des cellules cibles exprimant l'antigène en question avec l'élément de restriction approprié (Benlalam et al., 2001; Kawakami et al., 2000). De plus, il est possible de générer *in vitro* des CTL spécifiques de mélanome de forte affinité (Gervois et al., 2000). Cependant, l'activité cytolytique détectée *in vitro*, issue de l'interaction des CTL avec leurs cibles spécifiques, ne reflète pas obligatoirement la réactivité anti-tumorale et l'activité cytotoxique *in vivo*. En outre, la présence de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeurs ne corrèle pas toujours avec une régression et/ou un rejet de la tumeur. Ainsi, dans l'étude de Lee, le patient présentant la fréquence la plus importante d'effecteurs spécifiques d'antigènes de mélanome s'avérait non

répondant *in vitro* vis-à-vis de cellules exprimant ces antigènes de tumeurs (Lee et al., 1999). Ces résultats suggèrent que, même si des lymphocytes T spécifiques anti-tumoraux sont présents à des niveaux détectables chez des patients atteints de cancer, ils ne sont pas forcément compétents pour rejeter la tumeur.

I.1.2.a. Phénomène de tolérance.

L'un des principaux obstacles à la génération d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace provient du fait que les tumeurs émergent à partir des tissus sains et expriment par conséquent de nombreux antigènes du soi vis-à-vis desquels les lymphocytes T spécifiques sont tolérants. C'est le cas par exemple de l'antigène p53 qui est fortement exprimé par les cellules tumorales et faiblement exprimé par les cellules saines. Dans l'absolu, p53 est une cible antigénique potentielle en immunothérapie mais il s'avère que l'organisme peut être tolérant vis-à-vis de cet antigène, car les clones T spécifiques de forte affinité ont pu être éliminés. En périphérie, l'induction d'une réponse immunitaire dépend essentiellement du contexte de présentation de l'antigène plus que l'antigène en lui-même. En effet, selon le concept de « Danger » développé par Polly Matzinger (Gallucci and Matzinger, 2001), l'antigène présenté dans un environnement de danger (stimuli inflammatoires avec relargages de cytokines, destructions tissulaires avec libération de protéines de stress (HSP)) favorise l'initiation d'une réponse immune. Si le même antigène est présenté dans un environnement dépourvu de signaux dangers, il y a induction d'un phénomène de tolérance.

I.1.2.b. Influence des facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales.

La synthèse de facteurs solubles par la tumeur peut favoriser la croissance des cellules tumorales via un effet autocrine, mais peut également influencer la réponse immunitaire. Ainsi, la production de substances immunosuppressives telles l'IL-10 et/ou le TGF- β par les cellules tumorales exerce un effet inhibiteur sur les CPA. Celles-ci diminuent, en effet, le niveau d'expression des molécules de CMH de classe II et bloquent la synthèse des cytokines

responsables de l'activation des lymphocytes T comme l'IL-12 (Chen et al., 1994; Gorelik and Flavell, 2001; Inge et al., 1992; Tada et al., 1991). Par ailleurs, certaines cellules tumorales comme celles de cancer colo-rectal ont la propriété de sécréter des récepteurs solubles de type Decoy DC3 qui vont fixer et neutraliser les molécules FasL dans le milieu extracellulaire (Pitti et al., 1998) échappant ainsi à l'apoptose immuno-induite par les cellules effectrices du système immunitaire.

I.1.2.c. Défaut d'activation des lymphocytes T

L'activation des lymphocytes T aboutissant à la synthèse d'IL-2 nécessite à la fois un signal antigène spécifique fourni lors de la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le récepteur T à l'antigène (TCR) et un 2^{ème} signal dit de co-stimulation (Lenschow et al., 1996; McAdam et al., 1998). Une des sources pour ce second signal est donnée par la liaison de la molécule CD28 avec ses ligands B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86). L'engagement du TCR en l'absence d'un signal de co-stimulation empêche les lymphocytes T de se différencier en cellules effectrices et induit l'anergie des lymphocytes T spécifiques. Un défaut d'expression des molécules de co-stimulation B7.1 et B7.2 ainsi que des molécules d'adhésion LFA-3 et ICAM-1 à la surface des cellules tumorales contribue à la faible immunogénicité des cancers. De même, la diminution d'expression voire la perte de certains allèles codant pour les molécules de CMH est un mécanisme d'échappement tumoral largement rapporté dans des proliférations malignes de différentes origines (Ferrone and Marincola, 1995; Garrido et al., 1993). Par ailleurs, bien que les mécanismes précis impliqués dans l'initiation de l'anergie des lymphocytes T chez des patients atteints de tumeurs ne soient pas entièrement caractérisés, il apparaît que ceux-ci peuvent être également associés à un dysfonctionnement des voies de signalisation initiées par l'engagement du TCR via la diminution de l'expression de la chaîne ζ du TCR et la perte d'expression de la protéine tyrosine kinase Syk chez les TIL (Finke et al., 1993; Mizoguchi et al., 1992).

I.1.2.d. Résistance à l'apoptose :

Le développement d'un clone tumoral traduit un déséquilibre entre les niveaux de prolifération et d'apoptose. L'échappement des cellules tumorales à l'apoptose exige des mécanismes qui empêchent la transmission des signaux de mort. Parmi les molécules impliquées dans l'apoptose, on distingue les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (de même que Bcl-XL, Mcl-1, et A1) (Boise et al., 1993) et les protéines pro-apoptotiques de la famille Bax et Bak (Evan and Vousden, 2001). C'est la régulation différentielle de ces deux familles de protéines qui va moduler la sensibilité des cellules à l'apoptose. Un grand nombre de cellules de tumorales humaines montrent une résistance à la mort cellulaire programmée en augmentant le rapport des protéines de la famille Bcl-2/Bcl-XL à celle de Bax/Bak (Evan and Vousden, 2001). A titre d'exemple, la translocation t(14;18) présente dans 80% des lymphomes aboutit à une augmentation significative de l'expression constitutive des protéines de la famille Bcl-2, contribuant à la survie *in vivo* des clones B malins (Johnson et al., 1993; Korsmeyer, 1992).

I.1.2.e. Lymphocytes T régulateurs.

Un autre mécanisme impliqué dans l'inhibition des réponses CTL contre les tumeurs peut être dû à la présence de lymphocytes T régulateurs au sein de la masse tumorale. En effet, les lymphocytes T CD4+CD25+ ont récemment été identifiés comme une population cellulaire dite « régulatrice » dont la déplétion conduit au développement de maladies auto-immunes (Willerford et al., 1995). Des études plus récentes suggèrent que ces lymphocytes T CD4+CD25+ régulateurs soient également impliqués dans la prévention des réponses CTL anti-tumorales (Liyanage et al., 2002; Woo et al., 2001; Woo et al., 2002). Ainsi, il a été démontré que ce mécanisme d'échappement tumoral pouvait être contourné via la déplétion de ces lymphocytes T régulateurs sécréteurs de TGF- β suivie d'un transfert adoptif des lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeurs dans un modèle colo-rectal de rat (Ghiringhelli et al., 2004). De même, des études ont rapporté la faisabilité de traiter, avec un certain succès, des patients atteints de mélanome lorsque ces derniers reçoivent un traitement immunosuppresseur composé de cyclophosphamide et fludarabine, avant injections de populations cellulaires enrichies en lymphocytes T spécifiques de tumeurs issus de TIL (Dudley et al., 2002a). Cette stratégie de vaccination conduit à la fois à la régression des

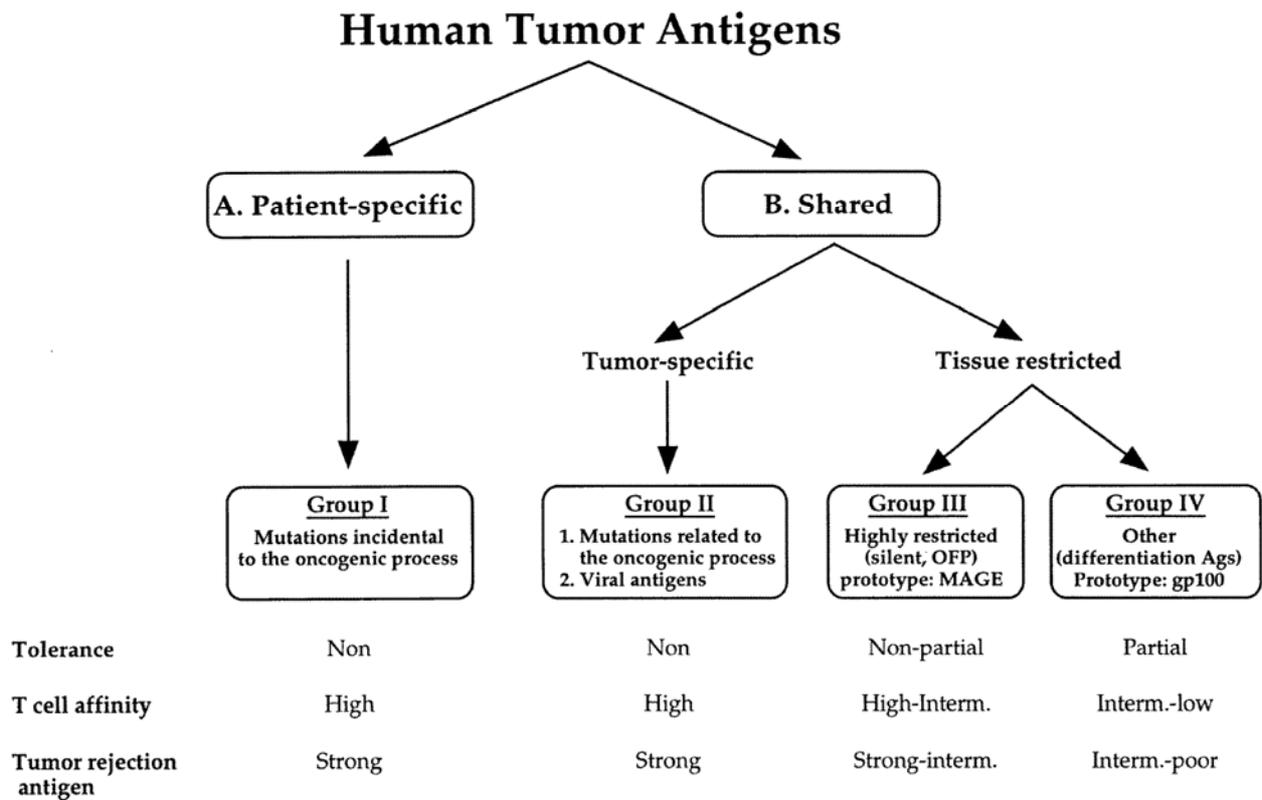
lésions de mélanome et au développement d'auto-immunité. Dans cette étude, la réponse anti-tumorale était associée au repeuplement persistant du compartiment cellulaire T, un phénomène qui n'a jamais été observé avec la simple administration des clones T anti-tumoraux amplifiés *in vitro* (Dudley et al., 2001; Dudley et al., 2002b; Rosenberg et al., 1994; Yee et al., 2000).

I.1.2.f. Localisation des tumeurs.

Enfin, un autre facteur pouvant contribuer à la l'échappement tumoral peut provenir de la localisation tumorale elle même. En effet, la tumeur n'est pas forcément accessible aux lymphocytes T circulants qui de ce fait ignorent sa présence. Ainsi, il a été montré qu'une lignée cellulaire de sarcome exprimant un antigène viral était capable d'induire une importante réponse CTL à condition que celle-ci soit injectée en sous cutanée sous forme de suspension cellulaire mais jamais sous forme de fragments solides (Ochsenbein et al., 1999).

I.2. Antigènes de tumeurs

Les antigènes associés aux tumeurs et reconnus par les effecteurs humoral et cellulaire du système immunitaire sont des cibles potentielles pour l'immunothérapie des cancers. Comme le montre la figure 3, différentes catégories d'antigènes de tumeurs permettant l'induction de réponses CTL ont été identifiées: les antigènes partagés, les antigènes de différenciation, les antigènes résultants de mutation, les antigènes sur-exprimés et ubiquitaires et les antigènes viraux.



*Figure 3 : Classification des antigènes tumoraux reconnus par les CTL.
D'après E. Gilboa, 1999.*

I.2.1. Antigènes partagés

Le premier groupe d'antigènes de tumeurs est représenté par les antigènes codés par des gènes qui sont silencieux dans la plupart des tissus normaux, mais activés dans de nombreuses tumeurs de différents types histologiques. Les antigènes prototypes de ce groupe sont ceux codés par le gène P1A chez la souris (Van den Eynde et al., 1991) et par la famille des gènes MAGE chez l'Homme (De Plaen et al., 1994). Les seules cellules normales pour lesquelles une expression significative des gènes P1A et MAGE est détectée sont les cellules du trophoblaste placentaire et les cellules germinales testiculaires (De Plaen et al., 1994; Takahashi et al., 1995; Uyttenhove et al., 1997). Toutefois, ces dernières n'expriment pas de molécules de CMH de classe I (Haas et al., 1988), ce qui signifie que l'expression de ces

antigènes peut être considérée comme spécifique de tumeur. L'activation des gènes de la famille MAGE résulte généralement d'une déméthylation de leur promoteurs (De Smet et al., 1996; Serrano et al., 1996) et est partagée par différents types de tumeurs (mélanome, carcinome ovarien, carcinome rénal, cancer de la vessie), ce qui en font des cibles particulièrement prometteuses en immunothérapie. A l'instar de l'antigène MAGE, l'antigène RAGE n'est pas exprimé dans la plupart des tissus normaux, mais est activé et partagé par de nombreux types de cancers comme le mélanome et le carcinome rénal. (Gaugler et al., 1996). Il est également exprimé par les cellules saines de la rétine (Gaugler et al., 1996). Toutefois, ces cellules étant dépourvues de molécules de CMH de classe I (Abi-Hanna et al., 1988), l'antigène RAGE peut être considéré comme antigène spécifique de tumeur. De plus, l'œil est un site immunologique privilégié pourvu d'une variété d'agents immunosuppresseurs efficaces, il est ainsi protégé d'éventuelles réponses auto-immunes (Streilein, 1995).

Un autre exemple intéressant appartenant à cette catégorie d'antigènes sont les mucines dont l'expression est également partagée par de nombreux types de tumeurs comme le sein, l'ovaire ou le pancréas (Barratt-Boyes, 1996; Jerome et al., 1993). Alors que ces mucines sont lourdement glycosylées chez les cellules normales, les séquences répétées de cette protéine sont dévoilées par déglycosylation dans les tumeurs favorisant leur reconnaissance par les CTL. Celle-ci, qui dépend des séquences répétées, intervient en l'absence de restriction HLA. La déglycosylation est un phénomène naturel au niveau des cellules épithéliales du sein pendant la phase de lactation, mais seulement à la surface apicale extracellulaire qui n'est normalement pas accessible aux lymphocytes T. Ces antigènes de mucine apparaissent comme très spécifiques des cellules tumorales, et le manque de restriction HLA devrait théoriquement favoriser les essais de vaccinations thérapeutiques (Barratt-Boyes, 1996; Jerome et al., 1993).

I.2.2. Antigènes de différenciation

Un grand nombre de CTL isolés à partir de patients atteints de mélanome reconnaissent naturellement une majorité de cellules de mélanome mais aussi de nombreux mélanocytes normaux (Anichini et al., 1993). La reconnaissance de ces antigènes de différenciation de mélanome par les CTL a été confirmée lorsque ceux-ci ont été identifiés à un niveau moléculaire. Un bon exemple est celui de l'antigène tyrosinase, qui est une protéine

de mélanocyte qui donne naissance à différents peptides qui sont présentés par les molécules de CMH de classe I ou II aux lymphocytes T CD8+ ou CD4+, respectivement (Topalian et al., 1996). Le rôle actif des CTL contre les antigènes de différenciation dans le rejet de mélanome n'est pas très clair, mais il est tend à être confirmé par le développement simultané de vitiligo, une maladie auto-immune qui est une dépigmentation locale de la peau résultant de la destruction des mélanocytes (Rosenberg and White, 1996). Il en est de même concernant les effets secondaires auto-immuns appliqués à l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) qui est une protéine oncofœtale exprimée à la fois par l'épithélium normal du colon et par la plupart des carcinomes intestinaux (Hodge, 1996).

Les lymphomes B, qui sont des tumeurs monoclonales issues des lymphocytes B, expriment un idiotype correspondant à la spécificité antigénique aux cellules B parentales (Wen and Lim, 1997). Des réponses T contre ces épitopes ont été démontrées. Ainsi, les immunoglobulines idiotypiques représentent un cas particulier d'antigènes de différenciation qui sont unique à chaque tumeur.

I.2.3. Antigènes résultant de mutations

Les antigènes de cette troisième catégorie correspondent à des peptides issus de protéines ubiquitaires qui sont mutées chez les cellules tumorales. Par exemple, deux mutations affectant les gènes codant pour les protéines CDK et β -caténine, sont détectées dans de nombreuses tumeurs humaines (Robbins et al., 1996; Rubinfeld et al., 1997; Wolfel et al., 1995) et participent vraisemblablement au processus de l'oncogénèse. En effet, la mutation du gène codant pour la protéine CDK4 empêche celle-ci d'interagir avec son inhibiteur p16 (Wolfel et al., 1995). Ceci modifie la régulation du cycle cellulaire, favorisant une croissance incontrôlée des tumeurs. La mutation affectant la β -caténine augmente la stabilité de la protéine mutée lui permettant de former de manière constitutive des complexes avec des facteurs de transcription comme Lef-1 (Rubinfeld et al., 1997). Les complexes β -caténine/Lef-1 induisent alors la transcription permanente de gènes encore non identifiés stimulant la prolifération cellulaire et inhibant l'apoptose (Peifer, 1997; Rubinfeld et al., 1997). Une autre mutation s'opposant à l'apoptose a récemment été identifiée grâce à des CTL spécifiques vis-à-vis de carcinomes rénaux humains (Mandrizzato et al., 1997). L'antigène est codé par une forme mutée du gène CASP-8 correspondant à la caspase-8, également appelée FLICE. Cette protéase est nécessaire pour l'induction d'apoptose via

l'engagement de FasL et du TNF (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996), et la capacité de cette protéine est réduite par rapport à la caspase-8 sauvage (Mandrizzato et al., 1997). A l'instar de CDK4 et de la β -caténine, cette mutation joue également un rôle important dans la transformation et progression tumorale.

Une nouvelle fois, les antigènes humains appartenant à cette catégorie ont été détectés pour la première fois dans un modèle de mélanome, mais récemment, des antigènes similaires ont aussi été observés dans d'autres types de cancer (carcinome rénal, cancer colo-rectal). Bien que la spécificité tumorale de ces antigènes soit optimale, le fait qu'ils soient souvent uniques empêche leur utilisation comme vaccins anti-cancéreux génériques. En effet, même si des peptides mutés synthétiques de ras et p53 sont fréquemment utilisés *in vitro* avec succès pour générer des CTL ou des réponses contre les tumeurs portant la mutation génique correspondante (Abrams et al., 1996; Noguchi et al., 1994; Peace et al., 1994; Skipper and Stauss, 1993), aucun de ces antigènes n'est utilisé en clinique comme cible anti-tumorale aujourd'hui.

Enfin, les leucémies myéloïdes expriment fréquemment la protéine chimérique bcr-abl, qui résulte de la translocation chromosomique t(9 ;22). Les lymphocytes T CD4+, éduqués *in vitro* contre un peptide centré sur la région de fusion bcr-abl ont récemment été montrés comme capables de reconnaître des blastes leucémiques exprimant bcr-abl dans le contexte HLA-DR4 (Bosch et al., 1996). Ceci indique qu'une autre source d'antigènes spécifiques de tumeurs sont des protéines chimériques codées au niveau des sites de translocation chromosomique qui interviennent dans certains types de leucémies. De plus, ces antigènes peuvent être potentiellement partagés par de nombreuses leucémies (LAM, LAL).

I.2.4. Antigènes de tumeurs sur-exprimés et antigènes ubiquitaires

Des CTL dirigés de façon spécifique contre les cellules tumorales, reconnaissent pourtant des antigènes codés par des gènes non mutés, exprimés à la fois par des cellules tumorales et par des cellules saines (Ikeda et al., 1997; Robbins et al., 1995). C'est le cas par exemple de l'antigène HER-2/neu qui est exprimé par certains tissus sains et qui est sur-exprimé dans les tumeurs, à des taux importants comme dans le cas des carcinomes mammaires et ovariens (Hesketh, 1997). Ainsi, un peptide dérivé de HER-2/neu a été rapporté

comme étant une cible potentielle de lymphocytes infiltrant certains carcinomes ovariens d'haplotype HLA-A2 (Fisk et al., 1995; Lustgarten et al., 1997). De même, il a été démontré qu'un clone établi *in vitro* contre un peptide p53 sauvage était capable de lyser des tumeurs HLA-A2 sur-exprimant p53 (Ropke et al., 1996). Dans ce cas, la concentration de p53 était augmentée dans de nombreuses cellules tumorales, principalement à cause d'une demi-vie rallongée des formes mutantes par rapport aux formes sauvages (Hesketh, 1997). Il est très difficile de déterminer si une immunisation contre ces antigènes tels HER-2/neu ou p53 peut conduire à des dommages auto-immuns dirigés contre des tissus normaux, où les même antigènes sont exprimés à de faibles niveaux. La reconnaissance des épitopes par les CTL nécessite une expression des gènes jusqu'à un certain seuil (Lethe et al., 1997). Dans certains cas, ce seuil n'est pas atteint dans la plupart des tissus sains. Dans d'autres cas, la faible expression mesurée par le niveau des ARN messagers dans un tissu donné peut en fait refléter une expression suffisante pour dépasser le seuil requis mais chez un petit nombre de cellules uniquement.

I.2.5. Antigènes viraux

Les antigènes dérivés des virus oncogènes constitue une autre catégorie d'antigènes de tumeurs potentiellement pertinents pour l'immunothérapie anti-tumorale. Un certain nombre d'antigènes viraux a été étudié en détails dans des modèles de tumeurs viro-induites chez la souris. Ces antigènes se sont avérés pertinents dans le rejet tumoral (Kast and Melief, 1991; Kast et al., 1989; Klarnet et al., 1989; Plata et al., 1987; Tanaka et al., 1988). Chez l'homme, le meilleur exemple est sans doute l'oncoprotéine E7 du virus de papillome (HPV)16, qui est présent dans la plupart des carcinome cervicaux. Les CTL spécifiques de tumeur peuvent être induits *in vitro* via des sensibilisations de lymphocytes T CD8+ naïfs par des peptides E7 présentés dans le contexte HLA-A2 (Ressing et al., 1995).

I.3. Immunothérapie anti-tumorale

I.3.1. Immunothérapie passive

Au début des années 1980, l'immunothérapie était essentiellement basée sur l'utilisation du bras inné de la réponse immunitaire cellulaire pour traiter des cancers primaires et/ou métastatiques. Cette stratégie ne visait pas à activer le système immunitaire de manière systémique *in situ*, mais faisait appel à des effecteurs isolés et activés *in vitro* avant leur ré-injection. Ces effecteurs ont des activités anti-néoplasiques seuls ou en association avec d'autres composés actifs et peuvent être des cellules (LAK, TIL, MØ) ou des molécules sécrétées (anticorps).

I.3.1.a. Les lymphocytes

L'utilisation de lymphocytes repose sur l'observation qu'ils constituent un infiltrat autour des cellules tumorales et qu'ils possèdent des activités cytotoxiques *in vitro* (Balkwill and Mantovani, 2001). Les cellules LAK (Lymphokine Activated Killer) correspondent à des lymphocytes T naïfs activés *in vitro* par de fortes doses d'IL-2, qui développent une activité cytotoxique à l'égard des cellules tumorales. Si des résultats positifs ont été enregistrés (Rosenberg et al., 1987), l'utilisation concomitante de fortes doses d'IL-2 a limité l'intérêt de cette approche. Les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) peuvent être isolés à partir de biopsies tumorales, puis amplifiés *in vitro* sous de faibles doses d'IL-2. La spécificité accrue pour leur cible tumorale par rapport aux LAK leur procure une efficacité supérieure dans certains modèles animaux (Rosenberg et al., 1986), mais reste limitée aux mélanomes chez l'Homme (Arienti et al., 1993; Rosenberg et al., 1994). De plus, l'extraction de ces cellules en quantité suffisante est soumise à de fortes variabilités inter-individuelles, ce qui réduit son potentiel thérapeutique.

I.3.1.b. Les macrophages

Les MØ sont présents au sein de l'infiltrat leucocytaire de la plupart des tumeurs. Bien qu'*in situ*, leur contribution à l'immunosurveillance ou à la promotion tumorale reste encore incertaine, les MØ cultivés et activés *ex vivo* représentent essentiellement des effecteurs cytotoxiques et non des MØ inflammatoires. Dès lors, le transfert vers le site tumoral de MØ préparés *ex vivo* peut être envisagé comme stratégie immunothérapeutique. L'accès à de grandes quantités de monocytes chez des patients atteints de différentes tumeurs a permis de

générer de manière reproductible des MØ effecteurs en grand nombre (Andreesen et al., 1998; Faradji et al., 1994). L'injection de MØ activés *ex vivo* est bien toléré, mais n'a pas démontré d'efficacité thérapeutique dans les indications concernées (cancer colorectaux, mélanome, cancer pulmonaire) (Eymard et al., 1996; Faradji et al., 1991; Hennemann et al., 1997; Hennemann et al., 1995; Lacerna et al., 1988). Il subsiste quelques espoirs dans le cas des cancers de la vessie (étude en cours) et du mésothéliome (Monnet et al., 2002). L'activité cytotoxique *in vitro* des MØ étant augmentée contre des cibles opsonisées par des anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux, l'administration conjointe d'anticorps pourrait permettre d'améliorer l'efficacité thérapeutique (Deo et al., 1998; Keler et al., 1997).

1.3.1.c. Les anticorps

L'utilisation d'anticorps humanisés reconnaissant spécifiquement des molécules antigéniques exprimées par les cellules tumorales est envisagée afin de tuer directement les cibles ou bien en tant que vecteurs d'agents cytotoxiques vers les cellules tumorales. Ainsi, un anticorps anti-CD20 est indiqué dans le traitement de certains lymphomes (Colombat et al., 2001), et un anticorps anti-c-erb-B2 améliore l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques dans les cancers du sein (Baselga et al., 1996). Cette approche thérapeutique tend à être complétée par le couplage de ces anticorps à des isotopes radioactifs (anti-CD20+ iode 131), ou par thérapie cellulaire avec des cellules capables de cytotoxicité dépendante d'anticorps (ADCC), tels des MØ activés.

1.3.2. Immunothérapie active :

Des déceptions émergèrent rapidement des essais cliniques d'immunothérapie basés sur l'injection de LAK et de TIL. Le récent essor de l'immunothérapie active au cours des 5 dernières années, a permis une amélioration considérable de la conception des vaccins anti-tumoraux (Hemmila and Chang, 1999; Jager et al., 2002; Moingeon, 2001). Indépendamment de la constitution du vaccin, l'objectif consiste toujours à fournir l'antigène dans un contexte idéal de stimulation afin de permettre la génération *in vivo* d'une réaction immunitaire anti-tumorale. Ces vaccins constituent une forme active d'immunothérapie puisqu'ils sont fondés

sur la capacité du receveur à induire une réponse immunitaire contre les antigènes administrés. Ainsi, les patients inscrits dans ces essais cliniques doivent être immunocompétents.

L'objectif est la réalisation d'un bénéfice thérapeutique mesurable, provenant des deux bras, humoral et cellulaire, du système immunitaire. Toutefois, puisque l'efficacité de ces vaccins est basée sur l'établissement d'une réponse immunitaire diversifiée impliquant à la fois les lymphocytes B et T, les facteurs suivants doivent être soigneusement considérés:

- (1) perte d'expression de molécules du CMH par les tumeurs;
- (2) faible immunogénicité de beaucoup d'antigènes de tumeurs;
- (3) diminution de l'expression des antigènes de tumeurs;
- (4) sécrétion des molécules immunosuppressives par les cellules hôtes de tumeur et d'infiltration
- (5) présentation altérée des antigènes de tumeurs par les DC.

En effet, ces points pris seul ou en association, peuvent prédisposer beaucoup de vaccins à l'échec. Malgré ces difficultés, des succès ont été rapportés.

En général, les vaccins anti-tumoraux utilisés en immunothérapie active peuvent être divisés en trois catégories :

- antigènes de tumeurs,
- cellules tumorales autologues ou allogéniques,
- DC exprimant des antigènes de tumeur.

Chacun a ses avantages et ses inconvénients qui ne seront pas discutés dans un ordre particulier d'importance.

I.3.2.a. Injections d'antigènes de tumeurs :

La première catégorie de vaccins est basée sur l'utilisation d'antigènes de tumeurs identifiés et sur l'injection de ces molécules en tant qu'agents d'immunisation. Ces antigènes peuvent être des protéines entières normales ou synthétiques, des peptides dérivés de la

protéine, de l'ARN, de l'ADN "nu", ou de l'ADN codés dans des vecteurs d'expression tels des virus de recombinaison, des plasmides, ou bien encore des bactéries de recombinaison. Des liposomes ont également été employés pour l'administration d'une variété d'immunogènes (Bodey et al., 2000). Dans le développement des vaccins anti-tumoraux au cours des 10 dernières années, le mélanome a servi de tumeur prototype en raison de son importante immunogénicité. Ainsi, des vaccins ont été produits en utilisant des antigènes de tumeurs tels MART-1, gp100, gp75, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, tyrosinase, GM2 et GD2 (Hemmila and Chang, 1999). Naturellement, la capacité d'appliquer cette stratégie vaccinale dépend de la connaissance des antigènes exprimés par la tumeur du patient. Ceux-ci peuvent être facilement identifiés lorsque la tumeur autologue est disponible mais ce n'est malheureusement pas toujours le cas car quelques patients peuvent s'avérer inopérables.

D'autre part, l'efficacité de ce type de vaccin est fondée sur la capacité du patient à induire une réponse immunitaire contre des peptides antigéniques présentés par les molécules HLA. Ce qui signifie que toute altération de l'expression de ces protéines par la tumeur entravera l'efficacité du vaccin. Or des études ont déjà décrit une expression diminuée des molécules HLA dans de nombreux cancers (Restifo et al., 1993a; Restifo et al., 1993b; Restifo et al., 1996). C'est pourquoi aujourd'hui de nombreux protocoles cliniques combinent l'injection d'antigènes de tumeurs avec des cytokines tels que l'IFN- γ afin de maintenir ou augmenter l'expression des molécules HLA.

Par ailleurs, de multiples antigènes de tumeur peuvent être inclus dans les vaccins dans le but d'empêcher l'évasion de variants antigéniques ou la perte d'expression d'antigènes. Ceci suppose naturellement que les cellules tumorales ne diminuent pas l'expression de tous les antigènes associés aux tumeurs en même temps. La surveillance de l'expression d'antigènes de tumeurs est ainsi un paramètre important à considérer pendant le traitement. En effet, toute modification majeure du profil d'expression par les lésions tumorales affectera le succès potentiel à long terme du vaccin.

I.3.2.b. Injections de cellules tumorales.

Une deuxième option vaccinale consiste à injecter des cellules tumorales irradiées. Ces vaccinations ont pour but d'immuniser le patient contre tous les antigènes exprimés de manière endogène par sa tumeur. Cette stratégie exige une quantité raisonnable de biopsie de tumeur fraîche dans le but d'établir une lignée cellulaire autologue. Or quelques patients ont de petites lésions et s'avèrent inopérables. C'est particulièrement vrai chez des individus atteints de cancer du poumon où les tumeurs répandues dans la cavité thoracique sont le plus souvent inaccessibles. De plus, le contenu en cellules tumorales est variable et les biopsies sont très fréquemment contaminées par des fibroblastes et/ou des leucocytes d'infiltration. En outre, la viabilité des cellules tumorales peut également poser problème. En effet, après des procédures de digestion enzymatique et de dissection, beaucoup de cellules meurent en raison des manipulations physiques. Par conséquent, ce qui semble être une lignée établie de cellules tumorales représente, dans beaucoup de cas, une population de cellules normales adhérentes tels des fibroblastes et/ou des MØ qui survivent aux procédures. C'est pourquoi il est absolument impératif de caractériser entièrement les lignées cellulaires avant emploi. Il est, en effet, critique d'évaluer l'expression d'antigènes de tumeur, des molécules HLA ainsi que naturellement la viabilité de cellules. Récemment, Dillman et collaborateurs (Dillman et al., 2002) ont prouvé que des lignées cellulaires à court terme ne pourraient être produites que seulement dans 43% des cas dans une étude comprenant 125 patients atteints de cancer avec histologies variables. Des vaccins cellulaires autologues ont également été employés dans d'autres types histologiques de tumeur tels le carcinome rénal (McCune et al., 1990) ou le cancer colo-rectal (Vermorken et al., 1999) avec une certaine efficacité.

Toutefois, de nombreux cliniciens s'orientent désormais vers l'utilisation de vaccins cellulaires basés sur des lignées tumorales allogéniques en raison de leur disponibilité et de l'expression partagée de nombreux antigènes. De plus, l'utilisation de ces lignées cellulaires allogéniques réduit considérablement la variabilité à la fois entre les préparations vaccinales et entre les patients. Dans cette stratégie, il est une nouvelle fois primordial d'analyser les antigènes exprimés par les patients dans le but de s'assurer que précisément ces antigènes sont exprimés par la lignée tumorale choisie pour la conception du vaccin. Il est aussi important de vérifier que les molécules HLA entre la lignée cellulaire et le patient soient compatibles pour au moins un allèle, afin que des peptides antigéniques tumoraux soient correctement présentés.

Les caractéristiques de croissance, l'expression d'antigènes de tumeur et l'expression des molécules HLA sont des paramètres critiques dans le développement des vaccins allogéniques. Dans une étude récente, il a été démontré qu'un vaccin polyvalent de mélanome, préparé avec trois lignées cellulaires allogéniques, permettait l'initiation de réponses immunitaires cellulaires et humorales contre des antigènes de mélanome (Morton et al., 1992; Morton et al., 1993). Cependant, bien que ces résultats cliniques semblent prometteurs (Chan and Morton, 1998), l'utilisation de réactifs allogéniques pour l'immunothérapie reste sujette à caution. En effet, les cellules tumorales, tout en exprimant potentiellement des antigènes partagés, expriment également des molécules HLA de classe I et II allogéniques qui peuvent provoquer de puissantes réponses immunitaires. Ainsi, les cellules tumorales allogéniques constituant le vaccin peuvent être rapidement rejetées avant même que la réponse anti-tumorale n'ait eu le temps de se développer (réponse directe impliquant l'activation des lymphocytes T spécifiques vis-à-vis des antigènes HLA allogéniques exprimés à la surface des tumeurs).

Toutefois, une réponse allogénique (réponse indirecte impliquant l'apprêtement et la présentation des allo-antigènes HLA du donneur par les DC du receveur), peut se développer simultanément avec une réponse anti-tumorale. La réponse aux allo-antigènes peut alors fournir des niveaux supplémentaires de cytokines critiques et nécessaires pour le développement global d'une réponse anti-tumorale (effet by-stander). Ainsi plusieurs études suggèrent que la génération d'une réponse allogénique puisse être salutaire au développement global d'une réponse anti-tumorale (Newton et al., 2002).

Une autre approche consiste à modifier génétiquement les cellules tumorales (autologues ou allogéniques) afin que celles-ci puissent exprimer des éléments destinés à promouvoir la réponse immunitaire anti-tumorale (Nelson et al., 2000; Qian et al., 2002; Rosenberg, 1992; Tani et al., 2000; Yannelli et al., 1993). Ainsi, dans certains cas, des cytokines comme le TNF- α , le GM-CSF, l'IFN- γ ou l'IL-2, ont été utilisées pour faciliter le développement des réponses immunitaires. Ainsi, l'injection de cellules sécrétant de l'IL-2 chez des patients atteints de mélanome (Arienti et al., 1996; Haight et al., 2000) et/ou de neuroblastome (Ellem et al., 1997) ont mis en évidence des réponses cliniques significatives. Dans d'autres cas les cellules tumorales sont génétiquement modifiées afin que celles-ci expriment des molécules de co-stimulation comme le CD80 (Antonia et al., 2002; O'Rourke et al., 1997; Schadendorf et al., 2000). En utilisant un modèle murin de mélanome, Dranoff et collaborateurs (Dranoff

et al., 1993) ont analysé 10 gènes pour leur capacité à augmenter l'immunogénicité de cellules tumorales. Dans cette étude, de tous les gènes examinés, seul le GM-CSF avait la capacité d'induire une immunité anti-tumorale spécifique efficace et durable. Le GM-CSF a été mis en évidence pour la première fois grâce à sa capacité à stimuler la croissance et la différenciation des cellules hématopoïétiques d'origine myéloïde. Par ailleurs, des études suivantes ont montré que cette cytokine exerçait aussi des effets pléiotropiques sur le système immunitaire. D'une manière générale, il favorise la différenciation des DC et par conséquent la sensibilisation des lymphocytes T naïfs et l'obtention d'une réponse primaire.

Les premiers essais cliniques dans le mélanome ont montré que la sécrétion de GM-CSF par les TIL corrélait très étroitement avec des réponses cliniques significatives (Schwartzentruber et al., 1994). C'est en 1997 qu'a eu lieu la première utilisation d'un vaccin autologue de mélanome sécrétant du GM-CSF. Ce dernier permettait de générer des réactions immunitaires anti-tumorales associées à un avantage clinique partiel et provisoire (Ellem et al., 1997; O'Rourke et al., 1997). Un essai clinique de phase I étudiant l'activité biologique de ces vaccins a permis de mettre en évidence l'infiltration de lymphocytes T, de DC, de MØ et d'éosinophiles aux emplacements d'immunisation dans chacun des 21 patients évalués (Dranoff et al., 1997; Soiffer et al., 1998). Dans cette situation, il est possible de spéculer que les cellules de CD14+ recrutées à l'emplacement de la tumeur par des mécanismes inflammatoires soient stimulées par le GM-CSF localement sécrété, et subissent ainsi une différenciation vers les DC permettant la présentation d'antigènes de tumeurs aux lymphocytes T. En outre, des CTL spécifiques de tumeur ont pu être détectés après la vaccination.

Ce type de vaccins a également été utilisé dans des essais cliniques, notamment dans le carcinome rénal et dans le cancer de la prostate (Simons, 1997; Simons et al., 1997; Simons et al., 1999; Tani et al., 2000), et des réactions immunitaires semblables ont été observées. Ensemble, ces résultats démontrent la praticabilité et la sûreté de cette stratégie de vaccination, le niveau bas de la toxicité aux patients, et confirment l'activité biologique de ce réactif. Ainsi, le GM-CSF s'avère une cytokine particulièrement prometteuse pour la conception de vaccins génétiquement modifiés.

I.3.2.c. Injection de cellules dendritiques exprimant des antigènes de tumeurs.

Une approche d'immunothérapie active plus récente est basée sur l'utilisation de DC chargées en antigènes de tumeurs. Les DC sont des CPA professionnelles spécialisées dans l'initiation et la régulation de réponses immunitaires. En effet, dans beaucoup de cas, le problème inhérent en immunologie des tumeurs est la présentation insatisfaisante des antigènes aux précurseurs de lymphocytes T. Dès 1996, Inaba et collaborateurs ont rapporté dans un modèle de souris que des DC pulsées avec des antigènes de tumeur étaient capables d'induire des réponses anti-tumorales protectrices et de générer une immunité thérapeutique significative vis-à-vis de tumeurs pré-établies (Young and Inaba, 1996).

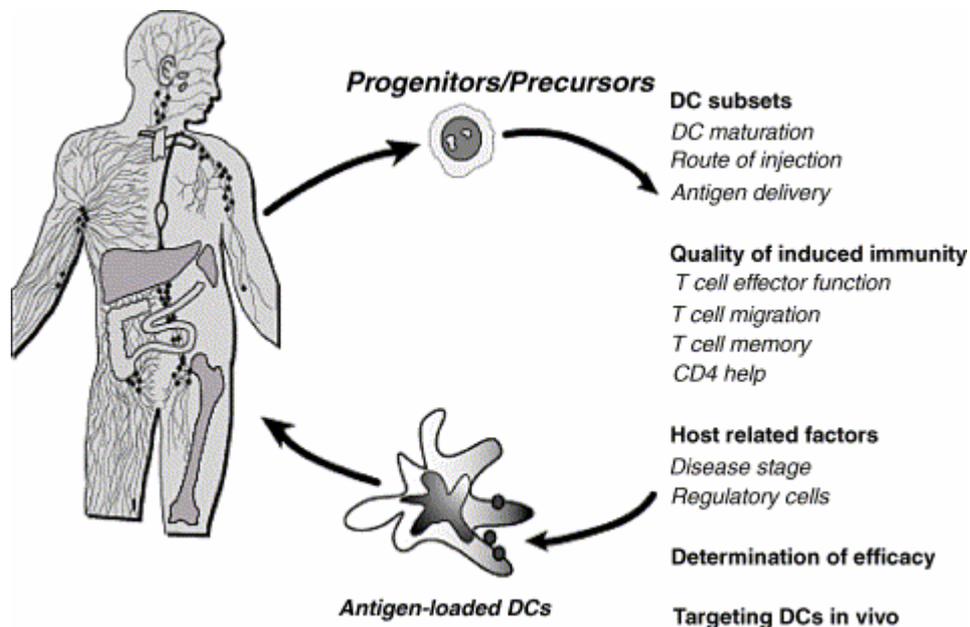


Figure 4 : Modèle de stratégie d'immunothérapie active
 Basée sur l'utilisation de DC comme vaccins anti-tumoraux
 D'après S. Paczesny et al, 2003.

Comme le montre la figure 4, chez l'Homme, cette approche vaccinale consiste à récupérer des précurseurs de DC chez des patients, à les différencier dans un environnement exempt de toute substance immunosuppressive, et à les pulser avec le ou les antigènes tumoraux appropriés avant injection. Ainsi, un nombre important d'essais cliniques a utilisé des DC exprimant d'antigènes de tumeurs comme vaccins chez l'Homme et quelques réponses immunologiques et cliniques ont pu être observées sans toxicité particulière. En effet, certaines études réalisées dans divers types de cancer comme le mélanome (Banchereau et al., 2001; De Vries et al., 2003; Jonuleit et al., 2001; Nestle et al., 1998; Schuler-Thurner et al., 2002), le lymphome (Hsu et al., 1996; Maier et al., 2003; Timmerman et al., 2002), le myélome multiple (Wen et al., 2002), le cancer de la prostate (Fong et al., 2001a; Fong et al., 2001b; Heiser et al., 2002), et le glioblastome (Kikuchi et al., 2004; Kikuchi et al., 2001; Yamanaka et al., 2003; Yu et al., 2004; Yu et al., 2001) suggèrent que l'injection de DC est capable d'induire des réactions immunitaires spécifiques chez l'Homme, dont certaines sont associées à des réponses cliniques (Tableau I).

Cependant, l'inconvénient majeur d'utiliser les DC comme vaccins, est le développement potentiel des réactions immunitaires contre des antigènes partagés à la fois par les cellules tumorales et les cellules normales. Ainsi, Ludewig et collaborateurs (Ludewig et al., 2000) ont rendu compte de l'induction de la maladies auto-immunes graves lors de protocoles d'immunothérapie basée sur l'injection de DC.

Type de Cancer	Type de DC	Antigène	Nbre de patients	Injection	Commentaires	Référence
Avancés et variés	PBDC Immatures	Peptide CEA modifié	12	IV	2 régressions tumorales.	(Fong et al., 2001).
Sein/Ovaire	MoDC Matures	Peptides Her-2/neu et MUC1	10	SC	Quelques réponses CTL détectables.	(Brossart et al., 2000a).
Tumeurs exprimant CEA	MoDC Immatures	Peptide CEA modifié	21	IV, ID	1 réponse mineure.	(Morse et al., 1999b).
Tumeurs exprimant CEA	MoDC Immatures	ARN CEA	7	IV, ID	Migration des DC dépendante de la voie d'injection.	(Morse et al., 1999a).
Colo-rectal	MoDC Immatures	ARN de tumeur autologue + KLH	15	IV	11 réponses KLH détectées.	(Rains et al., 2001).
Gastro-intestinal	MoDC Immatures	Peptide MAGE-3	12	IV	3 régressions tumorales mineures.	(Sadanaga et al., 2001).
Gliome	MoDC Matures	Fusion DC/cellules tumorales autologues	8	ID	2 réponses cliniques partielles.	(Kikuchi et al., 2001).
Gliome	MoDC Immatures	Peptides élués à partir de la tumeurs autologue	9	SC	4 réponses CTL détectables.	(Dudley et al., 2001).
Cancers hématologiques	PBDC Matures	Cellules tumorales irradiées	4	IV	1 réponse clinique transitoire.	(Fujii et al., 2001).
Lymphome	PBDC Immatures	Idiotype	4	IV, SC	4 réponses anti- tumorales détectées.	(Hsu et al., 1996).
Lymphome	PBDC Immatures	Idiotype	35	IV, SC	Réponses CTL et Ac observées.	(Timmerman et al., 2002).
Mélanome	CD34+ DC Matures	Peptides Melan- A, tyrosinase, gp- 100, MAGE-3, flu)+ KLH	18	SC	16 réponses aux peptides observées.	(Banchereau et al., 2001).
Mélanome	MoDC Immatures	Peptides tyrosinase et gp- 100	16	IV	5 réponses aux peptides observées.	(Lau et al., 2001).
Mélanome	MoDC Immatures	Peptides melan- A, gp-100 et tyrosinase	28	IV	2 réponses complètes, 1 partielle.	(Lotze et al., 1997).
Mélanome	CD34+ DC Matures	Peptides MAGE	14	IV	1 réponse complète.	(Mackensen et al., 2000).
Mélanome	MoDC Immatures	Peptides MAGE +KLH	16	Intranodal	5 réponses objectives.	(Nestle et al., 1998).
Mélanome	MoDC Immatures	Peptides Melan- A, gp-100	10	IV	1 réponse CTL détectable.	(Panelli et al., 2000).
Mélanome	MoDC Matures	Peptide MAGE3 + toxine tétanique	11	SC, ID, IV	8 réponses CTL détectables.	(Thurner et al., 1999).
Mélanome	MoDC Matures	Peptide MAGE3 , Flu + toxine	8	SC, IV	8 réponses CTL détectables.	(Schuler-Thurner et al., 2000).

Table I : Essais cliniques publiés utilisant les DC comme stratégie de vaccination.
 Abréviations : CEA : antigène carcino-embryonnaire; flu : influenza; ID : intra-dermique; IV :
 intraveineuse; KLH : Keyhole limpet haemocyanin; MoDC : DC dérivées de monocytes ;
 PBDC : DC du sang périphérique; SC : Sous-cutané.

Type de Cancer	Type de DC	Antigène	Nbre de patients	Injection	Commentaires	Référence
Mélanome	MoDC Immatures	Peptides élués à partir de la tumeur autologue	7	ID	Importante étude de la migration des DC.	(Thomas et al., 1999).
Mélanome	MoDC Immatures	Peptide MAGE1	3	ID	CTL trouvés au site d'injection.	(Mukherji et al., 1995), (Hu et al., 1996).
Myélome multiple	MoDC Immatures	Idiotype + KLH	6	IV	5 réponses cellulaires.	(Lim and Bailey-Wood, 1999).
Myélome multiple	PBDC Immatures	Idiotype +/- KLH	26	IV	4 réponses cellulaires.	(Liso et al., 2000).
Myélome multiple	PBDC Immatures	Idiotype + KLH	12	IV	2 réponses cellulaires.	(Reichardt et al., 1999).
Myélome multiple	DC issues de CD34+ Matures	Idiotype	11	SC	4 réponses cellulaires.	(Titzet et al., 2000).
Tumeurs solides infantiles	MoDC Immatures	Oncolysat cellulaire autologue	15	ID	1 réponse partielle.	(Geiger et al., 2001).
Prostate	PBDC Immatures	Protéine de fusion PAP+GMCSF	13	IV	9 réponses CTL.	(Burch et al., 2000).
Prostate	PBDC Immatures	Protéine de fusion PAP+GMCSF	31	IV	38 % réponses CTL.	(Burch et al., 2000).
Prostate	PBDC Immatures	PAP de souris recombinante	21	IV,ID	100 % réponses CTL détectables.	(Fong et al., 2001b).
Prostate	MoDC Immatures	Peptides PSMA	33	IV	Réponses observées significatives et durables.	(Tjoa et al., 1998), (Murphy et al., 1999b), (Murphy et al., 1999a), (Tjoa et al., 1997), (Tjoa et al., 1999), (Murphy et al., 2000).
Carcinome rénal	MoDC Matures	Oncolysat cellulaire + KLH	12	IV	Réponses CTL et Ac contre KLH détectables.	(Kugler et al., 2000).
Carcinome rénal	MoDC Matures allogéniques	Fusion DC/cellules tumorales auologues	17	SC	11 réponses détectables.	(Triozi et al., 2000).
Variées (Sein/mélanome)	MoDC Immatures	Tumeurs in situ	10	Intratumoral	Régressions tumorales chez 6 patients.	(Triozi et al., 2000).

Table I (suite): Essais cliniques publiés utilisant les DC comme stratégie de vaccination.
 Abréviations : CEA : antigène carcinoembryonnaire; flu : influenza; ID : intra-dermique; IV : intraveineuse; KLH : Keyhole limpet haemocyanin; MoDC : DC dérivées de monocytes ; PBDC : DC du sang périphérique; SC : Sous-cutané.

Plusieurs variables doivent être évaluées, incluant : 1) le type de DC à employer ; 2) le type d'adjuvant ; 3) le ou les cytokine(s) à administrer, et 4) la méthode de chargement d'antigènes de tumeurs, c'est à dire, peptides, lysats de tumeur, ARN, ADN, etc...

1.4. Biologie des cellules dendritiques

C'est Paul Langerhans, jeune étudiant en médecine berlinois, qui rapporta pour la première fois l'existence des DC au sein de l'épithélium de la peau en 1868 qu'il nomma cellules de Langerhans (LC) (Langerhans, 1868). Par la suite, ce n'est qu'en 1973 que les travaux de Ralph Steinman et Cohn ont permis de mettre en évidence, à partir de rates de souris, une population cellulaire similaire impliquée dans l'initiation de réponses immunitaires (Steinman and Cohn, 1973).

Pendant presque 20 ans, les DC devaient être isolées directement à partir des tissus pour être étudiées *in vitro*. Ce n'est qu'au début des années 1990 que la mise au point de systèmes de culture performants a permis la production de DC humaines à grande échelle, accélérant alors considérablement de cette manière l'étude de ces cellules et rendant possible leur utilisation clinique (Caux et al., 1992; Romani et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Il existe deux principales voies d'ontogenèse des DC qui génèrent deux populations : la voie myéloïde et la voie lymphoïde (Figure 5).

La voie myéloïde donne naissance aux LC trouvées dans l'épithélium stratifié de la peau et aux DC interstitielles trouvées dans tous les autres tissus (Figure 5). Ces deux sous-populations peuvent induire la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et produire de grande quantité d'IL-12. Toutefois, seules les DC interstitielles peuvent produire de l'IL-10 et induire la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétrices d'immunoglobulines (Caux et al., 1997; Caux et al., 1996). Bien qu'aucune fonction n'ait été formellement attribuée aux LC, certaines études semblent suggérer qu'elles soient particulièrement efficaces dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Ferlazzo et al., 1999; Mortarini et al., 1997).

La voie lymphoïde, quant à elle, inclut les DC plasmocytoides (pDC) qui sécrètent très rapidement de grande quantité d'IFN de type I en réponse à une infection virale (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). Les pDC agissent ainsi comme des membres de l'immunité innée et représentent la première barrière de protection contre l'expansion virale. De façon intéressante, ces cellules peuvent subséquemment se différencier en DC capables d'induire

des réponses immunitaires en agissant comme des membres de l'immunité adaptative (Kadowaki et al., 2000).

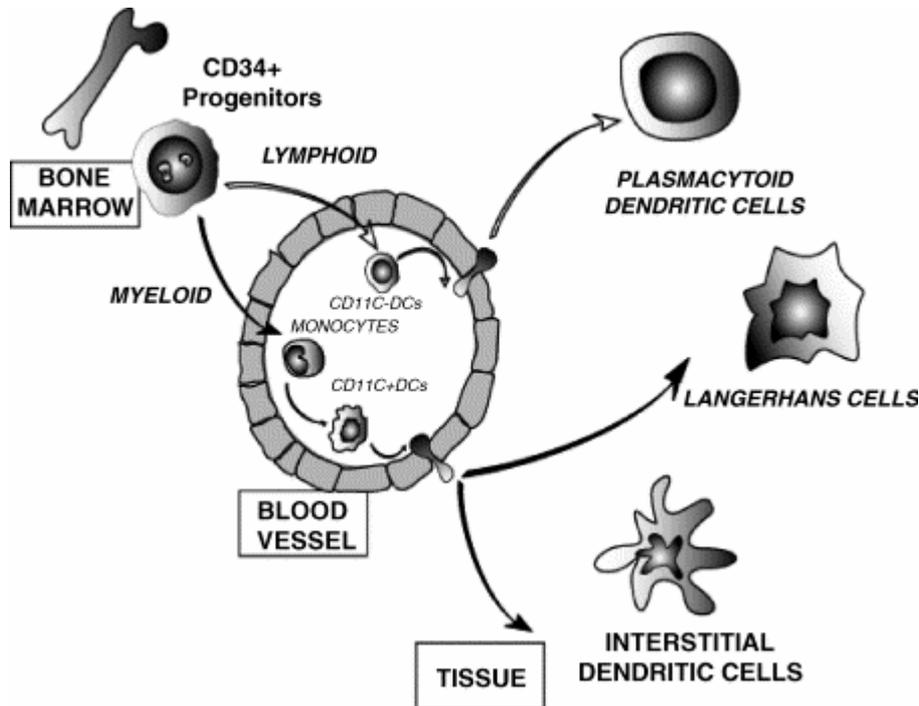


Figure 5 : Les différentes sous-populations de DC.
D'après S. Paczesny et al, 2003.

Les DC circulantes représentent moins de 1% des cellules mononucléées du sang (Banchereau et al., 2000). Elles sont dotées de plusieurs mécanismes spécialisés dans la capture de pathogènes tels l'endocytose via des récepteurs spécifiques (lectines, récepteurs aux Fc), la macropinocytose ou la phagocytose. Les protéines étrangères capturées sont ensuite apprêtées en peptides antigéniques pendant la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires (Mellman and Steinman, 2001). Les DC présentent alors les peptides aux lymphocytes T et complètent leur programme de maturation après avoir reçu des signaux des lymphocytes T CD4+ spécifiques vis-à-vis des antigènes présentés. Chacune des 3 sous-

populations de DC expriment une lectine membranaire qui leur est spécifique (Figdor et al., 2002).

Les LC expriment ainsi la Langerine qui intervient dans la formation des granules de Birbeck (Valladeau et al., 1999; Valladeau et al., 2000).

Les DC interstitielles expriment la molécule DC-SIGN qui peut se lier aux molécules (1) ICAM-1 exprimées à la surface des lymphocytes T facilitant ainsi les interactions entre le TCR et les complexes CMH/peptide ; (2) ICAM-3 exprimée par les cellules endothéliales permettant la migration des DC dans les tissus périphériques; (3) la protéine GP120 du virus HIV favorisant de cette manière le transport du virus jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (Geijtenbeek et al., 2000a; Geijtenbeek et al., 2000b).

Les pDC, quant à elles, expriment à leur surface les molécules BDCA2 et BDCA4 qui sont impliquées dans le contrôle de la sécrétion de l'IFN de type I (Dzionek et al., 2000; Dzionek et al., 2001). Il semblerait ainsi que l'expression différentielle de ces molécules de surface permettrait au système immunitaire de cibler les différentes sous-populations de DC en fonction du type de réponse requis.

I.4.1. Origine des DC et génération in vitro et in vivo

Dans le sang, il existe au moins 2 sous-populations de précurseurs de DC identifiées chez l'Homme et issues des cellules souches CD34+ de la moelle osseuse :

- les précurseurs CD14+CD11c+CD123(IL-3R)low,
- les précurseurs CD14-CD11c-CD123(IL-3R)+

Les cellules CD11c+CD123low sont les DC myéloïdes (DC interstitielles et LC) qui orientent la réponse immunitaire vers une production de cytokines de type Th1 (DC1) alors que les cellules CD11c-CD123+ ont des caractéristiques morphologiques très similaires aux plasmocytes et correspondent aux DC lymphoïdes ou plasmocytoïdes (pDC) qui orientent une réponse Th2 via la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 mais aussi une réponse immunitaire anticorps (DC2).

In vivo, la capacité d'un précurseur à donner naissance à une DC ou à un MØ dépend étroitement de l'environnement qu'il rencontre après avoir traversé la barrière endothéliale. Ainsi, il a été montré que des interactions entre monocytes et fibroblastes conduisait à une augmentation de la sécrétion d'IL-6 par les fibroblastes favorisant la différenciation des monocytes en MØ. En revanche, les mastocytes sécrétant du GM-CSF, de l'IL-4, de l'IL-13 et du TNF- α contribuent à la différenciation des monocytes en DC. Les DC interstitielles issues de monocytes et les LC à un stade mature sont équivalentes en terme de capacité à stimuler les lymphocytes T naïfs, mais seules les DC interstitielles semblent induire la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et exprimer de l'IL-10. De plus, les DC interstitielles sont connues pour être 10 fois plus efficaces dans la capture d'antigène.

In vitro, les DC humaines peuvent être générées à partir des cellules souches CD34+ de la moelle osseuse ou à partir des monocytes du sang sous l'influence de différentes combinaisons de cytokines comme le TNF- α , le GM-CSF, IL-3, FLT3 ligand, CD40L, SCF ou TGF- β . Ces cellules ont alors les caractéristiques des DC immatures et peuvent être maturées par des stimuli pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1, le LPS, l'engagement du CD40 ou le MCM. Les DC humaines sont caractérisées par l'expression de surface de grandes quantités de molécules de CMH de classe II et l'absence de CD14 (marqueur d'origine), CD3 (cellules T), CD19, CD20 et CD24 (cellules B) ; CD56 (cellules NK) et CD66b (granulocytes). Le phénotype des DC varie avec les différents stages de maturation et de différenciation. Le marqueur CD1a est préférentiellement exprimé à la surface des DC immatures myéloïdes. Les anticorps anti-CD83 réagissent avec les DC matures qui expriment aussi de hauts niveaux de molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) et de molécules d'adhésion comme CD11a, CD11c, CD50, CD54, CD58 et CD102.

I.4.1.a. Génération de DC à partir des monocytes du sang

Il y a déjà 10 ans que Knight et ses collaborateurs (Knight et al., 1986) avaient rapporté la description de monocytes, qui après purification, avaient revêtu un aspect dendritique et voilé. Il est désormais bien établi que des monocytes cultivés en présence de GM-CSF et IL-4 ou IL-13 ou en présence d'IL-15 peuvent se différencier en DC exprimant le marqueur CD1a (Cella et al., 1997; Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Saikh et al., 2001). Les DC issues de monocytes sont dotées d'un phénotype immature avec une faible expression des

molécules de co-stimulation et la concentration de molécules de CMH de classe II à l'intérieur des compartiments intra-cytoplasmiques.

I.4.1.b. Génération de DC à partir des cellules souches hématopoïétiques CD34+

La coopération du TNF- α avec le GM-CSF est critique pour la génération de DC myéloïdes (LC + DC interstitielles) à partir des cellule souches CD34+ *in vitro* (Caux et al., 1992). Après 8 jours de culture, l'addition du TNF- α au GM-CSF multiplie par 6 à 8 fois le nombre de DC. Après 12 jours, 50 à 80% des cellules expriment le marqueur CD1a. Par ailleurs, l'addition de SCF dans le milieu de culture peut multiplier de 3 à 6 fois l'expansion des cellules CD1a+. Ces cellules CD1a+ sont des DC présentant les caractéristiques suivantes : une morphologie dendritique typique, une forte expression des molécules de CMH de classe II, CD4, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86 et l'absence des récepteurs CD64/Fc γ RI et CD35/CDR1, la présence de granules de Birbeck, caractéristiques des LC, chez environ 20 % des cellules ; une très grande capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T naïfs et à présenter des antigènes solubles à des clones CD4+ (Caux et al., 1997). Les DC CD1a+ sont CD45RO+ et expriment les antigènes myéloïdes CD13 et CD33. Dans ce système, les effets du TNF- α sur le développement des DC semble être gouvernés par le récepteur TNF-R1 (Lardon et al., 1997). En outre, il a été montré que dans des milieux de culture en absence de sérum, l'addition du TGF- β permettait la génération de LC exprimant les granules de Birbeck, Lag et E-cadhérine (Strobl et al., 1996). Les pDC, quant à elles, peuvent être obtenues à partir des cellules CD34+ sous l'influence de la combinaison TNF- α , IL-3 ou FLT3 Ligand, TPO (Chen et al., 2004) (Figure 6).

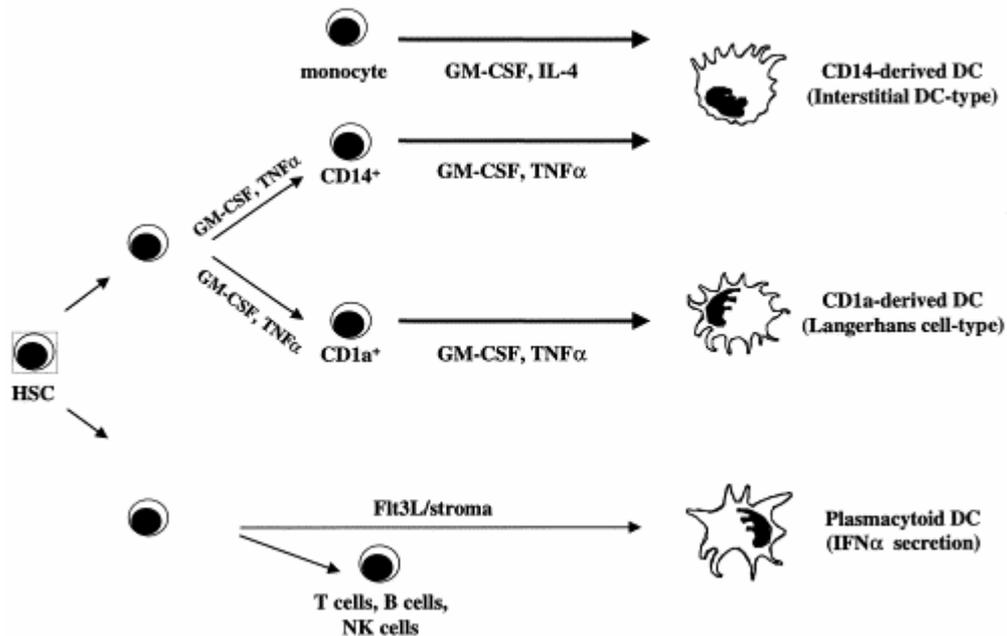


Figure 6 : La génération *in vitro* des différents types de DC dépend des combinaison de cytokines utilisées.
D'après F. Brière et al, 2002.

I.4.2. Capture des antigènes

Face à la diversité du matériel antigénique disponible, les DC expriment divers récepteurs assurant la reconnaissance des structures exogènes, le recrutement des éléments du cytosquelette pour réaliser l'internalisation, la transduction de signaux en vue de réguler l'état de maturation et l'activité cellulaire. Les DC peuvent capturer des bactéries, virus, cellules mortes, protéines exogènes ou bien des complexes immuns via de nombreux mécanismes telles la phagocytose, l'endocytose et la pinocytose. Le mécanisme d'endocytose se distingue de la phagocytose par son indépendance vis-à-vis de récepteurs, ce qui en fait une internalisation non spécifique. Elles possèdent, en outre, une panoplie de récepteurs membranaires, dont un grand nombre sont impliqués dans les interactions cellulaires (Tableau II).

Classe de récepteur	Exemples	Ligands	Référence
Récepteur lectin-like de type C	DC-SIGN (CD209)	Virus (HIV, Dengue, Ebola), mycobactéries	(Cambi and Figdor, 2003), (Bonifaz et al., 2002),
	MMR (MRC1)	Molécules mannosylées	
	DEC-205 (LY75)	?	
	BDCA-2 (CLECSF11)	?	
	Langérine	?	
	Dectine-1	β -glucanne	
Récepteurs Fc	Fc γ RI (CD32)	Complexes immuns et cellules opsonisées	(Rafiq et al., 2002)
	Fc γ RII (CD64)		
Intégrines	$\alpha_v\beta_5$	Cellules apoptotiques	(Albert et al., 1998a)
	$\alpha M\beta_2$ (CD11b/CD18, CR4)	Antigènes opsonisés (via iC3b), bactéries	
	$\alpha X\beta_2$ (CD11c/CD18, CR4)	Antigènes opsonisés (via iC3b)	
Récepteurs d'épuration (SR)	CD36	Cellules apoptotiques	(Peiser et al., 2002), (Albert et al., 1998a), (Delneste et al., 2002)
	LOX-1	Complexes HSP/peptide	
Autres récepteurs	CD91	Complexes HSP/peptide	(Basu et al., 2001)
	Aquaporines	Fluides	

Table II : récepteurs de capture d'antigènes exprimés par les DC. Abréviations : MMR : macrophage mannose receptor; CR : complement receptor.

Bien qu'étant des CPA professionnelles, les DC présentent une capacité de phagocytose faible comparée à celle des M \emptyset . Elles sont capables d'ingérer des particules relativement larges comme des billes de latex, des corps apoptotiques et même des parasites intracellulaires (Austyn, 1996). Par ailleurs, grâce au processus de macropinocytose, les DC ont la propriété de concentrer des substances extracellulaires solubles à l'intérieur de vacuoles cytoplasmiques (Sallusto et al., 1995). La capture d'antigènes par les DC peut également intervenir via la formation de complexes immuns (Harkiss et al., 1990). Enfin, les DC expriment des récepteurs membranaires composés de lectines comme le récepteur au mannose et la molécule DEC-205 (Jiang et al., 1995; Sallusto et al., 1995). Après reconnaissance de leurs ligands de nature glucidique, ces molécules capturent l'antigène et le transfèrent jusqu'aux compartiments intra-cytoplasmiques riches en molécules de CMH de classe II, facilitant ainsi la présentation aux lymphocytes T CD4+. Ces lectines exprimées à la surface des DC contribuent vraisemblablement à l'internalisation d'antigènes d'origine bactérienne qui présentent un profil de glycosylation différent de celui rencontré chez les mammifères soulignant ainsi leur rôle primordial en tant que première ligne de défense dans la reconnaissance des antigènes du non-soi. Les antigènes de nature lipidique exprimés par les

pathogènes ou les tissus du soi sont présentés par les DC aux lymphocytes T sur les molécules CD1 qui sont structurellement similaires aux molécules de CMH de classe I mais plutôt spécialisées dans la fixation de lipides. L'apprêtement des antigènes lipidiques sur les molécules de CMH de classe I est assurée par des compartiments intracellulaires spécialisés.

I.4.3. Apprêtement et présentation croisée d'antigènes exogènes

Il existe une voie spécialisée permettant l'acquisition d'antigènes issus de cellules infectées ou anormales par les DC qui initient ainsi la génération de réponses immunitaires restreintes au CMH de classe I (Albert et al., 1998b; Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995). Cette voie permettant la présentation d'antigènes exogènes dans un contexte de CMH de classe I est appelée « présentation croisée ». Il n'y a désormais aucun doute quant à l'identité précise des cellules douées d'activité de présentation croisée, ce sont clairement des CPA d'origine hématopoïétique (c'est à dire; DC et MØ). Cependant, les mécanismes cellulaires gouvernant la présentation croisée d'antigènes exogènes par les DC restent encore obscurs (Ackerman and Cresswell, 2004). Afin d'être présentés aux lymphocytes T CD8+, les antigènes exogènes doivent être tout d'abord internalisés par les DC puis transférés des compartiments endocytiques jusqu'au réticulum endoplasmique (ER) qui est l'emplacement classique du chargement des peptide antigéniques sur les molécules de CMH de classe I.

De récentes observations semblent indiquer que le phénomène de présentation croisée n'est sensible ni à la chloroquine ni à des inhibiteurs de la protéolyse lysosomale. Il est en revanche affecté par la Brefeldine A et par des inhibiteurs du protéasome suggérant ainsi que la protéolyse cytoplasmique est la principale source de génération de peptides antigéniques dans la voie de la présentation croisée. Afin que les antigènes exogènes soient apprêtés, ils doivent donc être rétro-transloqués vers le cytoplasme juste après l'endocytose. Le transfert de ces antigènes jusqu'au cytoplasme n'est vraisemblablement pas dû à la désintégration des vésicules d'endocytose elles-mêmes, car les larges particules non dégradables ne peuvent atteindre le cytoplasme. La rétro-translocation des antigènes vers le cytoplasme et leur dégradation subséquente est une propriété bien établie du ER grâce au complexe protéique sec61.

Des études récentes de protéomique ont révélé que les phagosomes contenaient des éléments protéiques comme la calnexine et la calréticuline qui sont pourtant supposés résider exclusivement au sein du ER (Garin et al., 2001). C'est grâce aux travaux de l'équipe de Michel Desjardins que l'on sait désormais que lors des étapes précoces de phagocytose chez les MØ, la membrane plasmique fusionne avec la membrane du ER afin de former une vésicule d'endocytose puis un phagosome précoce (figure 7). Bien que les auteurs n'aient pas formellement investigué le sujet, ils ont raisonnablement proposé que le recrutement de la membrane du ER pouvait être un mécanisme potentiel par lequel les protéines extracellulaires auraient accès au phénomène de présentation croisée.

En effet, en utilisant des billes de latex comme substrats de phagocytose pour des DC murines, Guernonprez et collaborateurs ont montré qu'à l'instar des MØ, les phagosomes précoces des DC fusionnent avec les membranes du ER et permettent de ce fait le recrutement de toute la machinerie de chargement des peptides sur les molécules CMH de classe I (TAP, calréticuline, tapasine et Erp57) (Guernonprez et al., 2003). Ainsi, lorsque les billes de latex sont chargées avec un antigène, les auteurs furent capables de détecter la diffusion d'antigènes jusqu'au cytosol et la formation de complexes CMH-peptide spécifiques au sein des phagosomes.

De même, Ackerman et collaborateurs, en utilisant une lignée de DC humaine et une méthodologie quelle que peu différente, ont confirmé que les phagosomes disposaient de la machinerie complète de chargement de peptides sur les molécules CMH de classe I, soulignant ainsi que les phagosomes étaient des organelles intracellulaires indépendants et compétents pour former des complexes CMH/peptide (Ackerman et al., 2003).

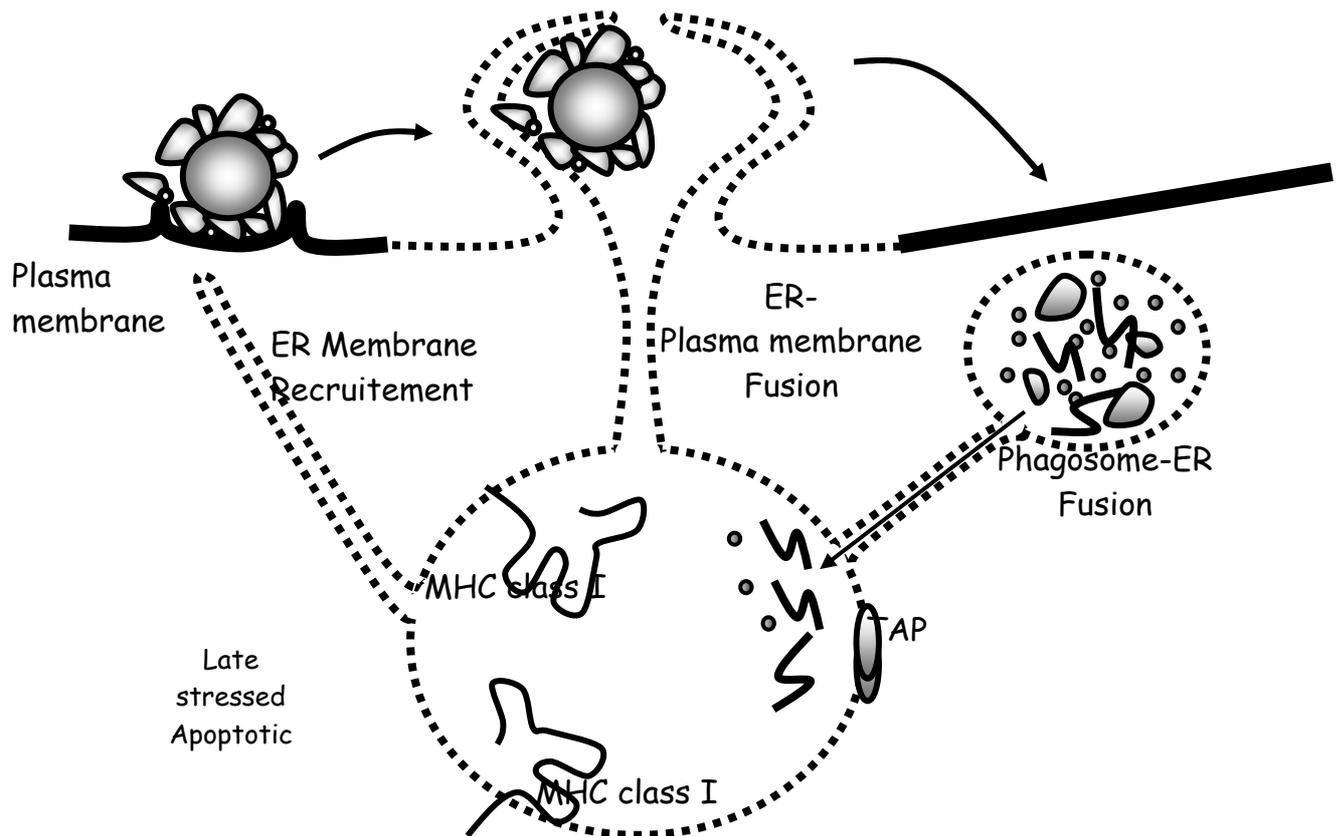


Figure 7 : Phagocytose médiée par le ER avec possibilité de chargement des peptides antigéniques sur les molécules CMH de classe I.

I.4.5. Activation, maturation et migration des DC

Les DC proviennent de la moelle osseuse et résident au repos à un stade immature dans les tissus non lymphoïdes où elles capturent et apprêtent efficacement l'antigène (Banchereau and Steinman, 1998; Steinman et al., 1999). Sous l'influence d'une stimulation par divers agents comme des bactéries (Bauer et al., 2001; De Smedt et al., 1996; Sparwasser et al., 1998; Suri and Austyn, 1998), des cytokines pro-inflammatoires (Jonuleit et al., 1997; Lee et al., 2002), de l'ARN double brin (Cella et al., 1999; Verdijk et al., 1999) ou l'engagement du CD40 (Mackey et al., 1998; Morse et al., 1998), les DC subissent un processus de maturation qui a pour conséquence l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation et la capacité pour celles-ci de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles stimulent les lymphocytes T naïfs.

La maturation est le stade terminal de différenciation qui transforme les DC en cellules spécialisées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Elle est caractérisée par une sévère perte des capacités de phagocytose, le développement d'extensions

cytoplasmiques, la migration vers les organes lymphoïdes secondaires et un potentiel accru des capacités de stimulation des lymphocytes T. Les DC matures expriment un nombre de marqueurs caractéristiques comme la molécule CD83 impliquée dans le développement des lymphocytes T CD4⁺ et des interactions intercellulaires (Fujimoto et al., 2002; Lechmann et al., 2002). De même, pour la molécule DC-LAMP, une protéine spécifique des DC exprimée dans les lysosomes. Le processus de maturation des DC est induit par des agents pathogènes ou des molécules du soi lorsque ces dernières sont associées à une réaction inflammatoire ou à une blessure tissulaire. Ces stimuli sont souvent collectivement apparentés aux signaux de danger (Matzinger, 2002). Les signaux de maturation agissent sur les DC via de récepteurs tels ceux du CD40L, du TNF- α , de l'IL-1 ou de l'IFN- α . Les produits microbiens et les molécules sécrétées par les tissus du soi endommagés transmettent des signaux de maturation par l'intermédiaire des Toll-like récepteurs (TLR), des récepteurs trans-membranaires exprimés par les DC et d'autres types cellulaires apparentés à la protéine Toll chez la drosophile (Takeda et al., 2003). Il y a 11 TLR connus jusqu'à aujourd'hui, chacun ayant un niveau d'expression différent et chacun reconnaissant différentes séries de molécules. Chez l'homme, les DC myéloïdes expriment les TLR 1 à 5 et, selon la sous-population de DC, les TLR 7 et 8. Les pDC humaines expriment les TLR 1, 7 et 9 (Hornung et al., 2002; Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001). Certains de ces TLR agissent à la surface membranaire, tandis que d'autres sont trouvés dans les endosomes et sont vraisemblablement activés après capture et internalisation des pathogènes ou de leur produits de dégradation.

La signalisation est induite par la molécule adaptatrice MyD88 qui recrute d'autres molécules dans une voie impliquant l'activation de NF- κ B et autres MAP kinases, permettant l'initiation de la transcription des gènes codant pour des médiateurs de l'inflammation comme le TNF- α , IL-1 ou IL-6 (Kopp and Medzhitov, 2003). La stimulation de certains de ces TLR peut induire des voies de signalisation additionnelles et indépendantes de la protéine MyD88 (Kopp and Medzhitov, 2003). Chez les DC, les voies de signalisation distinctes peuvent influencer l'orientation de la direction des réponses T (Agrawal et al., 2003). Des agonistes des TLR, peuvent donc être utilisés pour cibler des sous-populations afin qu'elles induisent les réponses T désirées.

Après maturation, les DC développent une habilité amplifiée à exprimer des complexes CMH/peptide de classe I (Guermonprez et al., 2002) et II (Trombetta et al., 2003). La maturation est également associée à l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et d'adhésion impliquées dans la formation de la synapse immunologique (figure

8). Elle induit aussi la sécrétion de cytokines qui sont critiques pour la détermination de la nature de la réponse immunitaire. Un autre effet important conséquent de la maturation est la sécrétion de chémokines qui recrutent les monocytes, DC et des sous-populations de lymphocytes T spécifiques jusqu'à l'environnement local.

La capacité des DC à migrer vers les ganglions lymphatiques locaux est régulée par l'expression de différents récepteurs aux chémokines (Adema et al., 1997; Dieu et al., 1998; Foti et al., 1999; Ngo et al., 1998; Sallusto et al., 1998; Sallusto et al., 1999; Sozzani et al., 1998; Yanagihara et al., 1998). L'accumulation de précurseurs circulants de DC, qui expriment de hauts niveaux de CCR6, un récepteur pour MIP3- α au sein des épithéliums et des tumeurs est associée à la production de cette cytokine par ces cellules. MIP3- α semble être la chémokine la plus puissante dans la régulation de la migration des DC dans les tissus. Les DC immatures peuvent produire des chémokines inflammatoires comme MIP1- α , MCP1, MCP2 et MCP4 (Brossart et al., 2000b) et exprimer leurs récepteurs spécifiques tels CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 et CXCR1. En revanche, au cours de la maturation, les DC diminuent l'expression de ces chémokines et de leurs récepteurs et augmentent l'expression du récepteur CCR7. Ainsi, les DC acquièrent la sensibilité à l'ELC (MIP-3 β) et SLC (6cKine) qui sont des chémokines régulant le trafic des DC vers les vaisseaux lymphatiques producteurs d'ELC et donc vers les organes lymphoïdes secondaires. Les DC pénétrant dans les ganglions lymphatiques sont ensuite dirigées par un gradient des chémokines vers les aires paracorticales et commencent à sécréter à leur tour des chémokines comme DC-CK1 et MDC qui attirent par chimiotactisme les lymphocytes T naïfs et mémoires. Dès le contact avec les lymphocytes T, les DC reçoivent des signaux additionnels de maturation fournis grâce aux interactions CD40/CD40L, RANK/TRANSCENDANCE, 41BB/41BBL ou OX40/OX40L, qui aide à la maturation terminale (Figure 8). Après l'interaction avec les cellules T, les DC meurent par apoptose.

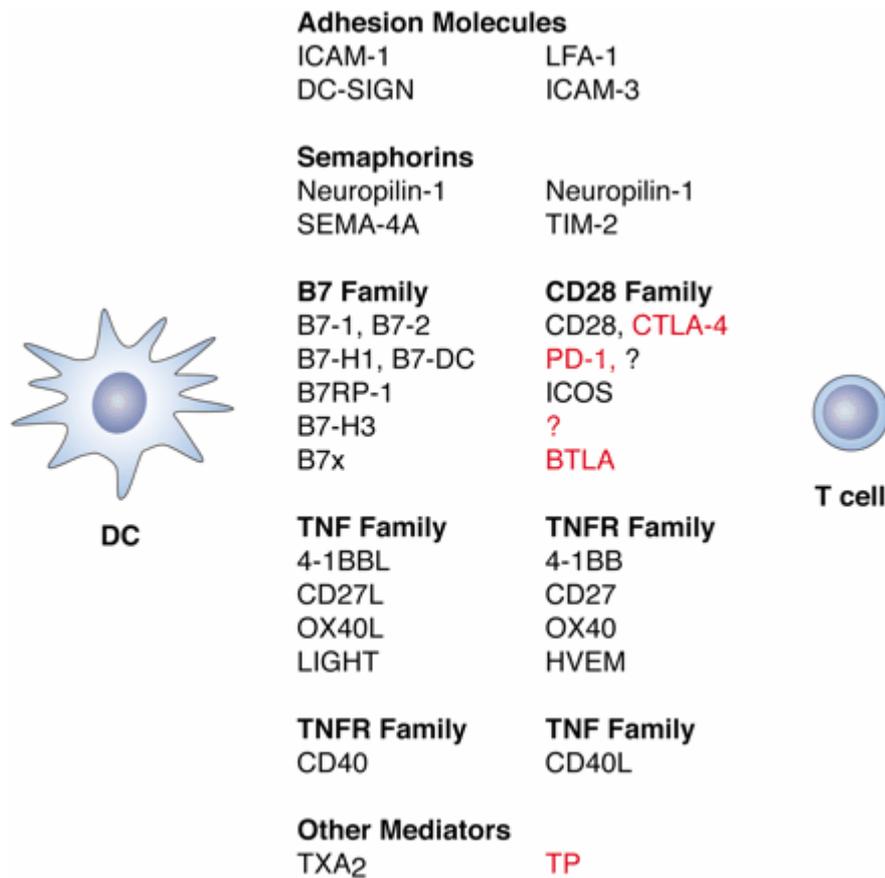


Figure 8 : Molécules impliquées dans la formation de la synapse immunologique entre DC et lymphocytes T
D'après DW. O'Neill et al, 2004.

I.4.6 Interactions des DC avec les lymphocytes T

Les DC initient des réponses T cellulaires au sein des organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions, la rate ou les tissus lymphoïdes (Bousso and Robey, 2003; Miller et al., 2002; Stoll et al., 2002). L'induction efficace et fonctionnelle des lymphocytes T naïfs par les DC se manifeste grâce à leur expansion clonale et leur différenciation en cellules mémoires et en cellules effectrices productrices de cytokines. L'amplitude d'une réponse immunitaire dépend de nombreux facteurs comme la concentration d'antigènes présentés par les DC, l'affinité du TCR vis-à-vis du complexe CMH/peptide présenté, le niveau de maturation des DC et de la nature du stimulus de maturation (Gett et al., 2003). Ainsi, la stimulation des lymphocytes T par les DC immatures conduit à une prolifération cellulaire initiale mais d'une

durée de vie très courte, alors que la stimulation des lymphocytes T par des DC matures induit une durée de vie prolongée des cellules T et leur différenciation vers des cellules effectrices et mémoires (Gett et al., 2003). De récentes observations indiquent que l'aide apportée par les lymphocytes T CD4⁺ au moment du priming est nécessaire pour générer des lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003). Cet effet est assuré par des interactions entre CD40 et CD40L entre les DC et les lymphocytes T CD4⁺ (effet licensing) (Schoenberger et al., 1998). D'autres molécules exprimées à la surface des lymphocytes T sont également impliquées dans l'induction de réponses T mémoires (Croft, 2003). C'est le cas des membres de la superfamille des récepteurs au TNF- α comme le OX40 et 41BB qui sont critiques dans l'initiation de réponses immunitaires (Bukczynski et al., 2004; Croft, 2003; Lee et al., 2003; Rogers et al., 2001; Wiethe et al., 2003). Les DC interagissent aussi avec les lymphocytes B et les cellules du système immunitaire inné.

Les DC myéloïdes activées peuvent induire la prolifération des lymphocytes B et la différenciation plasmocytaire via la production de molécules d'activation et de survie comme BAFF et APRIL (Balazs et al., 2002; Litinskiy et al., 2002; Mackay et al., 2003).

Les pDC peuvent aussi promouvoir la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes via la sécrétion d'IFN- α/β et d'IL-6 (Jego et al., 2003).

Les DC peuvent activer et induire l'expansion de cellules NK par des mécanismes encore non élucidés. Les cellules NK activées peuvent tuer les DC immatures mais non les DC matures et peuvent induire des réponses T CD8⁺ protectrices (Ferlazzo and Munz, 2004; Mocikat et al., 2003). Enfin, les DC présentant le glycolipide α -galactosylcéramide sur le CD1d peut stimuler les NK à produire de l'IFN- γ et promouvoir la résistance des tumeurs (Fujii et al., 2003). Les cellules NK activées peuvent aussi induire rapidement la maturation des DC et directement interagir avec elles pour amplifier les réponses T CD4⁺ et T CD8⁺ (Fujii et al., 2003; Hermans et al., 2003).

La présentation d'antigènes par les DC immatures est considérée pour être une voie importante par laquelle la tolérance aux antigènes du soi est maintenue. Les antigènes ciblés *in vivo* par les DC immatures peuvent induire une tolérance via une prolifération abortive et l'anergie de lymphocytes spécifiques d'antigènes, alors que la fourniture simultanée de

stimuli de maturation de DC induit une réponse T effectrice (Bonifaz et al., 2002; Probst et al., 2003; Steinman et al., 2003). Les DC immatures peuvent aussi promouvoir la tolérance via l'induction de lymphocytes T régulateurs CD4⁺ et CD8⁺ qui suppriment la réponse immunitaire effectrice par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 ou le TGF- β (Dhodapkar et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Jonuleit and Schmitt, 2003). Ceci est en opposition aux lymphocytes T CD4⁺ régulateurs naturels produits dans le thymus, qui expriment de manière constitutive le CD25 car les molécules CTLA4 et FoxP3 exercent leur effet immunosuppresseur d'une manière intercellulaire dépendante (Bach, 2003; Jonuleit et al., 2000; Probst et al., 2003; Roncarolo et al., 2001; Sakaguchi, 2003). Les DC matures peuvent inhiber ces T régulateurs via la production d'IL-6 (Pasare and Medzhitov, 2003). L'expression du CD40 à la surface des DC peut être un facteur important pour déterminer si le priming des T aura pour conséquence l'immunité ou la tolérance médiée par les T régulateurs. En effet, les DC de souris déficientes en CD40 et exposées à un antigène empêche le priming des lymphocytes T et induit la prolifération de cellules T régulatrices sécrétrices d'IL-10 (Martin et al., 2003).

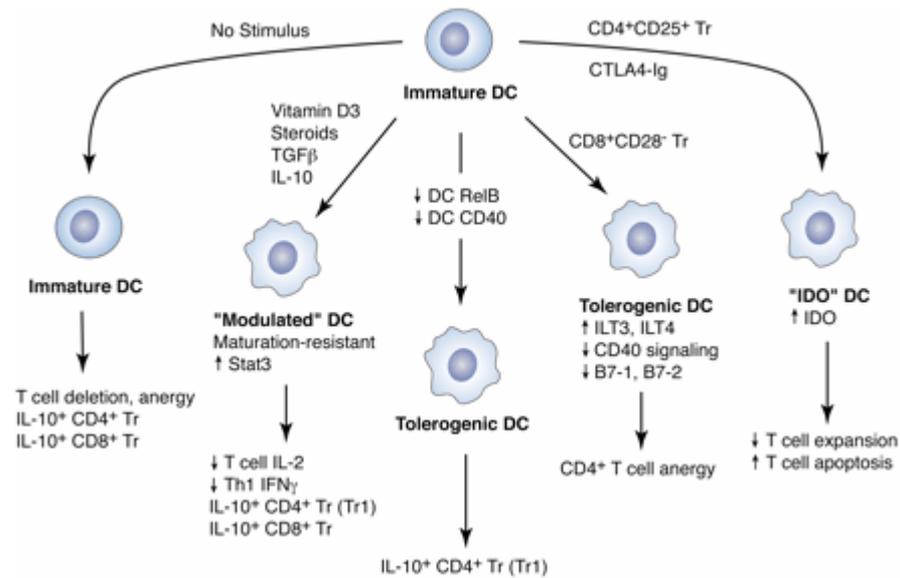


Figure 9: Exemples de voies donnant naissance à des DC tolérogènes. D'après DW. O'Neill et al, 2004.

Les DC peuvent être rendues tolérogènes par un certain nombre de mécanismes. Chez l'homme, une sous-population de DC dérivées de monocytes exprime l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui inhibe la prolifération des lymphocytes T et induit la mort des cellules T (Munn et al., 2002). L'IDO peut être induite par la fixation des molécules de la famille B7 par CTLA-4 (Fallarino et al., 2003; Mellor et al., 2003). Un grand nombre de DC exprimant l'IDO est trouvé dans les ganglions lymphatiques drainant les tumeurs suggérant que celles-ci sont impliquées dans l'incapacité des tumeurs à répondre immunologiquement chez les patients atteints de cancer (Munn et al., 2002). Les DC peuvent être aussi rendues tolérogènes via les cellules T régulatrices CD8⁺ CD28⁻ qui augmentent l'expression des récepteurs inhibiteurs à la surface des DC et inhibe l'expression de B7.1 et B7.2 induite par l'engagement du CD40L (Chang et al., 2002). Enfin, les DC peuvent être rendues tolérogènes *in vitro* en les cultivant en présence de TGF- β , IL-10, vitamine D3 ou corticostéroïdes (Wakkach et al., 2003) (Figure 9). L'activité de Stat3 apparaît également critique dans l'induction d'une tolérance spécifique vis-à-vis d'un antigène. La molécule Stat3 est activée par phosphorylation d'une tyrosine suite à une exposition des DC à l'IL-10 ou d'autres facteurs produits par les tumeurs. La sur-expression de Stat3 par les DC a pour conséquence l'inhibition de réponses T spécifiques d'antigènes (Cheng et al., 2003).

1.5. Les cellules mortes en tant que sources d'antigènes de tumeurs.

Parmi les stratégies de chargement des DC en antigènes de tumeurs, l'utilisation des cellules mortes (c'est à dire cellules apoptotiques et/ou nécrotiques) offre des possibilités intéressantes. En effet, cette approche n'exige pas l'identification et la caractérisation préalable des antigènes exprimés par la tumeur et, grâce à la phagocytose des cellules mortes par les DC, les peptides antigéniques ont accès aux deux voies de présentation de CMH de classe I (présentation croisée) et II, favorisant ainsi potentiellement une réponse immunitaire diversifiée impliquant à la fois les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺. De tels avantages augmentent la possibilité de surmonter les déficiences inhérentes en présentation d'antigènes et suggèrent de cette manière la faisabilité de déclencher une réponse immunitaire contre des tumeurs médiocrement immunogènes.

Aussi, les cellules tumorales apoptotiques et/ou nécrotiques s'avèrent donc probablement une des sources d'antigènes les plus attrayantes et ont été le sujet d'intenses investigations pendant les 5 dernières années. Ainsi, nous et d'autres groupes avons d'ores et déjà rapporté la pertinence de l'utilisation de vaccins basés sur des DC ayant phagocyté des cellules tumorales apoptotiques ou nécrotiques *in vitro* (Bérard et al., 2000; Hoffmann et al., 2000; Jenne et al., 2000; Kurokawa et al., 2001; Neidhardt-Berard et al., 2004; Schnurr et al., 2001; Spisek et al., 2002; Wen et al., 2002) et *in vivo* (Asavaroengchai et al., 2002; Fields et al., 1998; Goldszmid et al., 2003; Henry et al., 1999; Masse et al., 2002; Scheffer et al., 2003). En outre, de nombreux essais pré-cliniques et cliniques ont fourni des résultats très prometteurs chez des patients atteints de diverses maladies telles la leucémie (Lee et al., 2004), le lymphome (Maier et al., 2003), le mélanome (Nagayama et al., 2003; Nestle et al., 1998; Vilella et al., 2004), le carcinome rénal (Gitlitz et al., 2003; Holtl et al., 2002), le gliome (Yamanaka et al., 2003) et même des maladies tumorales infantiles (Geiger et al., 2000; Geiger et al., 2001).

Un paramètre critique pour l'usage de tels vaccins dans des stratégies d'immunisation active est la maturation des DC, car seules les DC matures ont la capacité de stimuler efficacement les lymphocytes T CD8⁺ naïfs et de polariser les lymphocytes T CD4⁺ vers la sécrétion de cytokines de type Th1 (Schuler-Thurner et al., 2002). Il s'avère donc impératif

d'identifier les stimuli qui permettent un déclenchement efficace du programme de maturation des DC lorsque celles-ci sont chargées avec ces diverses préparations de cellules mortes.

Or, il existe des désaccords considérables quant au réel effet des corps apoptotiques sur l'activation des DC. En effet, par opposition aux cellules nécrotiques, certaines études rapportent que les cellules subissant l'apoptose ne favorisent pas la maturation des DC (Buttiglieri et al., 2003; Clayton et al., 2003; Sauter et al., 2000) et même diminuent la sensibilité des DC à répondre à des stimuli exogènes (Stuart et al., 2002; Urban et al., 2001). Toutefois, dans d'autres études, l'exposition des DC à des cellules apoptotiques favoriserait le déclenchement spontané d'un programme de maturation, facilitant de ce fait la présentation croisée des antigènes aux lymphocytes T CD8+ sans exiger aucun signal additionnel (Chen et al., 2001b; Ishii et al., 2003; Ronchetti et al., 1999; Rovere et al., 1999; Rovere et al., 1998). Enfin, d'autres auteurs ont signalé que les préparations apoptotiques et nécrotiques étaient équivalentes quant à leurs capacités respectives de maturation des DC (Ferlazzo et al., 2000; Kotera et al., 2001).

I.5.1 .Cellules tumorales apoptotiques

Une distinction entre la morphologie des cellules subissant une mort physiologique et une mort pathologique a été observée il y a déjà plus de 50 ans (Glucksmann, 1951). L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique et critique qui intervient naturellement au cours de l'homéostasie tissulaire. Elle est associée à d'importantes modifications morphologiques comme le rétrécissement cellulaire et le gonflement membranaire qui conduisent à la formation de petites entités cellulaires intègres appelées corps apoptotiques. Certains de ces changements sont associés à des événements biochimiques particuliers, telles la translocation des phosphatidylsérines (PS) de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane plasmique (Fadok et al., 1992); l'activation des caspases intracellulaires (Strasser et al., 2000; Thornberry, 1999; Thornberry and Lazebnik, 1998) et la fragmentation d'ADN toutes les 200 paires de bases (Enari et al., 1998; Sakahira et al., 2001). Grâce à l'exposition d'un certain nombre de signaux extra-membranaires spécifiques, les cellules apoptotiques sont aisément reconnues et éliminées de l'organisme par des cellules présentatrices d'antigènes telles les MØ et/ou les DC mais aussi par d'autres types cellulaires

comme des cellules épithéliales et/ou hépatocytes (Savill and Fadok, 2000; Savill et al., 1993). L'épuration des cellules apoptotiques par les phagocytes protège ainsi les tissus sains environnants de l'exposition du contenu intracellulaire inflammatoire et nocif. De nombreuses études ont étudié l'implication de diverses molécules membranaires dans l'ingestion des cellules apoptotiques et ont identifié un rôle actif pour plusieurs récepteurs comme le CD14 (Devitt et al., 1998) et les membres de la famille des scavenger receptors (SR). Ces derniers interagissent avec les PS (Krieger and Herz, 1994), et des intégrines tels que les récepteurs $\alpha_v\beta_3$ (VnR) (Savill et al., 1993) ou $\alpha_v\beta_5$ qui agissent de manière coopérative avec CD36 et le thrombospondine (TSP) pour établir 'un pont moléculaire' entre DC immatures et cellules mortes (Albert et al., 1998a) (Figure 10). Récemment, le groupe de J. Savill a également rapporté l'implication de la molécule de surface CD31 dans le recrutement des neutrophiles apoptotiques à proximité des phagocytes (Brown et al., 2002).

L'épuration des cellules apoptotiques par les phagocytes est associée à des réactions anti-inflammatoires et immunosuppressives efficaces via la sécrétion d'IL-10, de TGF- β_1 , de PGE₂ et de PAF (Fadok et al., 1998; Voll et al., 1997), contribuant ainsi au maintien de la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi. Jusqu'ici, diverses stratégies ont été exploitées pour produire des cellules tumorales apoptotiques en thérapie expérimentale, elles comprennent : l'exposition aux UV (Sauter et al., 2000), l'infection par le virus de la grippe (Albert et al., 1998b), les céramides (Gallucci et al., 1999), le traitement d'anti-Fas (Nouri-Shirazi et al., 2000), ou l'acide betulinique (Berard et al., 2000).

Comme mentionné précédemment, le réel impact des cellules apoptotiques sur la maturation des DC est très controversé. Certains auteurs affirment que les cellules mourant par apoptose sont faiblement immunogènes car elles ne fournissent pas le stimulus suffisant de maturation (Gallucci et al., 1999; Sauter et al., 2000) et incitent par conséquent rarement une réponse immunitaire (Ronchetti et al., 1999). Il apparaît même que l'ingestion de cellules apoptotiques exerce des effets inhibiteurs sur la maturation des DC, car elle diminue de façon saisissante la sensibilité de ces cellules aux stimuli exogènes. Ainsi, Stuart et collègues ont démontré que la prise en charge de cellules apoptotiques par les DC entravait considérablement l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation en réponse au LPS (Stuart et al., 2002).

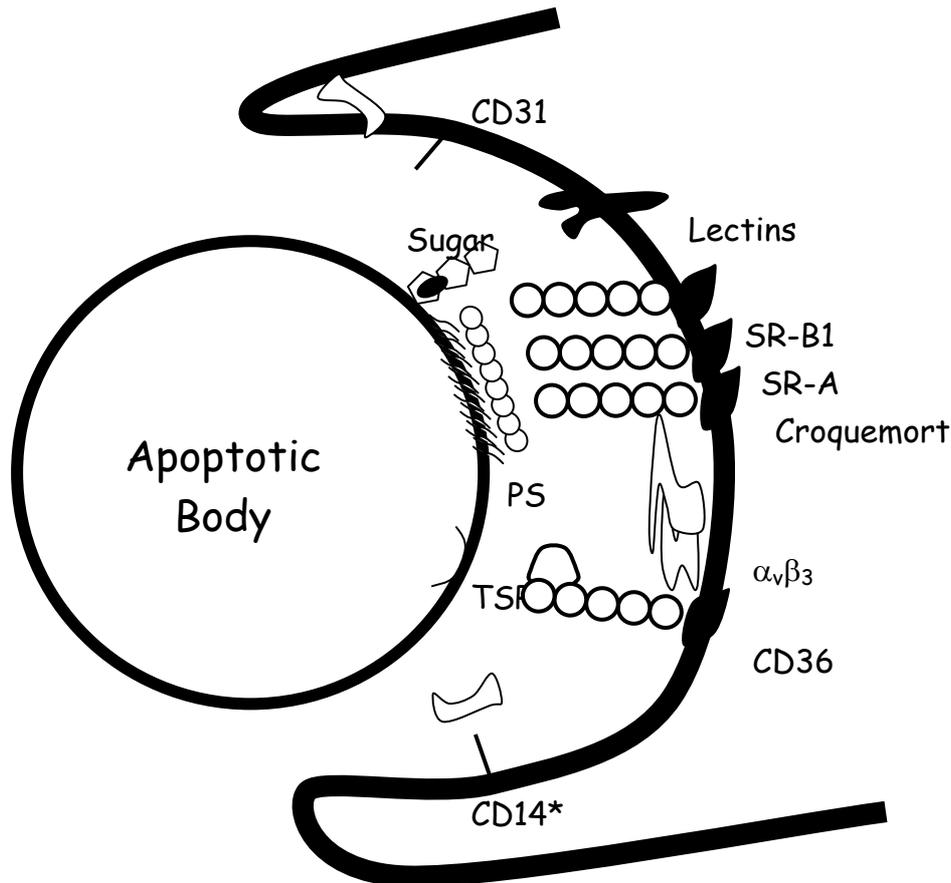


Figure 10 : Diversité des interactions entre cellules apoptotiques et cellules phagocytaires.

Comme suggéré par Steinman et collègues, ceci impliquerait donc que le dialogue entre les DC et les cellules apoptotiques pourrait être une voie régulant la fonction des DC dans le système immunitaire normal, notamment l'entretien de la tolérance périphérique aux antigènes du soi (Steinman et al., 2000). En effet, l'insensibilité des DC après ingestion des cellules apoptotiques implique la présentation des peptides dans un contexte de co-stimulation faible initiant ainsi une tolérance plutôt qu'une immunité. En outre, l'incapacité des DC phagocytaires à maturer en réponse à des signaux subséquents de maturation peut représenter

un des mécanismes d'évasion des tumeurs au système immunitaire *in vivo*, puisque les éventuelles cellules tumorales apoptotiques, une fois ingérées par les DC immatures, n'induisaient pas des réponses immunitaires contre leurs propres antigènes, les rendant de ce fait immunologiquement silencieuses.

Néanmoins, d'autres études ont rapporté que les DC pouvaient normalement progresser dans leur étape de maturation après exposition à des cellules apoptotiques, sans même exiger un quelconque signal additionnel de maturation (Chen et al., 2001b; Ronchetti et al., 1999; Rovere et al., 1998). Il est à noter que de telles activations spontanées ont seulement été observées lorsque les DC étaient cultivées avec un excès des cellules apoptotiques, suggérant de ce fait que le potentiel de phagocytose des DC ait été débordé. Dans cette situation, il est hautement probable que les cellules apoptotiques qui n'ont pas été prises en charge par les DC aient progressé dans la mort cellulaire jusqu'à ce qu'une étape très tardive du programme apoptotique. La nécrose secondaire ou post-apoptotique initialement décrite par le groupe de Nagata (Ogasawara et al., 1993) est fréquemment observée lorsque les mécanismes d'épuration des cellules mortes sont inefficaces et/ou retardés les laissant ainsi évoluer vers des dommages encore plus importants.

En raison de la dégradation rapide de la membrane plasmique (Wyllie, 1997), les cellules post-apoptotiques se désagrègent et déversent leur contenu dans le micro-environnement, avec ses propres risques de conséquences pro-inflammatoires. Beaucoup de constituants libérés au cours de la nécrose post-apoptotique incluent des matériaux stimulateurs, tels des protéases, des médiateurs inflammatoires, des protéines de choc thermique (HSP), de l'ADN double brin qui sont connus pour lancer le programme de maturation des DC via divers récepteurs. En outre, un tel phénomène soutient complètement l'hypothèse formulée par Matzinger qui souligne que les cellules apoptotiques ne peuvent être immunogènes que si elles sont associées à des signaux de danger (Gallucci et al., 1999; Gallucci and Matzinger, 2001). Il est ainsi facile d'imaginer que les cellules apoptotiques subissant une nécrose secondaire fournissent un contexte inflammatoire idéal via la libération de multiples signaux de danger qui alertent le système immunitaire, réduisant de ce fait totalement ou partiellement l'inhibition de la maturation induite par la phagocytose. D'ailleurs, à l'appui de cette idée, il a été également postulé que la phase d'apoptose dans laquelle se trouvent les cellules tumorales, au moment, de l'ingestion contribue activement à

la modulation de la maturation des DC. Effectivement, ces études rapportent l'activité immuno-stimulatrice exercée sur les DC immatures uniquement par des cellules tumorales apoptotiques tardives (Ip and Lau, 2004; Pietra et al., 2001).

L'ensemble de ces investigations souligne le manque de connaissance au sujet des différentes voies de maturation des DC après avoir interagi avec des cellules subissant l'apoptose. Néanmoins, il est aujourd'hui communément admis que les DC ayant ingéré des corps apoptotiques en l'absence de stimulus de maturation induisent la tolérance des lymphocytes T (Kurts et al., 1997; Steinman et al., 2000). Si, cependant, les DC reçoivent des signaux inflammatoires tout en phagocytant des cellules apoptotiques, celles-ci peuvent entrer dans un programme de maturation et cross-présenter les peptides issus des cellules apoptotiques dans un contexte CMH de classe I afin de cross-activer des lymphocytes T CD8+ spécifiques.

I.5.2. Oncolysats cellulaires.

Par opposition à la mort cellulaire programmée, la nécrose est apparemment indépendante de l'expression de nouveaux gènes et est par conséquent considérée comme une forme passive et/ou non régulée de mort cellulaire. De multiples changements morphologiques se produisent pendant cet événement pathologique, parmi lesquels les destructions générales et non coordonnées du noyau et des structures cytoplasmiques ainsi que la digestion aléatoire de l'ADN (Barros et al., 2001; Wyllie, 1980). Une des caractéristiques principales des cellules subissant la nécrose est la rupture de la membrane plasmique (Kerr, 1971) conduisant à la libération du contenu entier du cytoplasme vers l'espace extracellulaire (Kerr et al., 1995). A l'heure actuelle, peu de choses sont connues au sujet des mécanismes précis gouvernant l'épuration des corps nécrotiques de l'organisme, mais il semble que ceux-ci, à l'instar des cellules apoptotiques, fassent appel à la reconnaissance aux PS (Brouckaert et al., 2004).

Par opposition aux cellules subissant l'apoptose, il n'y a aucun doute en ce qui concerne les propriétés immunostimulatrices des cellules nécrotiques. La nécrose cellulaire est fréquemment associée *in vivo* à des infections virales, contre lesquelles une réponse CTL rapide est nécessaire. Et il est désormais clairement admis que lorsque des DC immatures sont exposées à des cellules tumorales tuées par des mécanismes non apoptotiques, elles sont stimulées et soutiennent la génération d'une immunité (Melcher et al., 1998). En effet, les cellules nécrotiques se désagrègent généralement très rapidement *in situ* et le flux incontrôlé et rapide de leurs constituants nuisibles dans les tissus environnants contribue à aggraver la réponse inflammatoire en soutenant la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α , par les M ϕ activés (Cocco and Ucker, 2001). Comme proposé par l'équipe de Kenneth Rock, les cellules possèdent dans leur cytoplasme des adjuvants endogènes qui peuvent potentiellement favoriser la maturation des DC et la génération subséquente de réponses CTL vis-à-vis d'antigènes particuliers (Shi et al., 2000). La perte d'intégrité de la membrane plasmique, qui se produit pendant la majorité des processus pathologiques, y compris la nécrose, conduit à la libération de ces composants cellulaires, fournissant de ce fait un mécanisme simple pour alerter le système immunitaire au danger potentiel. Par conséquent, dans cette situation, la maturation de DC est dépendante des stimuli de danger (c'est à dire., HSP (Basu et al., 2000; Melcher et al., 1998; Somersan et al., 2001), les intermédiaires réactifs oxygénés (Rutault et al., 1999), l'ADN génomique (Ishii et al., 2001), l'acide urique (Shi et al., 2003), le CD40L soluble et l'IL-1 β (Langenkamp et al., 2000)), qui sont présents constitutivement, mais seulement rendus accessibles aux DC après rupture membranaire (Figure 12). Ceci suggère donc fortement que seules les cellules subissant la nécrose soient le résultat d'un danger actuel et immédiat et déclenchent l'inflammation en fournissant les signaux appropriés.

On s'attend ainsi à ce que des cellules nécrosées soient efficacement éliminées dans des tissus, et induisent une maturation spontanée des DC (Basu et al., 2000; Fadok et al., 2001; Gallucci et al., 1999; Sauter et al., 2000; Stern et al., 1996), initiant ou consolidant ainsi une réponse immunitaire adaptative aux antigènes étrangers ou même probablement aux antigènes du soi au cours du développement de l'auto-immunité (Herrmann et al., 1998; Taylor et al., 2000).

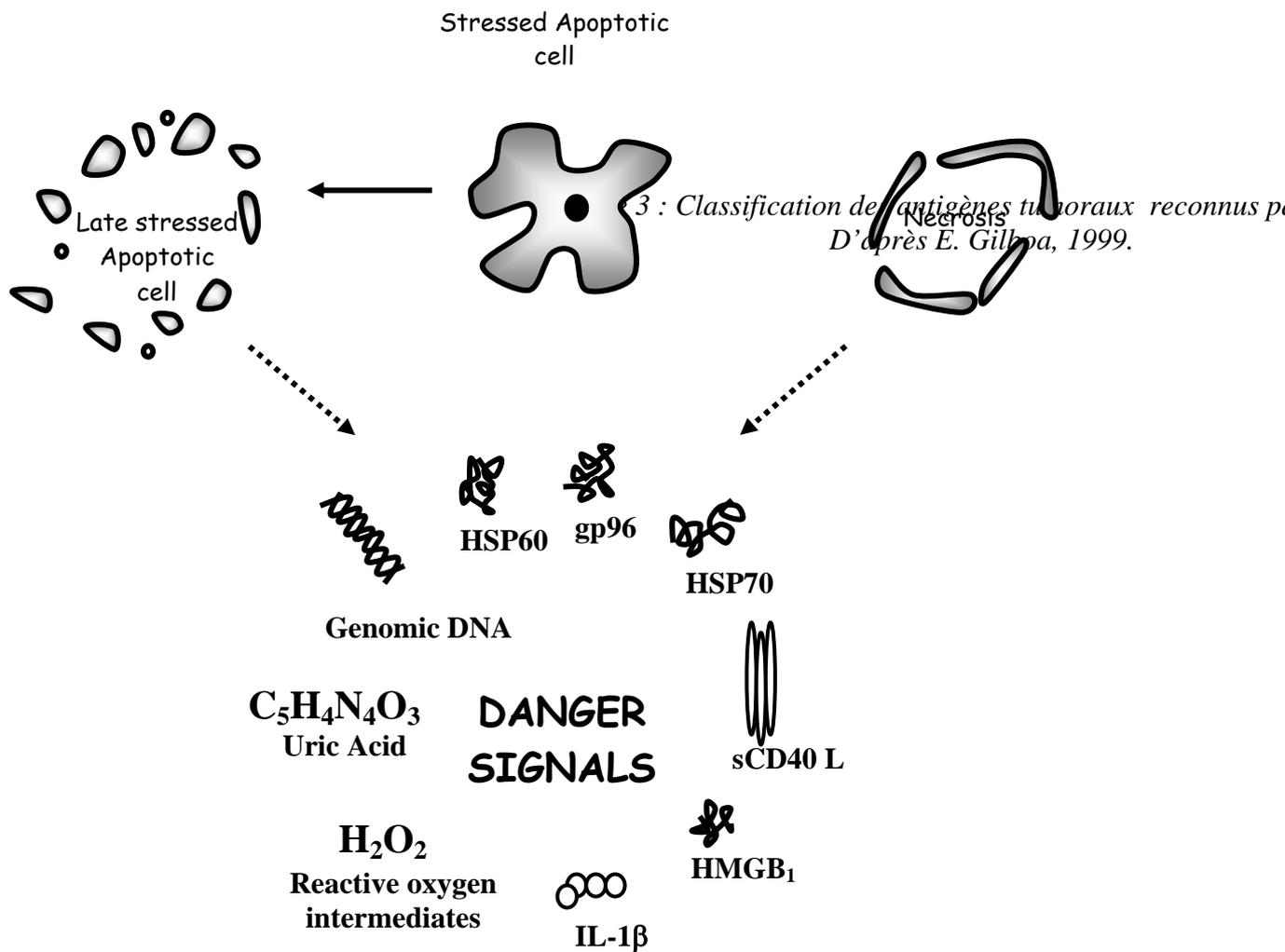


Figure 11 : Exemples de libération de signaux dangers par des cellules nécrotiques et des cellules en apoptose tardive.

I.5.4. Apoptose et HSP

Les résultats contradictoires obtenus jusqu'ici avec les DC chargées en cellules tumorales apoptotiques suggèrent que la forme optimale de mort programmée comme stratégie de production d'antigènes de tumeurs reste à déterminer. Il est concevable que les effets variés des cellules apoptotiques soient liés aux circonstances dans lesquelles la mort

programmée se produit, en fonction principalement des signaux danger fournis, qui sont exigés pour alerter le système immunitaire. Un exemple particulièrement intéressant entrant dans la catégorie des signaux de danger est la famille des HSP. De nombreuses études rapportent, en effet, que l'immunogénicité tumorale est associée à l'augmentation de l'expression de l'HSP70 (Kuppner et al., 2001; Melcher et al., 1998; Todryk et al., 1999). Jusqu'ici, il a été décrit qu'une variété de récepteurs à la surface de DC avait la capacité de stimuler le système immunitaire après fixation de l'HSP70. C'est le cas de la molécule CD91 (Basu et al., 2001) ou des TLR-2 (Asea et al., 2002) et -4 (Palliser et al., 2004; Vabulas et al., 2002). De même, on suppose que la protéine (Grp)-94 (gp96), lorsqu'elle est fixée à CD91, est un activateur direct des DC (Binder et al., 2000a; Panjwani et al., 2002; Singh-Jasuja et al., 2000a; Singh-Jasuja et al., 2000b; Zheng et al., 2001).

La capacité des HSP à activer le système immunitaire inné, en agissant en tant que signal de danger, est une hypothèse attrayante pour expliquer le potentiel inflammatoire des cellules nécrotiques. En effet, comme discutée précédemment, une fois libérées par les cellules subissant la nécrose, les HSP pourraient efficacement favoriser la maturation, soutenant ainsi la génération et l'entretien d'une réponse CTL efficace. Suivant cette argumentation, plusieurs études ont indiqué le rôle essentiel des HSP dans la présentation croisée d'antigènes de tumeurs par les DC en utilisant de l'oncolysat cellulaire (c'est à dire des cellules nécrotiques) comme source d'antigènes exogènes chez l'animal (Fields et al., 1998; Nair et al., 1997; Shimizu et al., 1999) et chez l'Homme (Herr et al., 2000; Nestle et al., 1998; Schnurr et al., 2001).

D'ailleurs, le travail étendu au cours des 10 dernières années a suggéré que les HSP, en plus de favoriser la maturation des DC, jouent des rôles importants dans l'immunité innée et acquise, grâce à leurs capacités uniques à chaperonner les peptides antigéniques reconnus par les lymphocytes T (Chen and Androlewicz, 2001; Srivastava et al., 1994). En effet, des études récentes ont indiqué que des vaccinations avec des HSP issues d'animaux atteints de cancer induisaient une activation CTL et une immunité protectrice, dont la spécificité est fondée sur les peptides interagissant avec ces HSP (Srivastava and Udono, 1994). Le mécanisme de cette protection a été partiellement clarifié : on pense que les HSP (incluant HSP70, HSP90 et gp96) s'associent à une large gamme de peptides issus des cellules tumorales de telle façon à ce que celles-ci interagissent avec le répertoire antigénique des cellules à partir desquelles

elles ont été purifiées (Ishii et al., 1999). Par conséquent, après injection, les complexes HSP/peptide ont accès à la voie de présentation de CMH de classe I au sein des DC et induisent une immunité contre la tumeur autologue (Flynn et al., 1989; Harada et al., 1998; Suto and Srivastava, 1995; Suzue et al., 1997). En outre, la fiabilité des vaccins basés sur l'utilisation de complexes HSP/peptide pour une application clinique a été rapportée avec succès chez des patients souffrant de plusieurs tumeurs avancées (Janetzki et al., 2000). Ainsi, un concept émergent dans l'immunité anti-tumorale et résultant de ces observations est que les HSP facilitent la présentation croisée des épitopes restreints de CMH de classe I et l'initiation subséquente des réponses effectrices des lymphocytes T CD8+. Une telle propriété a conduit vers une nouvelle base conceptuelle à l'origine rapportée par Feng et collaborateurs stipulant que la mort apoptotique peut alerter le système immunitaire et induire par conséquent d'efficaces réactions immunitaire, à condition que celle-ci s'exécute dans des conditions de stress favorisant l'expression des HSP (Feng et al., 2002b; Feng et al., 2001).

La recherche récente s'est ainsi concentrée sur les mécanismes par lesquels les HSP induisent des réponses anti-tumorales, en insistant particulièrement sur leurs interactions avec les DC. Comme mentionné précédemment, il a été supposé que la molécule CD91 jouait un rôle essentiel dans la présentation croisée de peptides antigéniques (Binder et al., 2000b) ((Binder and Srivastava, 2004). Néanmoins, il semble maintenant peu probable que celle-ci soit l'unique récepteur des HSP, principalement en raison de sa très faible expression par les DC. Il semble, en effet, que d'autres récepteurs ou co-récepteurs soient impliqués dans l'endocytose des HSP par les DC, comme notamment ceux appartenant à la famille des SR, qui ont été à l'origine identifiés comme molécules impliquées dans la reconnaissance et l'épuration des cellules apoptotiques. Parmi eux, SR-A et LOX-1 ont la propriété de reconnaître la gp96 (Berwin et al., 2003) et l'HSP70 (Delneste et al., 2002), respectivement. En effet, ces récepteurs assurent non seulement la fixation des complexes HSP/peptide, mais garantissent également la disponibilité de ces épitopes pour la présentation croisée. Par ailleurs, Becker et collaborateurs (Becker et al., 2002), ont établi que la protéine de surface CD40 pouvait fixer et internaliser l'HSP70 avec ses peptides chaperonnés avant d'accéder à la voie de présentation de la CMH de classe I. Toutes ces études indiquées ci-dessus soulignent le rôle critique que jouent les HSP en facilitant la présentation croisée et soutiennent fortement l'idée que seules les peptides interagissant avec les HSP soient efficacement présentés par des molécules de CMH de classe I.

II. Objectifs du travail de thèse

Le récent essor dans l'identification d'antigènes exprimés par les cellules tumorales et reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ a permis d'envisager le développement d'immunothérapies des cancers. Aujourd'hui, l'injection de DC exprimant des antigènes de tumeurs est considérée comme l'une des approches d'immunothérapie active les plus prometteuses. Depuis quelques années, la production de DC immatures ainsi que l'induction de la maturation de ces cellules sont connues et bien documentées. En effet, à l'heure actuelle, de nombreux essais cliniques reposent sur des protocoles d'immunothérapie active basés sur l'utilisation de DC comme vecteurs d'antigènes de tumeurs qui ont déjà donné des résultats très encourageants chez des patients atteints de mélanome métastatique (Banchereau et al., 2001; Nestle et al., 1998; Thurner et al., 1999) ou de carcinome rénaux (Holtl et al., 2002; Su et al., 2003). La source d'antigènes de tumeurs pour les DC reste un élément critique qui va déterminer l'efficacité de ces vaccins anti-tumoraux. Aujourd'hui, la plupart des protocoles de vaccinations repose sur l'utilisation de peptides antigéniques de séquences connues restreintes au CMH de classe I et nécessitant l'identification et caractérisation préalable de ces épitopes. Toutefois, la durée d'une telle présentation est courte, limitant donc le potentiel immunogénique de cette approche. De plus, étant donné le nombre très limité d'antigènes identifiés dans de nombreux cancers, nous avons envisagé une autre approche de transfert d'antigènes de tumeurs basée sur la phagocytose de cellules tumorales mortes.

Les objectifs de mon travail de thèse consistent à analyser les capacités des DC phagocytaires de cellules tumorales mortes à cross-activer des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes de tumeurs.

II.1. Analyse de l'immunogénicité des cellules tumorales apoptotiques in vivo.

Il existe une controverse quant à la réelle capacité des cellules apoptotiques à induire une réponse immunitaire efficace après phagocytose par les DC immatures. Celle-ci pourrait résulter de l'incapacité des cellules-ci à fournir aux DC les signaux dangers nécessaires à la maturation (Gallucci and Matzinger, 2001). A l'appui de cette hypothèse, notre groupe suggère l'existence d'une association entre la capacité des cellules tumorales à exprimer la forme inductible de l'HSP70 et leur immunogénicité. En effet, des études rapportent que ces molécules sont capables de faciliter le trafic

des peptides antigéniques vers la voie de présentation de CMH de classe I (Srivastava et al., 1994) et/ou qu'elles constituent un élément essentiel d'activation (Kuppner et al., 2001).

Ainsi, nous avons étudié la faisabilité de surmonter les propriétés immunosuppressives des cellules tumorales lorsque l'apoptose est induite dans des circonstances de stress cellulaire favorisant l'expression de l'HSP70. Dans un modèle de cancer colo-rectal chez le rat BDIX, nous avons comparé l'injection de cellules apoptotiques irradiées (HSP70-) à l'injection de cellules apoptotiques issus d'une exposition UV après choc thermique (30 min, 42°C) (HSP70+) quant à leur capacité de promouvoir la maturation des DC *in vitro* et d'initier des réponses anti-tumorales *in vivo*. Les résultats de cette étude sont décrits dans l'article 1.

II.2. Analyse de l'immunogénicité des cellules tumorales apoptotiques in vitro dans un modèle humain de MPM

Après avoir confirmé la pertinence de l'utilisation de cellules tumorales apoptotiques exprimant l'HSP70, en tant que source d'antigènes de tumeurs, dans un modèle de rat, nous avons étudié si cette stratégie pouvait être appliquée chez l'homme dans un modèle de mésothéliome pleural malin (MPM). Le MPM est un cancer d'incidence croissante de mauvais pronostic dont le développement corrèle très étroitement avec une exposition prolongée à l'amiante (Wagner et al., 1960) (Selikoff et al., 1965). Malheureusement, les traitements conventionnels comme la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie s'avèrent inefficaces contre ce type de tumeur (Boutin et al., 1998) (Curran et al., 1998). De même, le potentiel très limité des thérapies basées sur l'injection de cytokines recombinantes telles l'IL-2 (Castagneto et al., 2001) (Astoul et al., 1993), l'IL-12 (Caminschi et al., 1998) ou l'IFN- γ (Boutin et al., 1998) sur la prolongation de la survie des patients souligne la nécessité d'envisager d'autres alternatives thérapeutiques.

De très rares cas de régression spontanée de MPM ont été observées et corrélées à la présence d'une forte infiltration lymphocytaire de la tumeur (Robinson et al., 2001; Robinson et al., 1998), suggérant la possibilité que ce cancer soit une cible potentielle du système immunitaire. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la faisabilité de générer, dans des conditions allogéniques, des réponses T cytotoxiques spécifiquement dirigées contre des tumeurs de MPM via la stimulation de PBL naïfs par des DC ayant phagocyté des corps apoptotiques. Les résultats de cette étude sont décrits dans l'article 2.

II.3. Recherche d'antigènes associés aux tumeurs dans le MPM

Dans le cas du MPM, l'immunothérapie est une stratégie très limitée par le faible nombre d'antigènes connus. Ainsi, une étude plus complète des antigènes potentiellement exprimés par ce type de cancer s'avère nécessaire afin de faciliter la mise en place de protocoles d'immunothérapie anti-tumorale. A partir des lignées de MPM dont nous disposons, nous avons étudié l'expression d'antigènes associés à ce type de tumeur. Nous avons procédé à la recherche de transcrits d'antigènes tels MAGE, GAGE, BAGE, NY ESO-1, MUC1 et mésothéline, dont l'expression est partagée par un grand nombre de types de cancers. Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence l'expression de MUC1 par une forte proportion de lignées de MPM dont l'expression protéique a été confirmée par cytométrie en flux. Les résultats de cette étude sont décrits dans l'article 3.

II.4. Analyse de la présentation croisée de l'antigène MUC1 à partir de DC ayant phagocyté des cellules mortes de MPM.

Notre recherche, actuellement, consiste à analyser avec précision la fréquence ainsi que l'avidité et la fonction des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) spécifiques de MPM induits par ces DC. Nous utilisons pour cette étude l'antigène MUC-1 qui est exprimé par une forte proportion des MPM et présentant des épitopes restreints à l'allèle HLA*A0201. La stratégie consiste alors à stimuler les lymphocytes du sang (PBL) de différents donneurs HLA*A0201 par des DC chargées de différentes manières. Nous comparons ainsi pour leurs capacités de stimulation, des DC ayant phagocyté au stade immature des cellules mortes (cellules apoptotiques ou lysat cellulaire) issues de la lignée Meso13 (MUC-1⁺) exprimant ou pas l'HSP70 en fonction de la stratégie d'induction de mort cellulaire ainsi que des DC maturées par un traitement TNF α + Poy(I:C) puis chargées par les peptides synthétiques MUC-1₉₅₀₋₉₅₈ STAPPVHNV et MUC-1₁₂₋₂₀ LLLLTVLTV. La réponse CTL est évaluée en analysant la sécrétion de TNF- α par les lymphocytes T sensibilisés en réponse aux deux peptides présentés par la lignée TAP déficiente (T2). De plus, la réactivité vis-à-vis des deux peptides est également évaluée en cytométrie en flux en détectant les lymphocytes T CD8⁺ produisant de l'IFN- γ , ce qui permet de compter la fraction des cellules qui répondent et le niveau de réponse de chaque cellule individuellement. Ces deux tests nous permettent ainsi de mesurer avec précision la fréquence des CTL spécifiques obtenus après stimulation de PBL à l'aide de DC chargées en peptides ou cellules tumorales mortes.

II.5. Analyse de la présentation croisée des antigènes Melan-A/MART-1, gp-100 et NA17-A à partir de DC ayant phagocyté des cellules mortes de mélanome (Collaboration avec l'équipe du prof. F. Jotereau).

L'objectif de ce projet, qui s'inscrit dans le cadre d'un projet ministériel, est de définir comment induire la présentation croisée par les DC de 3 antigènes de tumeurs (Melan-A/Mart-1, gp-100 et NA17-A), fréquemment exprimés par les mélanomes, à un niveau suffisant pour permettre l'induction de lymphocytes T CD8+ spécifiques de forte avidité, à partir de PBL de donneurs sains.

Sont comparées pour leurs capacités de sensibilisation, des DC ayant phagocyté au stade immature du lysat cellulaire obtenu à partir de la lignée de mélanome M136 exprimant fortement ces 3 antigènes de tumeurs ainsi que des DC maturées par un traitement TNF α + Poy(I:C) puis chargées par les peptides synthétiques Melan-A/MART-1₂₆₋₃₅, gp-100₂₈₀₋₂₈₈ et NA17-A₁₋₉. Après chaque stimulation, la réponse CTL est évaluée à l'aide de complexes HLA*A0201-peptides solubles A*201- Melan-A/MART-1₂₆₋₃₅ et A*201- gp-100₂₈₀₋₂₈₈ et A*201- NA17-A₁₋₉. Ces molécules permettent de mesurer avec précision la fréquence des CTL spécifiques obtenus après stimulation de PBL à l'aide de DC chargées et éventuellement de trier ces lymphocytes afin d'en déterminer l'avidité et la fonction.

II.6. Analyse de l'activité immunosuppressive d'un composé de carboxamide (JM34) sur la maturation des DC (Collaboration avec l'équipe du prof. F. Lang).

Enfin, ce dernier objectif consiste à analyser les effets d'un nouveau composé de carboxamide (trancamide ou JM34) sur la maturation des DC. L'impact du JM34 sur la sensibilité des DC à répondre à des signaux subséquents de maturation tels le LPS, la combinaison TNF- α + Poly-IC ou l'engagement du CD40 ligand a été évalué en mesurant la capacité des DC à induire l'augmentation d'expression des molécules de co-stimulation, la production d'IL-12 ainsi que la stimulation de lymphocytes T allogéniques. Les résultats de cette étude sont décrits dans l'article 4.

III. Résultats

III.1. Analyse de l'immunogénicité des cellules tumorales apoptotiques in vivo.

ARTICLE 1 : Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy. *Int. J. Cancer* (2004) 111(4) : 575-83. D. Massé, **F. Ebstein**, G. Bougras, J. Harb, K. Meflah and M. Grégoire.

Résumé :

Bien que des cellules tumorales apoptotiques aient été en grande partie exploitées comme source des antigènes de tumeur pour des applications de thérapie cellulaires anti-tumorales, la capacité de celles-ci à activer le système immunitaire n'est pas clairement établie. En effet, des résultats contradictoires ont été rapportés quant aux propriétés immunologiques des cellules mourant par apoptose. Ces données discordantes suggèrent ainsi que la forme optimale d'apoptose reste à déterminer. Dans ce travail, nous avons étudié la pertinence de l'expression l'HSP70 et/ou du TGF- β par des cellules apoptotiques employées pour le traitement d'un carcinome colo-rectal non-immunogène chez le rat BDIX. Nous montrons dans cet article que seule l'apoptose induite par un choc thermique augmentant l'expression de l'HSP70 et affectant la sécrétion du TGF- β permet l'activation de DC et l'induction subséquente d'une immunité anti-tumorale efficace. Nous concluons ainsi que le choc thermique suivi d'une exposition des cellules aux UV est une source d'antigènes de tumeur supérieure pour le traitement des tumeurs établies. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour déterminer si l'augmentation de l'expression de l'HSP70 participe à la suppression du TGF- β actif, ou si les deux sont liés par l'intermédiaire d'un mécanisme encore non défini.

Commentaires :

Dans cette étude, nous avons comparé l'efficacité anti-tumorale issue de vaccinations avec des corps apoptotiques stressés HSP70+/TGF- β - avec celle issue de vaccinations avec des corps apoptotiques irradiés HSP70-/TGF- β +. Nos résultats montrent que des injections répétées de cellules

apoptotiques stressées HSP70+/TGF- β - induisent une forte immunité anti-tumorale, comme le démontre la complète inhibition de croissance tumorale chez les animaux vaccinés. L'efficacité de ces cellules apoptotiques stressées HSP70+/TGF- β - est associée à leur capacité à promouvoir la maturation des DC *in vitro* dont l'expression des molécules de CMH de classe II augmente en réponse au Poly-IC. Ces résultats sont complètement en accord avec ceux de Feng et collaborateurs qui avaient rapporté la faisabilité de convertir des corps apoptotiques immunologiquement 'silencieux' en corps apoptotiques immunogènes via l'expression de l'HSP70 dans un modèle de souris. Ces données soutiennent également l'hypothèse de P. Matzinger (Gallucci and Matzinger, 2001) affirmant que les cellules mourant par apoptose ne deviennent immunogènes que lorsque celles-ci sont associées à des signaux de danger. Toutefois, les mécanismes par lesquels l'HSP70 augmente l'immunogénicité des cellules apoptotiques restent obscurs. Contrairement aux travaux de Katsanis et collaborateurs montrant que l'HSP70 purifié est un adjuvant des cellules tumorales apoptotiques (Feng et al., 2002b; Feng et al., 2001), dans notre étude, l'ingestion de cellules apoptotiques stressées HSP70+/TGF- β - n'induit pas de maturation spontanée des DC. Nous excluons par conséquent la possibilité que celles-ci puissent directement interagir avec les molécules CD91 exprimées à la surface des DC. Nos résultats *in vivo* et *in vitro* suggèrent plutôt que l'HSP70 influence le système immunitaire probablement en affectant l'expression d'agents immunosuppresseurs comme le TGF- β .

En effet, nos résultats montrent que les vaccinations des rats avec des cellules apoptotiques irradiées HSP70-/TGF- β + ne favorisent pas une diminution de la taille moyenne des tumeurs des animaux au cours du temps. Comme le degré de maturation des DC détermine les capacités subséquentes de sensibilisation de lymphocytes T, il est vraisemblable que cette incapacité des cellules apoptotiques irradiées (HSP70-/TGF- β +) à induire des CTL spécifiques de tumeurs soit associée à l'incapacité des DC à engager un processus de maturation en réponse au Poly-IC *in vitro*. Il est aussi concevable que cette inhibition soit essentiellement attribuée à la sécrétion de TGF- β par les cellules apoptotiques. En effet, lorsque des anticorps anti-TGF- β neutralisants sont utilisés dans ces expériences de co-culture, les DC pulsées avec les cellules apoptotiques irradiées HSP70-/TGF- β + progressent normalement dans leur programme de maturation en réponse au Poly-IC. En outre, il est désormais clairement établi que le TGF- β est une cytokine immunosuppressive prévenant notamment l'activation des LC (Geissmann et al., 1999). Dans cette situation, il est alors concevable que les DC appréhendent les antigènes dérivés des cellules apoptotiques dans un mauvais contexte de stimulation, induisant de ce fait une tolérance plutôt qu'une immunité. Toutefois, bien qu'étant non immunogènes, les cellules apoptotiques produisant du TGF- β n'affectent pas les capacités de phagocytose et de migration des DC, puisque celle-ci sont retrouvées dans les régions inter-

folliculaires des ganglions lymphatiques proximaux. Ceci suggère fortement un rôle actif des DC chargées avec ces cellules apoptotiques irradiées HSP70-/TGF- β + dans la fourniture de signaux tolérogènes aux lymphocytes T. En effet, des injections répétées de ce type de cellules apoptotiques stimulent la croissance tumorale des animaux. La tolérance n'est pas seulement définie par une insensibilité générale des DC phagocytaires à des stimuli subséquents d'activation, mais possiblement par la transduction d'informations tolérogènes aboutissant à un état d'anergie des CTL. Ceci contribue à l'idée que le système immunitaire est extrêmement sensible aux circonstances favorisant l'expression des protéines HSP70 et/ou TGF- β au sein des cellules apoptotiques.

III.2. Analyse de l'immunogénicité des cellules tumorales apoptotiques *in vitro* dans un modèle humain de MPM

ARTICLE 2 : Cytotoxic T-cell responses against mesothelioma by apoptotic cell-pulsed dendritic cells. Am. J. Respir. Crit. Care. Med (2004) 169(12) : 1322-30. **F. Ebstein**, C. Sapède, P.J. Royer, M. Marcq, C. Ligeza-Poisson, I. Barbieux, L. Cellerin, G. Dabouis and M. Grégoire.

Résumé :

Dans cette étude, nous étudions la pertinence des cellules tumorales apoptotiques exprimant l'HSP70, en tant que source d'antigènes de tumeurs, dans un modèle de MPM *in vitro*. Le MPM est une tumeur rare en grande partie confinée à la cavité thoracique et dont le développement corrèle avec l'exposition prolongée des individus à l'amiante. Malheureusement, cette tumeur est résistante aux thérapies conventionnelles et nécessite par conséquent une recherche intensive pour la mise au point d'alternatives thérapeutiques. Cette étude a pour but d'évaluer l'efficacité *in vitro* de vaccins basés sur des DC chargées en antigènes de tumeur dans l'induction de réponses T cytotoxiques (CTL) contre le MPM. La source d'antigènes de tumeurs pour des DC de donneurs sains d'haplotype HLA-A2+ consiste en des cellules apoptotiques de MPM (HLA-A2-) exprimant ou pas l'HSP70 selon que les cellules tumorales aient subi un choc thermique ou pas avant induction d'apoptose. Nos résultats montrent que les DC ayant phagocyté ces deux préparations apoptotiques sont équivalentes en terme de sensibilité au traitement combiné de TNF- α et Poly(I:C), comme le démontre les augmentations comparables de l'expression des molécules de co-stimulation et les productions d'IL-12. Cependant, seules les DC pulsées avec des cellules apoptotiques exprimant l'HSP70 s'avèrent des inducteurs efficaces de l'activité de CTL contre des cellules de MPM HLA-A2+. De tels CTL obtenus montrent également l'activité cytotoxique contre une lignée de cellules de mélanome HLA-A2+, suggérant l'expression d'antigènes partagés entre ces deux tumeurs. Ces résultats rapportent par conséquent la possibilité d'offrir une approche alternative prometteuse pour la thérapie des patients avec MPM.

Commentaires :

Dans cette article, nous montrons la faisabilité de générer, dans des conditions allogéniques, des réponses T cytotoxiques spécifiquement dirigées contre des tumeurs de MPM via la stimulation de PBL naïfs par des DC ayant phagocyté des corps apoptotiques exprimant l'HSP70. En effet, seules les DC ayant ingéré des cellules apoptotiques sur-exprimant l'HSP70 sont capables d'induire une réponse T cytotoxique et spécifique vis-à-vis des cellules tumorales de MPM. Toutefois, il faut noter que l'implication de l'HSP70 dans l'initiation de l'immunité n'a pas été formellement démontré mais seulement expérimentalement corrélée. Il n'est pas possible d'exclure que d'autres gènes induits par le choc thermique autres que ceux appartenant à la famille des HSP aient joué un rôle dans l'augmentation de l'immunogénicité des cellules apoptotiques. Cependant, il est rapporté que la plupart des gènes dont l'expression est induite après choc thermique s'avèrent coder pour des protéines qui fonctionnent soit comme des chaperonnes moléculaires (HSP), soit comme des médiateurs de la dégradation protéique. Il est par conséquent vraisemblable que, dans notre étude, le choc thermique soit essentiel à l'initiation d'une réponse CTL via l'augmentation de l'expression de l'HSP70, qui s'avère être l'HSP la plus synthétisée. Une fois encore, les mécanismes précis par lesquels l'HSP70 issue des cellules apoptotiques stressées ont conduit les DC vers une stimulation efficace de l'activité anti-tumorale sont inconnus. Une variété de molécules de surface a été décrite pour stimuler le système immunitaire après fixation de l'HSP70 comme CD91 (Basu et al., 2001) ou les TLR-2 et -4 (Asea et al., 2002; Palliser et al., 2004; Vabulas et al., 2002). Contrairement à des études précédentes (Feng et al., 2002b), la prise en charge des cellules apoptotiques stressées sur-exprimant l'HSP70 n'aboutit pas à une maturation spontanée des DC. De plus, les deux préparations apoptotiques ont un impact similaire sur la maturation des DC qui se déroulait classiquement en réponse à la combinaison de TNF- α et Poly-IC comme le montre l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et la production d'IL-12. Il est donc exclu que l'immunogénicité des cellules apoptotiques stressées exprimant l'HSP70 soit attribuée à une augmentation de la sensibilité des DC à la combinaison TNF- α + Poly-IC. Il est plutôt concevable que l'HSP70 cible les antigènes avec lesquels elle interagit vers LOX-1, qui est un SR favorisant le recrutement de matériel antigénique vers la DC et facilitant ainsi le trafic des antigènes vers la voie de CMH de classe I (Delneste et al., 2002).

Une autre découverte intéressante dans notre étude est la mise en évidence de l'expression des antigènes de la famille GAGE, un antigène associé au mélanome, par la lignée Meso13 qui est celle ayant servi pour la production des corps apoptotiques. Ces résultats concordent ainsi parfaitement avec la possibilité pour les DC chargées en cellules apoptotiques stressées d'induire une réponse restreinte au CMH de classe I contre des cellules M17 (HLA-A2+) de mélanome. Toutefois, la spécificité de lyse des CTL sensibilisés contre des épitopes de GAGE n'a pu être précisément

vérifiée à cause de l'absence de peptides antigéniques connus apparentés à GAGE et restreints à l'haplotype HLA-A2. En effet, jusqu'à aujourd'hui il n'existe que deux peptides antigéniques identifiés et reconnus lorsqu'ils sont présentés par les molécules CMH de classe I HLA-Cw6 (Van den Eynde et al., 1995) et HLA-A29 (De Backer et al., 1999), respectivement. Ainsi, déterminer la fréquence des lymphocytes T CD8+ anti-GAGE n'a pu être envisagé en utilisant la stratégie de chargement de peptides sur cellules TAP déficientes (T2) ou des molécules CMH/peptide solubles. La recherche d'antigènes de tumeurs dont les peptides ont déjà été identifiés comme des épitopes reconnus par les CTL parmi nos différentes lignées de MPM est désormais une priorité.

III.3. Recherche d'antigènes associés aux tumeurs dans le MPM

ARTICLE 3 : Tumor-associated antigens expressed by Malignant Pleural Mesothelioma cell lines. (Submitted Manuscript). C. Sapede, **F. Ebstein**, I. Barbieux, M. Marcq, L. Cellerin, C. Ligeza-Poisson, C. Sagan, S. Tabi, B. Jasani, E. Butchart, A. Gibbs, M. Adams, G. Dabouis and M. Grégoire.

Résumé :

Le MPM est une tumeur fortement agressive et résistante à toutes les formes conventionnelles de thérapie. De récentes investigations pré-cliniques et cliniques ont suggéré qu'une réponse immunitaire pouvait être obtenue contre le MPM. Cependant, peu de choses sont connues au sujet des antigènes associés au MPM qui représentent pourtant des cibles potentielles pour l'immunothérapie. Dans ce rapport, quinze lignées cellulaires provenant de patients atteints de MPM épithélioïde ont été établies puis caractérisées en recherchant l'expression de la calrétinine, de la cytokératine, de la vimentine et de l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) par immuno-histochimie. L'analyse de l'expression d'antigènes de tumeurs connus par RT-PCR a également été effectuée sur des échantillons d'ARNm extraits à partir des lignées cellulaires de MPM, en comparaison avec des échantillons d'ARNm obtenus à partir de lignées cellulaires d'adénocarcinome et de mélanome. Les cellules de MPM ont montré une expression hétérogène de GAGE1, GAGE 1.2-7, GAGE 3.6-8 ou TERT. En revanche, aucun ARNm n'a été détecté pour les antigènes de MAGE, NY-ESO-1 ou de la famille SSX. Des ARNm de MUC-1 et de la mésotheline ont été détectés dans toutes les lignes examinées de cellules de MPM. Des analyses complémentaires par cytométrie en flux et par microscopie confocale ont confirmé l'expression protéique de ces deux antigènes.

Commentaires :

Malgré des investigations précédentes sur l'établissement de lignées cellulaires de MPM, peu d'informations sont finalement disponibles quant à l'expression de marqueurs tumoraux spécifiques. Nous avons décidé d'utiliser les marquages cytokératine 5/6,

vimentine, calrétinine et CEA pour différencier les cellules de MPM. Dans notre étude, le marquage anti-vimentine ne semble pas être très pertinent dans la mesure où les cellules de MPM et d'adénocarcinome présentent le même signal. En revanche, la calrétinine et la cytokératine 5/6 semblent être plus utiles pour cette application car elle ne marque pas les cellules d'adénocarcinome.

Une fois les lignées cellulaires établies, nous avons analysé l'expression d'antigènes associés aux tumeurs par RT-PCR. Une controverse existe à propos de l'expression de l'antigène SV40 par ces cellules dans la mesure où certains laboratoires détectent son expression dans la plupart des lignées étudiées alors que d'autres ne peuvent pas confirmer ces résultats. Une étude récente rapporte qu'une contamination des lignées étudiées par des plasmides possédant les séquences de SV40 pourrait facilement expliquer la variabilité entre les différentes études (Lopez-Rios et al., 2004). Jusqu'à aujourd'hui, peu d'études se sont focalisées sur l'expression d'antigènes de différenciation par les cellules de MPM. En 2002, Sigalotti et collaborateurs ont observé que les cellules de MPM exprimaient les antigènes MAGE, GAGE SSX et NYESO-1 appartenant à la famille des CTA (Sigalotti et al., 2002). Dans notre étude, seul un tiers de nos cellules expriment ces antigènes. Les cellules de MPM expriment partiellement les antigènes GAGE-1(2/15)GAGE-1,2-7 (2/15), GAGE-3,6-8 (4/15) et TERT (11/15). Aucun ARNm codant pour les antigènes MAGE-1, MAGE-2, SSX-4, BAGE et NYESO-1 a pu être détecté. Une possibilité permettant d'expliquer ces différences vient du fait que Sigalotti et collaborateurs ont travaillé sur 6 lignées dont la moitié sont des lignées primaires, alors que notre étude est basée sur l'analyse de 15 lignées qui sont toutes des lignées établies à long terme, où l'expression génique peut être modifiée par les sous-cultures répétées.

De manière intéressante, les ARNm codant pour la mésothéline et MUC1 sont détectés par PCR dans toutes les lignées de MPM. L'expression protéique de ces antigènes a ensuite été confirmée par cytométrie en flux et microscopie confocale. La mésothéline avait déjà été identifiée à la surface des cellules de MPM en immuno-histochimie. Nos résultats confirment l'expression homogène de cet antigène dans ce type de cancer et montrent que MUC1 est également exprimé par la moitié de nos lignées cellulaires.

En conclusion, cette étude confirme que les lignées établies à partir des liquides pleuraux et caractérisées comme étant des cellules de MPM expriment partiellement des antigènes appartenant à la famille des CTA. Plus particulièrement, MUC1 et la mésothéline apparaissent comme des antigènes qui peuvent servir pour le diagnostic précoce de MPM, comme des cibles pour l'immunothérapie et comme outils pour suivre la progression tumorale.

**TUMOUR ASSOCIATED ANTIGENS EXPRESSED BY MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA
CELL LINES.**

Running title : Tumour antigens expression by mesothelioma cell lines.

Carole SAPEDE^a, Frédéric EBSTEIN^a, Isabelle BARBIEUX^a, Marie MARCQ^a, Laurent CELLERIN^b, Catherine LIGEZA-POISSON^b, Christine SAGAN^b, Zsuzsanna TABI^c, Bharat JASANI^c, Eric BUTCHART^d, Allen GIBBS^c, Malcolm ADAMS^e, Gérard DABOUIS^b, Marc GREGOIRE^{a,f}

a: INSERM U601, Institut de Biologie, 9 Quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex, France

b: Service d'Oncologie Médicale Thoracique et Digestive, Hôpital Laënnec, St-Herblain, France

c: School of Medicine, Cardiff University, & Cardiff and Vale NHS Trust, Cardiff, Wales, UK

d: Cardiff and Vale NHS Trust, Cardiff, Wales, UK

e: Velindre NHS Trust, Whitchurch, Cardiff, Wales, UK

f: To whom correspondence should be addressed (Tel. : +33 2 40 08 41 50, Fax. : +33 2 40 08 40 82, e-mail : marc.gregoire@nantes.inserm.fr)

C.S. is a recipient of an "Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC)" fellowship.

Abbreviations used in this paper : BAGE, Bladder Associated Antigen; β 2M, Beta2-microglobulin; CCE, Counter-flow Centrifugal Elutriation; CEA, Carcino-Embryonic Antigen; CTAs, Cancer Testis Antigens; FITC, Fluorescein IsoThiocyanate Conjugated; GAGE, Gastric Associated Antigen; MAGE, Melanoma Associated Antigen; MPM, Malignant Pleural Mesothelioma; TAAs, Tumour Associated Antigens; TERT, TELomerase Reverse Transcriptase

Abstract

Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) is a highly aggressive tumour, resistant to all conventional forms of therapy. Pre-clinical and clinical investigations have suggested that an immune response can be elicited against MPM. Hence, immunotherapy might improve the treatment of this cancer. However, little is known concerning the malignant mesothelioma-associated antigens, which could represent useful targets for early diagnosis, immunotherapeutic approaches or long term studies of treatment. In this report, fifteen cell lines established from patients with MPM were characterized by immuno-cytochemical identification of calretinin, cytokeratin 5/6, vimentin and the lack of expression of carcinoembryonic antigen (CEA). RT-PCR analyses performed on mRNAs extracted from MPM, adenocarcinoma and melanoma cell lines showed that some antigens, including GAGE1, GAGE 1-2-8, GAGE 3-6-7 or TERT, were expressed by the MPM cells. By contrast, no mRNAs were detected for MAGE, NY-ESO-1 or SSX-family antigens. Interestingly, MUC-1 and mesothelin mRNAs were detected in all MPM cell lines we studied. Flow cytometry and confocal microscopy analyses further confirmed their expression. These two antigens could represent targets for immunotherapeutic protocols or tools for the detection and the monitoring of patients suffering from MPM.

184 words

Keywords: malignant pleural mesothelioma, cell lines; tumour associated antigens; Muc-1; mesothelin

Introduction

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an uncommon cancer, usually attributable to asbestos exposure. MPM arises from the uncontrolled proliferation of the mesothelial cells lining the pleura. As a consequence of the widespread use of asbestos or derived fibres over the past century and the long latency period, the number of patients diagnosed each year is expected to rise by 5-fold within the next two decades (Peto et al., 1999). However, conventional treatment modalities have not brought satisfactory improvements in terms of response rate or survival time which still remains below 1 year for the vast majority of the patients (Treasure & Sedrakyan, 2004). Multimodality protocols combining surgery, chemotherapy and radiotherapy appear to be promising (Sugarbaker & Garcia, 1997) but only 1 or 2 % of the patients are considered eligible for such a treatment (Parker & Neville, 2003). Nevertheless, there is some hope that the MPM may be effectively treated by immunological approaches. Whereas malignant mesothelioma is not classically considered as an immunogenic cancer, evidences for immune recognition exist. Indeed, a relationship between the presence of tumour-infiltrating lymphocytes and the prognosis (Leigh & Webster, 1982) has been described. Moreover, a case of spontaneous regression associated with lymphocytes infiltration has been reported recently (Robinson et al., 2001). Thus, new strategies of immunotherapy could represent interesting alternatives for the treatment of this cancer (Nowak et al., 2002). Intrapleural injections of cytokines like Il-2 (Astoul et al., 1998; Castagneto et al., 2001) or INF- γ (Boutin et al., 1994) have provided encouraging results but their efficacy is still limited as they did not cure the patients. Moreover, the side effects they cause hamper their further application. The stimulation of a specific immune response by the activation of the cytotoxic T lymphocytes with autologous dendritic cells loaded with tumour antigens could represent a more effective alternative. Such a strategy has already brought encouraging results in various types of cancers including metastatic melanoma (Turner et al.,

1999), B cell lymphoma (Hsu et al., 1996) or renal cell carcinoma (Su et al., 2003). We recently showed that the enhancement of a cytotoxic response against MPM was possible at least in vitro (Ebstein et al., 2004). However, the development of such a clinical approach directed against MPM requires a better knowledge of the Tumour Associated Antigens (TAAs) expressed by this cancer. To date, only little information is available about the TAAs expressed by MPM cells. Except SV40 (Cerrano et al., 2003) and topoisomerase IIb (Robinson et al., 2000), which have not been clearly evidenced yet, no TAA is described for the MPM cells. An original investigation of Sigalotti and collaborators (Sigalotti et al., 2002) showed that some Cancer Testis Antigens (CTAs) could be expressed by MPM after treatment with hypomethylating agents, but no investigation on non-treated MPM cells has been performed to clearly define the constitutive expression of antigens by these mesothelioma cells.

In the present study, we analysed the expression of TAAs in well-characterized MPM cell lines. Fifteen MPM cell lines were established from pleural fluids. The diagnosis of mesothelioma was established after histological immunochemistry examinations of biopsies. We confirmed the MPM origin of the established cell lines by immunocytochemistry stainings. RT-PCR experiments were then performed on the MPM cells and on one adenocarcinoma and two melanoma cell lines in order to determine and characterize the antigens expressed by the MPM cells. Most of the antigens investigated, including MAGE, GAGE, SSX-genes family and NY-ESO-1, belong to the CTAs family. We also investigated the expression of TERT as this protein has been described in around (over) 85% of human cancers and telomerase activity has already been described in mesotheliomas (Kumaki et al., 2002). Interestingly, the constitutive expression of two proteins, mesothelin and MUC-1, was evidenced by RT-PCR analyses. Their expression was further confirmed by confocal microscopy and flow cytometry analyses. Though their expression is not specific to MPM, these two antigens could represent targets for immunotherapeutic protocols or tools for the detection and the monitoring of patients suffering from MPM.

Materials and methods

Patients

MPM patients had received no anti-cancer therapy before the study. Pleural effusions were collected by thoracentesis and diagnosis was established by immunohistochemical staining of pleural biopsies. The patients with MPM included 13 men and 2 women, ranging in age from 41 to 83 years (Table 1). Five presented a mesothelioma of mixed morphology and ten a mesothelioma of epithelioid morphology. The ADK3 cell line was established from a patient with adenocarcinoma metastasis.

Counter-flow Centrifugal Elutriation (CCE)

The cells coming from the pleural fluids were centrifuged at 1500 rpm (450g) for 15 min at room temperature. When necessary, a step of erythrocyte lysis was performed following the fabricant recommendations (Erythrocyte Lysis Buffer, Qiagen, Hilden, Germany). The cells pellets were resuspended in sterile 0.9 % NaCl before being injected into a rotating Beckman JE-5.0 elutriator rotor equipped with a 5 mL separation chamber and adapted to an Avanti J-20 centrifuge. Three fractions were obtained by altering the counterflow rate (fraction A: 15mL.min⁻¹; fraction B: 27mL.min⁻¹ and fraction C corresponding to rotor off - rotor speed: 2000 rpm). The cells of each fraction were seeded into flasks for culture.

Cell lines and media

The mesothelioma cell lines Meso 4, 11, 13, 30, 34, 36, 47, 56 and the adenocarcinoma cell line ADK3 were established in our laboratory from fresh pleural effusions (Table I). The mesothelioma cell lines 2CJ, 12JH, 15Trm, 15Trp, 18PM, 19DD and 26KG were established by Z. Tabi (Cardiff, Wales). The human melanoma cell line BEU was isolated by Pr. J.F.

Doré (Lyon, France) and provided by Pr. F. Jotereau (U601 INSERM Unit, Nantes, France). M136, a human melanoma cell line, was a kind gift of Pr. F. Jotereau.

Cells were maintained in complete medium composed of RPMI 1640 (Cambrex, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat inactivated FCS (Eurobio, Les Ulis, France), 100 IU/mL penicillin (Sigma Aldrich, St-Louis, MO), 0.1 mg/mL streptomycin (Sigma Aldrich) and 2 mM L-glutamine (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Cells were routinely checked for *Mycoplasma* infection by Hoechst 33258 labelling.

Immunocytochemistry and confocal microscopy

Cells were cultured on glass coverslips until confluence. After three washes with phosphate-buffered saline (PBS), cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS (30 min at room temperature). For intracellular staining (vimentin, calretinin and cytokeratin stainings), a permeabilization was performed as follows: the cells were treated for the last 5 min with 0.5% Triton X-100. After three PBS rinses, the cells were saturated in PBS/BSA 1% for 20 min at room temperature and then incubated with anti-vimentin (clone V9, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), anti-calretinin (clone 5A5, Novocastra), anti-cytokeratin 5/6 (clone D5/16B4, Zymed, San Francisco, CA), anti-CEA (clone A5B7, DAKO, Denmark), anti-mesothelin (Clone K1, Zymed ; Clone 5B2, Novocastra) or anti-MUC1 FITC-conjugated (clone HMPV, BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) in PBS/BSA 0.1%. Except for the MUC-1 staining, the cells were incubated after three PBS rinses with an anti-rabbit IgG fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), an anti-mouse IgG FITC-conjugated (Sigma-Aldrich) or an anti-mouse biotin-conjugated (Jackson ImmunoResearch) and then extravidin FITC-conjugated (Sigma-Aldrich). After three PBS rinses, the cells were incubated with ToPRO-3 iodide (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, California) for 30 min. The coverslips were then mounted in

Prolong Antifading Kit (Molecular Probes) and analysed with a laser confocal scanning microscope (Leica TCS-SP1).

The antibody titers were as follows: Vimentin, 1/100; Calretinin, 1/100; Cytokeratin 5/6, 1/150; Mesothelin, 1/30; MUC-1, 1/150; CEA, 1/40.

Flow cytometric analyses

The MUC-1 expression was investigated by labelling confluent cells with an anti-MUC1 FITC-conjugated antibody (clone HMPV, BD Biosciences Pharmingen). A FITC-conjugated IgG1 (clone MOPC-21, BD Biosciences Pharmingen) was also used as isotype control. The cells were incubated with the antibodies for 20 minutes in complete medium at 4°C. The samples were running on a FACScalibur cytometer (BD Pharmingen) after two rinses in sterile NaCl 0,9%.

RNA extraction and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNAs were extracted from the cells with the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer recommendations. The cDNAs specific to the mRNAs were obtained from 1 µg of total RNA using an AMV-reverse-transcription system (Promega, Madison, WI) and oligo-dT primers. PCR experiments were carried out using *Taq* DNA polymerase (Promega) and specific primers (Table II). PCR were performed in a 25µL reaction volume containing: 2.5 µL 10XPCR reaction buffer B, 2.5 µL 15 mM MgCl₂, 0.5 µL 10 mM dNTPs mix, 0.5 µL 10µM of each primer, 1 IU *Taq* polymerase and 17.8 µL deionised water. The cycling reaction was performed in a programmable thermal cycle (Peltier, PTC-200) as follows: a first denaturation step at 94°C for 2 min and then, 94°C for 30 s, hybridisation temperature (table II) for 30 s and 72°C for 30 s (except for β2-microglobulin amplification : 1 min) for 35 cycles. After a final extension step at 72°C for 5 min, the PCR products were kept at 4°C. The integrity of each synthesised cDNA was confirmed by the amplification of the β2-microglobulin housekeeping gene. 10 µL of each RT-PCR sample were run on a 1.5 % agarose gel and visualised after an ethidium bromide staining under UV exposition.

Results

Isolation of tumour cells by counter-flow centrifugal elutriation (CCE)

Within the last two years, more than thirty pleural effusions were harvested by our laboratories. We assessed the possibility of isolating the tumour cells from the others by the use of CCE, which allows cells to be quickly and specifically separated depending on their size and density. The cells contained in the pleural effusions were elutriated and separated in three fractions corresponding to different counterflow rates. The smallest cells, mainly erythrocytes and lymphocytes, as evidenced by CD3 labelling (data not shown), were obtained in the first fraction (Fig. 1A). Morphological observations after few days in culture revealed that the second fraction (Fig. 1B) contained mixed population of lymphocytes, fibroblasts and monocytes. Most of the MPM cells were collected in the last fraction (Fig. 1C). The other types of cells (erythrocytes, lymphocytes, monocytes and fibroblasts) were still observed in the last fraction but as minority events. Hence, CCE could represent an interesting alternative to quickly obtain an enriched population of tumour cells.

Characterization of the established cell lines

Immunocytochemical stainings were performed in order to check the nature of the cells we had established. Because the presence of vimentin, calretinin and cytokeratin 5/6 is generally detected on MPM biopsy samples (Doglioni et al., 1996; Ordonez, 1998a; Ordonez, 1998b; Ordonez, 2002), we analysed their expression by MPM cell lines maintained in culture for more than 15 passages. We also tested the CEA, described to be positive for pulmonary adenocarcinoma and negative for mesothelioma (Chhieng et al., 2000; Ordonez, 2002). The cells of MPM origin were compared with the ADK3 cell line, which was established from the pleural effusion of a patient suffering from an adenocarcinoma (fig. 2). No significant

differences were observed for vimentin staining between adenocarcinoma and mesothelioma cell types as they both strongly express vimentin. With 82% of the MPM cell lines presenting a strong reactivity for calretinin, this staining was more intensive for the MPM cells than for the adenocarcinoma cells. 65% of the MPM cells expressed the cytokeratin 5/6, which was not expressed by ADK3, whereas the CEA was only expressed by ADK3 and other carcinomas tested as controls (data not shown).

Gene expression of Tumour Associated Antigens

PCR analyses were performed on the 15 cell lines previously characterized. Two melanoma and one adenocarcinoma (ADK3) cell lines were tested as controls. The expression of eleven antigens, belonging to the CTAs family for the main part of them (Table 2), was studied on the fifteen MPM cell lines. The melanoma cells (BEU, M136) generally express most of the antigens analysed (positive controls) and the adenocarcinoma cells were used in order to compare the antigens expression profile between MPM cells and cells of a different origin which can be found in a pleural fluid.

NY-ESO-1 expression was tested by the use of two couples of primers and was never observed for the MPM cell lines. MAGE 1 and 2, BAGE and SSX4 were not expressed either (data not shown). A report of the experiments is given in table 3. As previously reported (Sigalotti et al., 2002), mRNA encoding GAGE1-2-8 and GAGE3-6-7 antigens were heterogeneously detected, depending on the cell lines. As observed on figure 3, about 70% (11/15) of the lines were positive for TERT.

The mesothelin and MUC-1 gene expressions were evidenced for all the mesothelioma cell lines. MUC-1 was also expressed by the melanoma and the adenocarcinoma lines but mRNAs coding for the mesothelin were not detected in melanoma lines (BEU and M136).

MUC-1 expression

Flow cytometric analyses were performed in order to confirm the MUC-1 expression by the MPM cells. These experiments revealed that the protein MUC-1 was constitutively expressed by about 50% of the MPM cell lines (fig. 4). The heterogeneity of expression of MUC-1 was noteworthy as some lines (for instance, Meso13 or 19DD) were uniformly positive, some lines were only partially positive (Meso4, 15Trm) and, in some cases, all the cells were negative (Meso47 or 12JH for example). Concerning the other types of cancer, a strong expression of MUC-1 was detected for the adenocarcinoma line (ADK3), in contrast to melanoma cells (BEU, M136) which did not express this antigen although they presented a signal on the PCR experiments.

Confocal microscopy analyses were performed to further investigate the expression of this protein especially in the cells which appeared to be only partially positive by flow cytometric analyses. These experiments showed that only a fraction of these cells was labelled (fig. 5A) and expressed MUC-1.

Mesothelin expression

PCR experiments revealed the gene expression of mesothelin by all the investigated MPM cell lines. We analysed our established mesothelioma cell lines for their protein expression by confocal analysis. The mesothelin was expressed uniformly throughout the cells. However, the labelling of the different lines was heterogeneous (fig. 5B) and the expression of mesothelin was weaker for the adenocarcinoma cell line ADK3 than it was for the MPM cells.

Discussion

The identification of antigens expressed by the MPM cells is a prerequisite to improving the treatment of this cancer by allowing early accurate diagnosis and recognition of new targets for immunotherapeutic approaches. However, the scant availability of cell lines of MPM origin limits the investigations in this domain. During the last few years, we have therefore worked on the establishment and characterization of cell lines of MPM origin.

Counter-flow centrifugal elutriation (CCE) appeared as an attractive technique to isolate the cells of tumoral origin from the other kinds of cells in a pleural fluid. Although the number and the types of cells contained in a pleural effusion are extremely variable and the fact that this technique can not be used for all the samples, CCE can nevertheless be useful to avoid the contamination of primary MPM cell cultures, mainly immune T cells, provided that a sufficient amount of cells is present in the sample.

Despite previous investigations about establishment of MPM cells cultures (Manning et al., 1991; Orengo et al., 1999; Zeng et al., 1994), only poor information is available about the way to ensure the nature of the cells. We decided to investigate the use of cytokeratin 5/6, vimentin, calretinin and CEA labellings to differentiate our cells from cells of a different nature, like the adenocarcinoma cells that are also potentially recovered in pleural effusions. The vimentin staining does not seem to be pertinent as the adenocarcinoma and MPM cells presented the same signal. Calretinin and cytokeratin 5/6 appear to be more useful for this application because the adenocarcinoma cell line was not stained by anti-calretinin and cytokeratin 5/6, unlike most of the MPM cells. Moreover, these markers have already been proved to be useful for immunohistochemistry staining as there are recognized to be able to draw a distinction between MPM and adenocarcinoma cells (Chhieng et al., 2000; Ordonez,

2002; Ordonez, 2003a). Our experiments suggest that it is able to achieve this distinction when working on cells maintained in culture.

Once the nature of the established cells was ensured, we analysed their antigens expression by PCR. SV40 is certainly the most studied antigen in malignant mesothelioma. A controversy still exists about its expression by these cells, as some laboratories detected its expression in almost all the lines they studied, whereas some others did not confirm such results (Cerrano et al., 2003). A recent report showed that a contamination by plasmids containing SV40 sequences can be detected by PCR, depending on the primers used, and can explain this variability between the different studies (Lopez-Rios et al., 2004).

So far, only few reports have focused on differentiation antigens expressed by MPM cells. In 2002, Sigalotti and co-workers observed that malignant mesothelioma cells expressed CTAs belonging to the MAGE, GAGE, SSX-genes family or the gene NY-ESO-1 (Sigalotti et al., 2002). In our study, only a third of the MPM cell lines contained at least one of the mRNA specific for at least one of these genes. The MPM cells partially expressed GAGE1 (2/15), GAGE 1,2,8 (2/15), GAGE 3,6,7 (4/15) and TERT (11/15). No mRNAs for MAGE-antigens MAGE-1 and MAGE-2 as well as SSX4, BAGE and NY-ESO-1 were detected. A possibility to explain this difference is that Sigalotti and collaborators worked on six lines (three primary cultures and three long-term established cultures). Our study is based on the analysis of fifteen lines, all studied after ten to fifteen subcultures, where genes' expression can be altered by the culture, as suggested in Sigalotti's report. However, in our hand we could not correlate the absence of these gene expressions with the longer culture time and repeated subcultures. Also, the positive cells at the time of these experiments are still positive now, after numerous cell subcultures (meso 13, data not shown).

As the mRNAs encoding Mesothelin and MUC-1 were detected by PCR in all the MPM cell lines, we investigated the presence of these proteins at the surface of the cells. They were both

detected by confocal and/or flow cytometry. Mesothelin has already been identified at the surface of malignant mesothelioma cells by immunohistochemistry experiments performed on tissue sections (Ordonez, 2003b). In a recent study, Li and collaborators also studied the expression of this protein by MPM cells (Li et al., 2004). Our results confirm the expression of mesothelin by this cancer and show that MUC-1 is also expressed by MPM cells as about half the lines we analysed were at least partially positive.

In conclusion, this study confirms that cell lines established from pleural effusion and characterized as being of MPM origin partially express some of the antigens belonging to the CTAs family. Interestingly, MUC-1 and mesothelin were significantly expressed by all the tested MPM cell lines and further cytometric and confocal analyses partially confirmed the expression of these antigens. MUC-1 and mesothelin antigens could therefore represent novel feasible markers of MPM cells for early diagnosis (Robinson et al., 2003), targets for immunotherapy as well as tools to monitor the disease progression.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM and grants from the Weisbrem-Benenson Foundation, La Ligue Régionale Contre le Cancer (Morbihan, Pays de la Loire and Vendée), and the British Lung Foundation. The authors wish to thank Pr. P. Coulie and Dr. F. Brasseur (Université de Louvain, Bruxelles) for the critical review of the manuscript.

References

- Astoul, P., Picat-Joossen, D., Viallat, J.R. & Boutin, C. (1998). Intrapleural administration of interleukin-2 for the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma: a Phase II study. *Cancer*, **83**, 2099-104.
- Boutin, C., Nussbaum, E., Monnet, I., Bignon, J., Vanderschueren, R., Guerin, J.C., Menard, O., Mignot, P., Dabouis, G. & Douillard, J.Y. (1994). Intrapleural treatment with recombinant gamma-interferon in early stage malignant pleural mesothelioma. *Cancer*, **74**, 2460-7.
- Castagneto, B., Zai, S., Mutti, L., Lazzaro, A., Ridolfi, R., Piccolini, E., Ardizzoni, A., Fumagalli, L., Valsuani, G. & Botta, M. (2001). Palliative and therapeutic activity of IL-2 immunotherapy in unresectable malignant pleural mesothelioma with pleural effusion: Results of a phase II study on 31 consecutive patients. *Lung Cancer*, **31**, 303-10.
- Cerrano, P.G., Jasani, B., Filiberti, R., Neri, M., Merlo, F., De Flora, S., Mutti, L. & Puntoni, R. (2003). Simian virus 40 and malignant mesothelioma (Review). *Int J Oncol*, **22**, 187-94.
- Chhieng, D.C., Yee, H., Schaefer, D., Cangiarella, J.F., Jagirdar, J., Chiriboga, L.A. & Cohen, J.M. (2000). Calretinin staining pattern aids in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous effusions. *Cancer*, **90**, 194-200.
- Dogliani, C., Tos, A.P., Laurino, L., Iuzzolino, P., Chiarelli, C., Celio, M.R. & Viale, G. (1996). Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol*, **20**, 1037-46.
- Ebstein, F., Sapede, C., Royer, P.J., Marcq, M., Ligeza-Poisson, C., Barbieux, I., Cellerin, L., Dabouis, G. & Gregoire, M. (2004). Cytotoxic T cell responses against mesothelioma by apoptotic cell-pulsed dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*, **169**, 1322-30.

- Hsu, F.J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T.M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E.G. & Levy, R. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, **2**, 52-8.
- Kumaki, F., Kawai, T., Churg, A., Galateau-Salle, F.B., Hasleton, P., Henderson, D., Roggli, V., Travis, W.D., Cagle, P.T. & Ferrans, V.J. (2002). Expression of telomerase reverse transcriptase (TERT) in malignant mesotheliomas. *Am J Surg Pathol*, **26**, 365-70.
- Leigh, R.A. & Webster, I. (1982). Lymphocytic infiltration of pleural mesothelioma and its significance for survival. *S Afr Med J*, **61**, 1007-9.
- Li, Q., Verschraegen, C.F., Mendoza, J. & Hassan, R. (2004). Cytotoxic activity of the recombinant anti-mesothelin immunotoxin, SS1(dsFv)PE38, towards tumor cell lines established from ascites of patients with peritoneal mesotheliomas. *Anticancer Res*, **24**, 1327-35.
- Lopez-Rios, F., Illei, P.B., Rusch, V. & Ladanyi, M. (2004). Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *Lancet*, **364**, 1157-66.
- Manning, L.S., Whitaker, D., Murch, A.R., Garlepp, M.J., Davis, M.R., Musk, A.W. & Robinson, B.W. (1991). Establishment and characterization of five human malignant mesothelioma cell lines derived from pleural effusions. *Int J Cancer*, **47**, 285-90.
- Nowak, A.K., Lake, R.A., Kindler, H.L. & Robinson, B.W. (2002). New approaches for mesothelioma: biologics, vaccines, gene therapy, and other novel agents. *Semin Oncol*, **29**, 82-96.
- Ordóñez, N.G. (1998a). Value of calretinin immunostaining in differentiating epithelial mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*, **11**, 929-33.

- Ordóñez, N.G. (1998b). Value of cytokeratin 5/6 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma of the pleura from lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, **22**, 1215-21.
- Ordóñez, N.G. (2002). Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesotheliomas: a critical review of old markers, new markers. *Hum Pathol*, **33**, 953-67.
- Ordóñez, N.G. (2003a). The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, **27**, 1031-51.
- Ordóñez, N.G. (2003b). Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Mod Pathol*, **16**, 192-7.
- Orengo, A.M., Spoletini, L., Procopio, A., Favoni, R.E., De Cupis, A., Ardizzoni, A., Castagneto, B., Ribotta, M., Betta, P.G., Ferrini, S. & Mutti, L. (1999). Establishment of four new mesothelioma cell lines: characterization by ultrastructural and immunophenotypic analysis. *Eur Respir J*, **13**, 527-34.
- Parker, C. & Neville, E. (2003). Lung cancer * 8: Management of malignant mesothelioma. *Thorax*, **58**, 809-13.
- Peto, J., Decarli, A., La Vecchia, C., Levi, F. & Negri, E. (1999). The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer*, **79**, 666-72.
- Robinson, B.W., Creaney, J., Lake, R., Nowak, A., Musk, A.W., de Klerk, N., Winzell, P., Hellstrom, K.E. & Hellstrom, I. (2003). Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet*, **362**, 1612-6.
- Robinson, B.W., Robinson, C. & Lake, R.A. (2001). Localised spontaneous regression in mesothelioma -- possible immunological mechanism. *Lung Cancer*, **32**, 197-201.

- Robinson, C., Callow, M., Stevenson, S., Scott, B., Robinson, B.W. & Lake, R.A. (2000). Serologic responses in patients with malignant mesothelioma: evidence for both public and private specificities. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **22**, 550-6.
- Sigalotti, L., Coral, S., Altomonte, M., Natali, L., Gaudino, G., Cacciotti, P., Libener, R., Colizzi, F., Vianale, G., Martini, F., Tognon, M., Jungbluth, A., Cebon, J., Maraskovsky, E., Mutti, L. & Maio, M. (2002). Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications. *Br J Cancer*, **86**, 979-82.
- Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E. & Vieweg, J. (2003). Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res*, **63**, 2127-33.
- Sugarbaker, D.J. & Garcia, J.P. (1997). Multimodality therapy for malignant pleural mesothelioma. *Chest*, **112**, 272S-275S.
- Turner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Brocker, E.B., Steinman, R.M., Enk, A., Kampgen, E. & Schuler, G. (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med*, **190**, 1669-78.
- Treasure, T. & Sedrakyan, A. (2004). Pleural mesothelioma: little evidence, still time to do trials. *Lancet*, **364**, 1183-5.
- Zeng, L., Fleury-Feith, J., Monnet, I., Boutin, C., Bignon, J. & Jaurand, M.C. (1994). Immunocytochemical characterization of cell lines from human malignant mesothelioma: characterization of human mesothelioma cell lines by

immunocytochemistry with a panel of monoclonal antibodies. *Hum Pathol*, **25**, 227-34.

Captions

Figure 1: Isolation of the tumour cells by CCE. CCE of the cells contained in the pleural effusions can represent a possibility of isolating the tumour cells. Indeed, each fraction contains cells of different size. After several days of culture, the cells populations were mainly composed of erythrocytes and lymphocytes for the first fraction (A), lymphocytes and fibroblasts for the second one (B) and tumour cells for the last fraction (C).

Figure 2: Calretinin, vimentin, cytokeratin 5/6 and CEA expressions investigated by confocal microscopy analysis. MPM cell lines express calretinin, vimentin and cytokeratin 5/6. ADK3, an adenocarcinoma cell line, expresses vimentin but not calretinin or cytokeratin 5/6. The ADK3 cell line also weakly expresses CEA, which has not been detected in the majority of the MPM cell lines.

Figure 3: TAAs expressed by the MPM, adenocarcinoma and melanoma cells. The PCR experiments were performed on cDNA obtained from one adenocarcinoma cell line (ADK3), two melanoma cell lines (M136 and BEU), fifteen MPM cell lines and one negative control (no cDNA). β 2-microglobulin was used as a control of the integrity of the cDNAs. PCR products were size-fractionated on a 1,5% agarose gel. None of the MPM cells contained mRNA specific of NY-ESO-1 but 11/15 were positive for mRNA encoding TERT and 3/11 for GAGE3,6,7. Mesothelin mRNAs were detected in all the lines except the melanoma cell

lines. MUC-1 mRNAs were produced by the melanoma and adenocarcinoma cells. Hence, the presence of mRNA encoding MUC-1 and mesothelin was detected in all the MPM cell lines.

Figure 4: Investigation of the protein MUC-1 expression by cytometric flux. Most of the MPM cell lines expressed the protein MUC-1 (9/15), as does the adenocarcinoma line ADK3. By contrast, this protein was not detected at the surface of melanoma and some MPM cell lines (6/15).

Figure 5: Expression of the proteins MUC-1 and mesothelin by the MPM and the adenocarcinoma cells. (A) Confocal analyses revealed that the lines Meso30, 34 and 36 expressed the protein MUC1 in a heterogeneous manner. Indeed, only a part of the cells are positive. (B) Mesothelin is expressed at the surface of some cells for each MPM line. However, an important heterogeneity in the levels of expression by the cells can be noticed. Only a weak signal is detected for the ADK3 line. Hence, the adenocarcinoma cell line expresses the protein mesothelin at a lower level than the MPM cells.

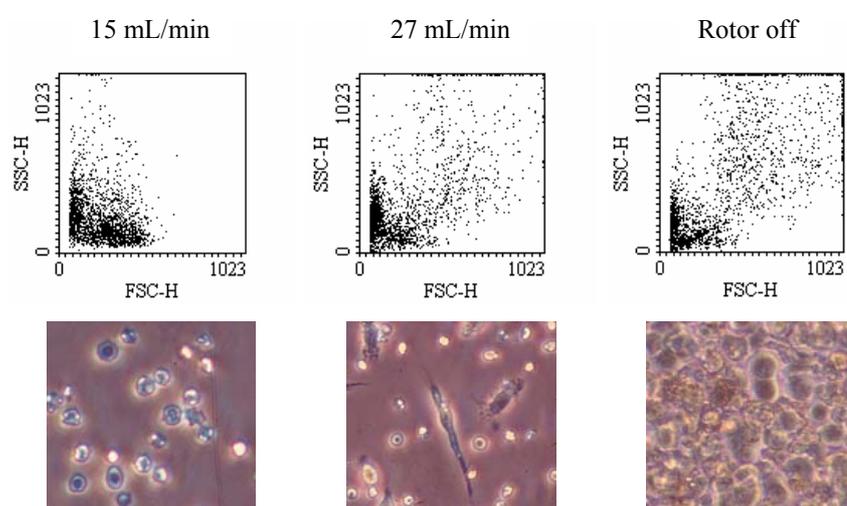


Figure 1: Isolation of the tumour cells by CCE

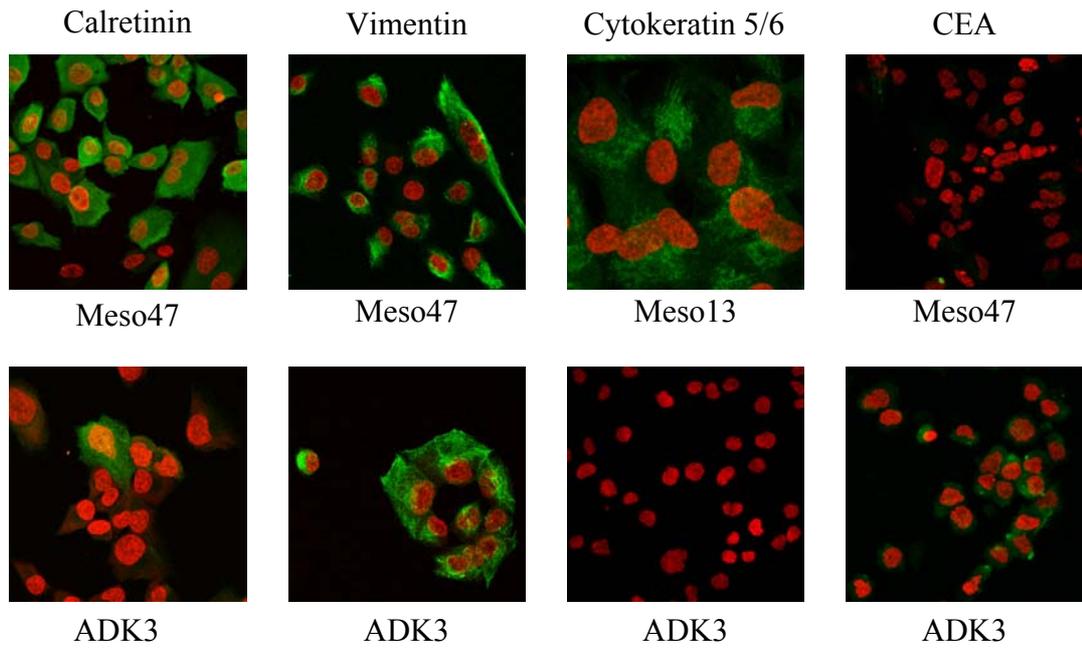
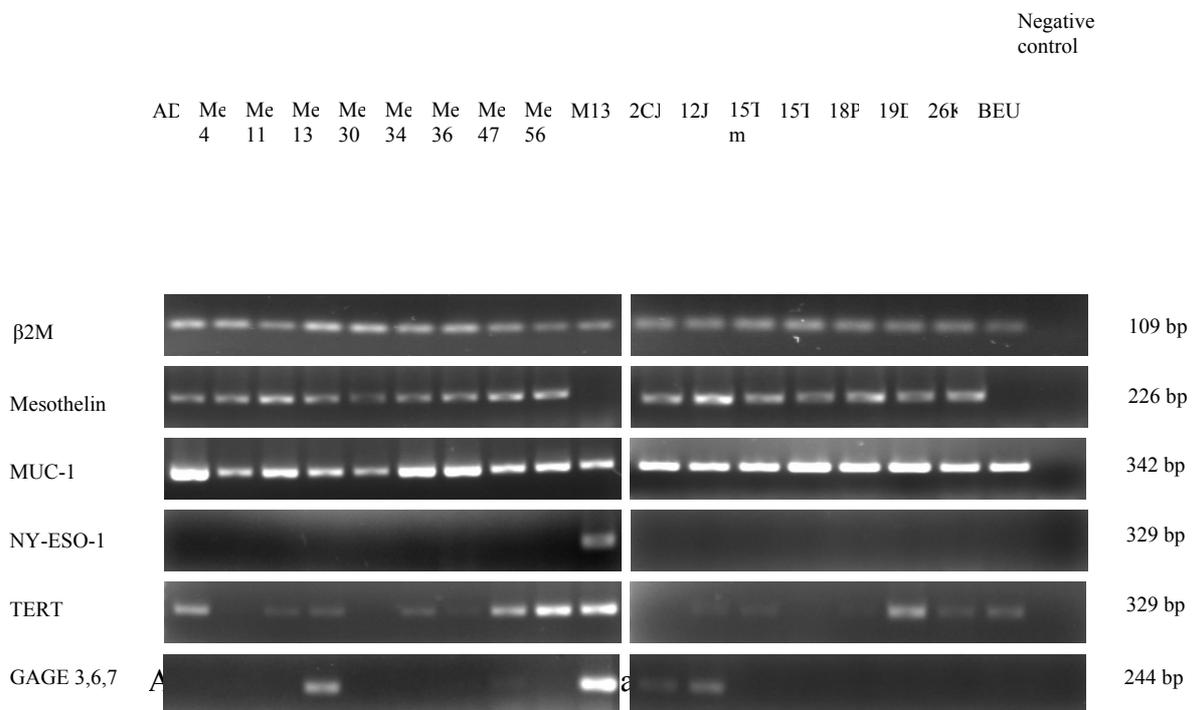


Figure 2: Calretinin, vimentin, cytokeratin 5/6 and CEA expressions investigated by confocal microscopy analysis.



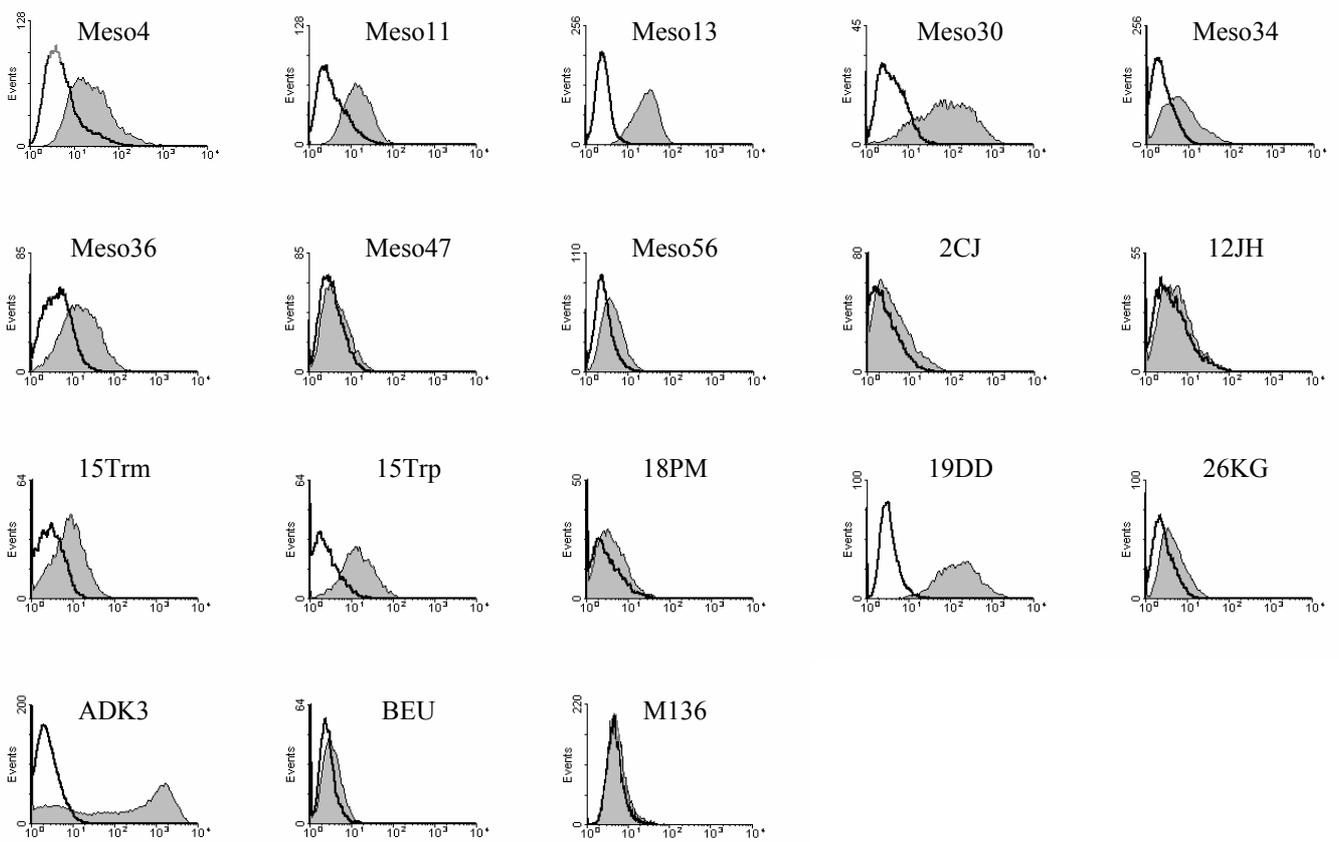


FIGURE 7. Investigation of the protein MUC-1 expression flow cytometry.

MUC-1 (FITC)

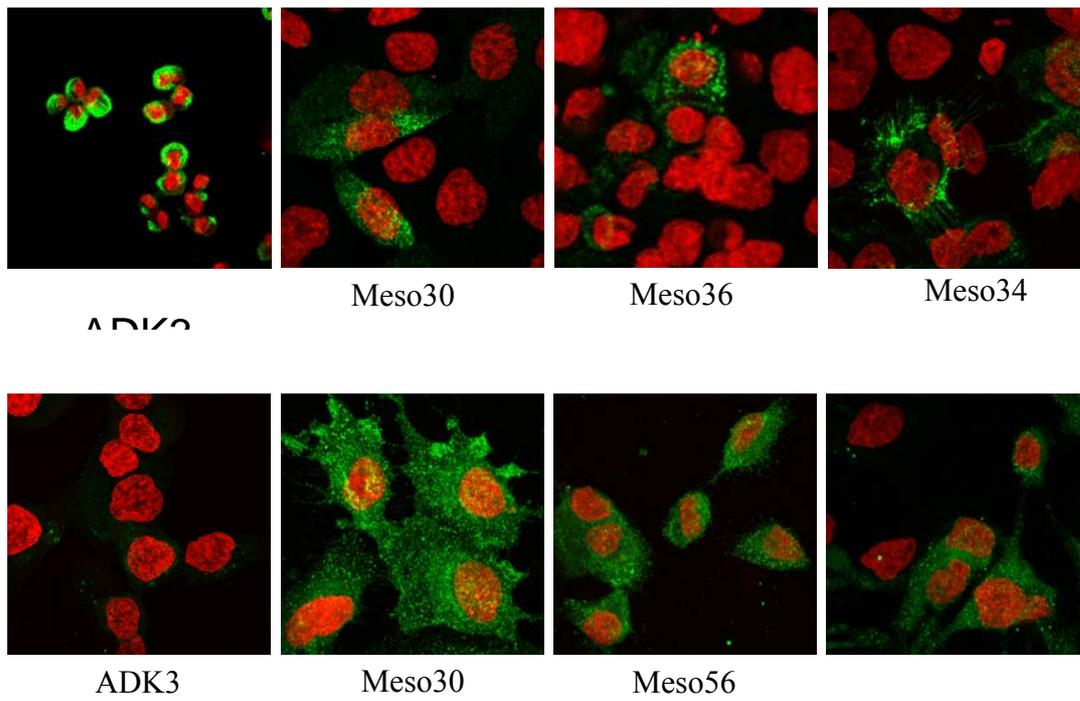


Figure 5: Expression of the proteins MUC-1 and mesothelin by the MPM and the adenocarcinoma cells.

Table 1 : Characteristics of patients

Cell line	Histology	Sex	Age at diagnostic
ADK3	Adenocarcinoma metastasis	M	64
Meso 4	Epithelioid mesothelioma	M	70
Meso 11	Epithelioid mesothelioma	M	78
Meso 13	Epithelioid mesothelioma	M	81
Meso 30	Epithelioid mesothelioma	M	78
Meso 34	Epithelioid mesothelioma	F	77
Meso 36	Epithelioid mesothelioma	M	74
Meso 47	Epithelioid mesothelioma	M	83
Meso 56	Epithelioid mesothelioma	M	79
2CJ	Mesothelioma of biphasic morphology	F	41
12JH	Mesothelioma of biphasic morphology	M	62
15Trm	Epithelioid mesothelioma	M	68
15Trp	Epithelioid mesothelioma	M	68
	Mesothelioma of biphasic morphology		

Table 2: Primers used for PCR experiments

Gene	Primer	Sequence	Annealing temperature	Fragments size
β2-microglobulin	FOR	TTC ACC CCA CTG AAA AAG ATG A	55°C	109 bp
	REV	ACC TCC ATG ATG CTG ATT ACA		
Mesothelin	FOR	AAC GGC TAC CTG GTC CTA G	55°C	226 bp
	REV	TTT ACT GAG CGC GAG TTC TC		
MUC-1	FOR	TGA TGT GCC ATT TCC TTT CTC	55°C	342 bp
	REV	TAC AAG TTG GCA GAA GTG GCT		
NY-ESO-1 (N1)	FOR	<u>ATG GAT GCT GCA GAT GCG</u>	62°C	329 bp
	REV			
<u>G</u>				
NY-ESO-1 (N2)	FOR	GGC TTA GCG CCT CTG CCC TG	62°C	615 and 844 bp
	REV	GCC ATG CAG GCC GAA GGC CAT GGC GAG GTA GAA CTC		
GAGE 1	FOR	GAC CAA GAC GCT ACG TAG	55°C	353 bp
	REV	GCA ATT GTT CAT TAA AAG CC		
GAGE 1-2,7	FOR	GAC CAA GAC GCT ACG TAG	55°C	244 bp
	REV	CCA TCA GGA CCA TCT TCA		
GAGE 3-6,8	FOR	GAC CAA GGC GCT ATG TAC	55°C	244 bp
	REV	CCA TCA GGA CCA TCT TCA		
BAGE	FOR	TGG CTC GTC TCA CTC TGG	56°C	286 bp
	REV	CCT CCT ATT GCT CCT GTT G		
TERT	FOR	AGT TCC TGC ACT GGC TGA TGA GT	62°C	329 bp
	REV	CTC GGC CCT CTT TTC TCT GCG		
SSX-4	FOR	AAA TCG TCT ATG TGT ATA TGA AGC T	53°C	416 bp
	REV	GGG TCG CTG ATC TCT TCA TAA AC		
SSX-2	FOR	GTG CTC AAA TAC CAG AGA AGA TC	55°C	435 bp
	REV	TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G		
MAGE-1	FOR	CGG CCG AAG GAA CCT GAC	62°C	421 bp
	REV	GCT GGA ACC CTC ACT GGG		
MAGE-2	FOR	AAG TAG GAC CCG AGG ACT G	51°C	237 bp
	REV	GAA GAG GAA GAA GCGTCT G		

Table 3: RT-PCR analysis of TAA expressed in adenocarcinoma (ADK3), melanoma (M136 and M44) and MPM cells

Cell lines	genes											
	B2M	Muc-1	Mesothelin	GAGE 1	GAGE1,2,8	GAGE3,6,7	MAGE1	MAGE2	SSX4	BAGE	TERT	NY-ESO-1
ADK3	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-
Meso4	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meso1 1	++	++	++	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Meso1 3	++	++	++	+	+	++	-	-	-	-	+	-
Meso3 0	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meso3 4	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Meso3 6	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Meso4 7	++	++	++	-	+	-	-	-	-	-	++	-
Meso5 6	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-
2CJ	++	++	++	-	+	+	-	-	-	-	-	-
12JH	++	++	++	-	-	++	-	-	-	-	+	-
15Trm	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
15Trp	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18PM	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
19DD	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-
26KG	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
M136	++	++	-	-	++	++	++	+	+	+	++	++
BEU	++	++	-	ND	ND	ND	++	-	ND	ND	ND	ND

III.4. Analyse de la présentation croisée de l'antigène MUC1 à partir de DC ayant phagocyté des cellules mortes de MPM.

Cette étude consiste à analyser la fréquence de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques vis-à-vis de deux peptides de l'antigène MUC1 après sensibilisations par des DC ayant phagocyté des cellules mortes (cellules apoptotiques ou lysat cellulaire) de MPM.

III.4.1. Production de cellules tumorales apoptotiques/oncolysats cellulaires.

Les oncolysats cellulaires ainsi que les cellules apoptotiques sont obtenus à partir de la lignée de mésothéliome Meso13 (HLA-A2-) exprimant l'antigène MUC1.

4 types de préparations cellulaires sont définis dans ce projet comme source d'antigènes de tumeurs pour les DC :

1. Cellules tumorales apoptotiques : celles-ci sont issues d'une exposition UV de 1' sur trans-illuminateur correspondant à une dose approximative de 25 kJ/m².
2. Cellules tumorales apoptotiques exprimant des HSP : Elles sont obtenues en réalisant un stress thermique de 30' à 42°C suivi d'une exposition UV de 25 kJ/m².
3. Oncolysats cellulaires : Ils sont obtenus en faisant subir aux cellules 4 cycles rapides et successifs de congélation/décongélation.
4. Oncolysats cellulaires enrichis HSP : Ils sont issus de cellules ayant subi un choc thermique de 30' à 42°C suivi de 4 cycles rapides de congélation/décongélation.
5. Peptides synthétiques MUC1. Il s'agit des deux peptides restreints à l'allèle HLA*A0201 connus : MUC1₁₂₋₂₀ (LLLTVLTV) et MUC1₉₅₀₋₉₅₈ (STAPPVHNV) (Brossart et al, 1999).

Comme le montre la figure 12, seules les cellules ayant subi une exposition UV consécutivement ou non à un choc thermique sont sujettes à une augmentation des activités

DEVDase au cours du temps, confirmant ainsi que les préparations UV et HS+UV sont bien associées à un processus apoptotique. A l'inverse, seules les cellules ayant subi 4 cycles de congélation/décongélation libèrent de la LDH dans le milieu de culture les associant ainsi à une perméabilité membranaire très importante caractéristique et spécifique au processus nécrotique.

III.4.2. Génération des DC.

Les DC sont générées à partir de monocytes issus du sang de donneurs volontaires sains consentants (HLA-A2+) de l'EFS de Nantes. Les monocytes sont enrichis directement à partir du sang grâce à l'addition de cocktails d'anticorps RosetteSep (Stem Cell Technologies) puis purifiés par centrifugation sur gradient de Ficoll. Les lymphocytes T CD8+, quant à eux, sont purifiés par un tri positif sur colonne magnétique puis comptés et congelés à ce stade en présence de SVF + 10% de DMSO à raison de $50 \cdot 10^6$ de cellules/ml. Comme le montre la figure 13, l'analyse phénotypique des cellules en cytométrie en flux révèle que le taux de purification des monocytes est supérieur à 90 %. Ils sont alorsensemencés dans du milieu X-VIVO15 + 1% Pénicilline/Streptomycine + 1% de L-Glutamine + GM-CSF (500 IU/ml) + IL-4 (50 ng/ml) sur flasque F175 cm² à une concentration de $2 \cdot 10^6$ /ml et à raison de $80 \cdot 10^6$ de cellules par flasque. Des cytokines fraîches seront ajoutées au 4^{ème} jour de culture. A l'issue de 7 jours de culture, les cellules dendritiques immatures seront récupérées, lavées 2 fois et comptées.

III.4.3. Phagocytose de corps apoptotiques/lysats cellulaires.

La phagocytose des cellules apoptotiques/oncolysats cellulaires par les DC s'effectue en ensemencant $2 \cdot 10^6$ DC immatures avec de $4 \cdot 10^6$ de corps apoptotiques tumoraux/oncolysats cellulaires dans 2 ml par puits de milieu RMPI 1640 + 10% de SVF + 1% Pénicilline/Streptomycine + 1% de L-Glutamine + GM-CSF (500 IU/ml) + IL-4 (50 ng/ml) sur plaque PolyMA 12 puits pendant 24 heures. Un témoin négatif de DC non phagocytaires est également réalisé. L'efficacité de phagocytose au cours du temps est alors évaluée parallèlement grâce à l'utilisation de corps apoptotiques/oncolysats cellulaires préalablement marqués au PKH-26. Ainsi, à l'issue de 12, 24, 36 et 48 heures de co-culture,

les DC subissent un marquage anti-CD58 et le taux d'internalisation des corps apoptotiques/oncolysats cellulaires est ainsi estimé quantitativement par cytométrie en flux en déterminant le pourcentage de cellules doubles positives CD58/PKH-26 (Figure 14). Les résultats semblent indiquer que les DC immatures internalisent efficacement les 4 sources d'antigènes de tumeurs indépendamment de la nature de la mort cellulaire.

III.4.4. Maturation expérimentale des DC

La maturation des DC phagocytaires et non phagocytaires est induite grâce à l'addition dans le milieu de culture de la combinaison TNF- α (20 ng/ml) + Poly(I:C) (50 μ g/ml). A l'issue de 24 heures d'un tel traitement, les DC sont alors phénotypées en mesurant le niveau d'expression des marqueurs CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, HLA-DR, DC-SIGN et CCR7. Comme indiqué sur la figure 15, la présence d'oncolysat cellulaire induit une légère maturation spontanée des DC comme le montre l'augmentation de l'expression des molécules CD86 et HLA-ABC, indépendamment du niveau d'expression des HSP. En outre, il faut noter que les DC phagocytaires progressent efficacement dans leur programme de maturation en réponse au TNF- α et au Poly-IC, quelle que soit la stratégie de chargement.

III.4.5. Sensibilisation des lymphocytes T CD8+ autologues

Après phagocytose et maturation, les DC non chargées et chargées en cellules mortes ou en peptides synthétiques sont utilisées pour sensibiliser les lymphocytes T CD8+ autologues. Les DC et les lymphocytes T sont alors co-cultivés en plaque 96 puits à fond rond en présence d'IL-6 et d'IL-12 au cours de la première stimulation, et en présence d'IL-2 et d'IL-7 pour les 2 stimulations suivantes. La fréquence des lymphocytes T spécifiques vis-à-vis des deux peptides de MUC1 est estimée à l'issue de la 2^{ème} et de la 3^{ème} stimulation via l'analyse de la sécrétion de TNF- α en réponse à ces deux peptides présentés par la lignée T2 (TAP déficiente). Comme indiqué sur la figure 16, la stimulation des lymphocytes T naïfs par les DC chargées en peptides de MUC1 est efficace comme le montre la sécrétion significative de TNF- α en réponse aux deux peptides. L'analyse des populations cellulaires par cytométrie en flux par double marquage CD8+/IFN- γ confirme la présence de lymphocytes T spécifiques de MUC1 à hauteur de 22 % pour le peptide MUC1₁₂₋₂₀ et 3 % pour le peptide MUC1₉₅₀₋₉₅₈.

En revanche, seul le peptide MUC1₉₅₀₋₉₅₈ s'avère être efficacement cross-présenté par les DC après phagocytose de lysat, indépendamment de la présence d'HSP comme le montre la sécrétion de TNF- α après la 3^{ème} stimulation. En outre, la présence de lymphocytes T anti-MUC1₉₅₀₋₉₅₈ après sensibilisation par des DC chargées en lysat cellulaire est confirmée par cytométrie en flux puisque 1.7% de la suspension cellulaire produit de l'IFN- γ en réponse à ce peptide. En revanche, aucune fréquence de lymphocytes T spécifique du peptide MUC1₁₂₋₂₀ n'a pu être détectée par présentation croisée quelle que soit la nature de la source d'antigène de tumeurs (Figure 17).

III.4.6. Conclusion

D'après ces résultats, nous avons réussi à démontrer la faisabilité de cross-présenter l'antigène MUC1₉₅₀₋₉₅₈ par DC ayant phagocyté du lysat cellulaire et ceci indépendamment du niveau d'enrichissement en HSP. Toutefois, il semble que cette présentation croisée soit sélective à l'épitope MUC1₉₅₀₋₉₅₈ et non à l'épitope MUC1₁₂₋₂₀. Comme discuté plus tard dans la partie Discussion, il s'avère que le peptide MUC1₁₂₋₂₀ est en fait le peptide signal de la protéine très proche de l'extrémité N-terminale et peut de ce fait ne pas être apprêter.

Les DC chargées en cellules apoptotiques stressés ou non, quant à elles, sont inefficaces en terme de cross-activation de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques vis-à-vis des deux peptides connus de MUC1 restreint à l'élément HLA*A0201. Toutefois, cela ne signifie pas qu'elles soient incapables de cross-présentation d'autres épitopes de MUC1 dans le même ou dans d'autres contexte HLA. Une possibilité pour répondre à cette question serait d'analyser la réactivité des lymphocytes T sensibilisés par DC chargées en corps apoptotiques contre des cellules COS-7 transfectées avec les gènes MUC1 et HLA*A0201.

III.5. Analyse de la présentation croisée des antigènes Melan-A/MART-1, gp-100 et NA17-A à partir de DC ayant phagocyté des cellules mortes de mélanome (Collaboration avec l'équipe du prof. F. Jotereau).

Ce projet a pour but d'étudier la faisabilité de cross-activer des lymphocytes CD8+ spécifiques vis-à-vis des antigènes de tumeurs Melan-A/Mart-1, gp-100 et NA17-A par des DC ayant phagocyté du lysat cellulaire de mélanome.

III.5.1. Sources d'antigènes de tumeurs.

La source d'antigènes de tumeurs consiste en du lysat cellulaire de mélanome phagocyté au stade immature par les DC dont la pertinence sera comparée aux peptides synthétiques Melan-A/MART-1₂₆₋₃₅, gp-100₂₈₀₋₂₈₈ et NA17-A₁₋₉ chargés de manière exogène sur les molécules HLA*A0201 des DC après maturation. Le lysat cellulaire est obtenu à partir de la lignée de mélanome M136 (HLA-A2-) exprimant les 3 antigènes de tumeurs gp100, NA17A et Melan-A^{MART-1} après 4 cycles rapides de congélation/décongélation. Comme le montre la figure 18 cette préparation cellulaire est positive pour l'IP et négative pour l'annexine-V suggérant ainsi une perméabilité membranaire très importante caractéristique et spécifique à un processus nécrotique.

III.5.2. Génération des DC.

Les DC sont générées à partir de monocytes issus du sang de donateurs volontaires sains consentants (HLA-A2+) de l'EFS de Nantes. Les monocytes sont purifiés à partir de la suspension cellulaire grâce à une centrifugation à contre courant permettant la séparation des cellules selon leur taille. Les lymphocytes T CD8+, quant à eux, sont purifiés par un tri positif sur colonne magnétique puis comptés et congelés à ce stade en présence de SVF et de 10% de DMSO à raison de $50 \cdot 10^6$ de cellules/ml. Comme le montre la Figure 19, l'analyse des cellules par cytométrie en flux révèle que les taux de purification des monocytes et des

lymphocytes T CD8⁺ sont supérieurs à 90 %. Les monocytes sont alors ensemencés dans du milieu X-VIVO15 + 1% Péniciline/Streptomycine + 1% de L-Glutamine + GM-CSF (500 IU/ml) + IL-4 (50 ng/ml) dans des flasque F₁₇₅ cm² à une concentration de 2.10⁶/ml et à raison de 80.10⁶ de cellules par flasque. Des cytokines fraîches seront ajoutées au 4^{ème} jour de culture. A l'issue de 7 jours de culture, les cellules dendritiques immatures sont récupérées, lavées 2 fois et comptées.

III.5.3. Phagocytose de lysats cellulaires.

La phagocytose du lysat cellulaire de mélanome par les DC immatures s'effectue en ensemencant 2.10⁶ DC immatures avec 4.10⁶ de cellules lysées dans 2 ml par puits de milieu RPMI1640 + 10%SVF + 1% Péniciline/Streptomycine + 1% de L-Glutamine + GM-CSF (500 IU/ml) + IL-4 (50 ng/ml) sur plaque PolyMA 12 puits pendant 24 heures. Un témoin négatif de DC non phagocytaires est également réalisé. L'efficacité de phagocytose est alors évaluée de manière parallèle grâce à l'utilisation de cellules lysées préalablement marquées au PKH-26. Ainsi, à l'issue de 24 heures de phagocytose, les DC subissent un marquage anti-HLA-DR et le taux d'internalisation du lysat cellulaire est ainsi estimé quantitativement par cytométrie en flux en déterminant le pourcentage de cellules HLA-DR/PKH-26 doubles positives. Comme indiqué sur la Figure 21, le lysat cellulaire est efficacement phagocyté par les DC immatures après 24 heures de co-culture comme le montre les 65% de cellules HLA-DR+/PKH26+. L'internalisation du lysat cellulaire M136 par les DC immatures à 24 heures est également confirmée par microscopie confocale (Figure 20).

III.5.4. Maturation expérimentale des DC

La maturation des DC phagocytaires et non phagocytaires est induite grâce à l'addition dans le milieu de culture de la combinaison TNF α (20 ng/ml) + Poly(I:C) (50 μ g/ml). A l'issue de 24 heures d'un tel traitement, le phénotype des DC est réalisé en évaluant le niveau d'expression des marqueurs CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, HLA-DR, DC-SIGN et CCR7 par cytométrie en flux. Comme indiqué sur la figure 21, les DC non pulsées progressent efficacement dans leur stage de maturation en réponse à la combinaison TNF α + Poly(I:C) en 48 heures comme le montre l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation

CD80 et CD86, ainsi que des molécules de présentation HLA-ABC et HLA-DR. Par ailleurs, la co-culture des DC avec le lysat cellulaire M136 promeut la capacité des DC à répondre subséquentement à la combinaison TNF α + Poly(I:C).

III.5.5. Sensibilisation des lymphocytes T CD8+ autologues

Après phagocytose et maturation, les DC non chargées et chargées en lysat cellulaire ou avec les peptides synthétiques sont utilisées pour sensibiliser les lymphocytes T CD8+ autologues. Dans ce but, les DC et les lymphocytes T CD8+ sont co-cultivés en plaque 96 puits à fond rond en présence d'IL-6 (5 ng/mL) et d'IL-12 (5 ng/mL) au cours de la première stimulation et d'IL-2 et d'IL-7 pour les 3 stimulations suivantes. La fréquence des lymphocytes T spécifiques vis-à-vis des 3 antigènes de mélanome est alors estimée par cytométrie en flux à l'issue de chaque stimulation grâce à l'utilisation de molécules HLA*A0201-peptides solubles A*0201-Melan-A₂₆₋₃₅, A*0201-NA17-A₁₋₉ et A*0201-gp-100₂₈₀₋₂₈₈. Comme indiqué sur la figure 22, la fréquence des lymphocytes T spécifiques au cours des sensibilisations par les DC chargées en peptides varie en fonction du nombre de stimulations. En effet, la fréquence la plus élevée de lymphocytes T anti-Melan-A/MART-1 et anti-NA17-A apparaissent à la deuxième stimulation, alors qu'elle est obtenue à la 4^{ème} stimulation pour les lymphocytes T anti-gp100. En revanche, aucune activation significative de T spécifiques n'a pu être observée au cours des stimulation par DC chargées en lysat cellulaire de mélanome dont les marquages tétramères sont très proches de ceux obtenus avec les DC non chargées.

III.5.6. Conclusion

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence une très forte efficacité des DC chargées en peptide à stimuler les lymphocytes T CD8+ spécifiques vis-à-vis des antigènes Melan-A/MART-1, NA17-A et gp-100. En revanche, ces résultats semblent remettre en question la faisabilité de cross-présenter les antigènes dans nos conditions expérimentales. Nous émettons comme hypothèse que l'incapacité des DC phagocytaires à cross-activer les lymphocytes T spécifiques peut être due à :

- (i) la très faible densité des complexes CMH-peptides exprimés à la surface des DC défavorisant ainsi une interaction optimale avec les lymphocytes T.
- (ii) l'incapacité des DC à présenter correctement les peptides antigéniques sur les molécules HLA de classe I. En effet, des études ont d'ores et déjà rapporté l'incapacité du protéasome des DC à apprêter l'antigène Melan-A/MART-1 (Morel et al., 2000).
- (iii) la très faible fréquence de précurseurs de lymphocytes T naïfs, c'est le cas de NA17-A.
- (iv) le statut de maturation des DC phagocytaires qui n'est peut être pas adapté à la présentation croisée.

En effet, nous avons pour projet d'optimiser nos conditions expérimentales. Il semble que l'engagement du CD40 soit un signal de maturation indispensable à la présentation croisée de certains antigènes de tumeurs tel NYESO-1 (Schnurr et al., 2004). De même, nous envisageons de réaliser nos sensibilisations de lymphocytes T CD8⁺ avec des lymphocytes T CD4⁺ dont la présence est également documentée pour être indispensable au phénomène de présentation croisée (Bennett et al., 1997; Machy et al., 2002).

III.6. Analyse de l'activité immunosuppressive d'un composé de carboxamide (JM34) sur la maturation des DC (Collaboration avec l'équipe du prof. F. Lang).

ARTICLE 4: A new carboxamide compound exerts immunosuppressive activity by inhibiting dendritic cell maturation. Eur. J. Immunol (in press). D. Carbonelle*, **F. Ebstein***, C. Rabu, J.Y. Petit, M. Grégoire and F. Lang.

* Both authors contributed equally

Résumé :

Dans cette étude, nous démontrons les propriétés immunosuppressives d'un dérivé de benzamide, le JM34. Contrairement aux drogues immunosuppressives classiques, le JM34 n'affecte ni la production de cytokines, ni l'expression du récepteur à l'IL-2 de clones T activés et n'exerce qu'une inhibition modérée de la prolifération des lymphocytes T induite par l'IL-2 ou par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Nous avons par conséquent analysé les effets de cette molécule sur l'activation des DC *in vitro*. La présence de JM34 pendant le processus de maturation des DC inhibe l'expression de quelques marqueurs de maturation : plus particulièrement, l'induction des molécules de CMH est complètement inhibée et l'expression du CD83 significativement réduite, tandis que l'augmentation de l'expression des marqueurs CD86, CD83 et CD40 est moins affectée. Par ailleurs, les DC traitées par le JM34 montrent une sécrétion d'IL-12 moins importante et une capacité de présentation d'antigènes aux lymphocytes T significativement amoindrie *in vitro*. Nous démontrons que ces altérations induites par le JM34 sont associées à une inhibition marquée de la translocation nucléaire de NF- κ B. En conclusion, ces résultats suggèrent que le JM34 inhibe l'activation lymphocytaire en ciblant les DC et représente une nouvelle classe d'agents thérapeutiques dans le domaine des transplantations et des maladies auto-immunes.

Commentaires :

Nous avons préalablement rapporté le potentiel immunosuppresseur du JM34 *in vitro* en démontrant l'inhibition dose-dépendante de la prolifération des PBMC induite par la PHA et/ou une stimulation allogénique. Toutefois, dans la mesure où les deux tests nécessitent la présence d'APC, nous ne pouvions discriminer entre une inhibition des capacités de stimulation des APC ou une inhibition directe de l'activation T.

Une maturation optimale nécessite typiquement 3 stimuli distincts : (1) produits de pathogènes (LPS, CpG, ADN) reconnus par les TLR ; (2) cytokines pro-inflammatoires et (3) des signaux dépendants des lymphocytes T. Nos résultats montrent que JM34 inhibe la maturation des DC induite par chacun de ces 3 types de signaux : LPS, TNF- α + Poly-IC et CD40L. Ceci suggère que le JM34 inhibe une voie de signalisation commune à ces 3 stimuli. Les TLR, le récepteur de l'IL-1, les récepteurs TNF et CD40 conduisent à l'activation des voies de signalisation impliquant les MAP kinases et le facteur de transcription NF- κ B. Par ailleurs, il a été rapporté que les voies impliquant ERK1/2 et PI3K étaient impliquées dans la survie des DC, alors que p38 et IKK- β étaient plutôt critiques pour la maturation des DC. Nous avons montré précédemment que le JM34 inhibait l'activation des ERK induite par les PKC dans les M ϕ , mais ce n'est vraisemblablement pas le cas pour les DC. Ici, nous prouvons que le JM34 inhibe significativement la translocation de NF- κ B induite par la maturation qui pourrait compter pour son impact sur la maturation des DC et son effet mineur sur l'activation T. Des investigations ultérieures sur la voie de phosphorylation de I κ B seront nécessaires pour déterminer la cible précise du JM34. En conclusion, nous démontrons dans cette étude que le JM34 inhibe les réponses prolifératives T en ciblant principalement les DC. Cette famille de molécules montre une capacité d'immunosuppression originale et autorise une nouvelle approche thérapeutique pour les maladies auto-immunes et le rejet de greffes.

IV. Discussion-Perspectives

La recherche de traitements efficaces contre le cancer répond à une priorité en santé publique du fait du faible taux de réponses aux thérapeutiques existantes. En effet, le constat d'une efficacité très relative des traitements conventionnels anti-cancéreux à un stade avancé est à l'origine d'un regain d'intérêt pour l'immunothérapie. Au sein du laboratoire, il a été démontré qu'une immunothérapie curative par injection de cellules mortes entraîne la régression de tumeurs établies et favorise la mise en place d'une mémoire immunitaire (Boisteau et al., 1997) (Henry et al., 1999).

D'autres travaux ont également démontré que les corps apoptotiques peuvent être une source d'antigènes de tumeurs pour la présentation croisée de peptides, tant pour l'activation de lymphocytes T CD8⁺ que pour leur inhibition (tolérance) (Albert et al., 1998b; Steinman et al., 2000). Cependant, les conditions aboutissant à l'une ou à l'autre de ces réponses sont encore largement méconnues. Les premières études portant sur l'impact des cellules mourant par apoptose sur les phagocytes et leurs conséquences en terme de présentation antigénique avaient conduit à une vision très controversée. Les travaux de Voll et Fadok suggéraient en effet que la phagocytose des cellules apoptotiques permettait de limiter la réponse inflammatoire des MØ, et conduisait à une inhibition de toute réponse immunitaire (Fadok et al., 1998; Voll et al., 1997). En contrepartie, d'autres groupes ont rapporté la capacité des cellules apoptotiques à générer une inflammation, à maturer des DC et à fournir des antigènes dans le cadre des réponses auto-immunes et anti-tumorales (Ronchetti et al., 1999; Rovere et al., 1998). Ces résultats très divergents ont placé la phagocytose de corps apoptotiques et plus largement des cellules mortes au carrefour entre inflammation et anti-inflammation, entre activation et inhibition des réponses immunitaires.

Selon P Matzinger, l'apoptose n'exprime pas de signal danger et ne permet pas d'activer les cellules effectrices du système immunitaire (Gallucci et al., 1999; Gallucci and Matzinger, 2001). L'absence d'inflammation locale est elle même attribuée aux cellules mourant par apoptose ou aux phagocytes qui libèrent des facteurs anti-inflammatoires. L'une des hypothèses qui pourrait expliquer la tolérance versus l'activation générée après phagocytose de matériel apoptotique serait la nature de l'agent inducteur d'apoptose elle même. En effet, selon les modes d'induction d'apoptose, nous avons spéculé qu'il serait possible de moduler l'immunogénicité des corps apoptotiques utilisés comme vaccins anti-tumoraux. Lors du processus apoptotique, les cellules subissent des modifications morphologiques et métaboliques dont les variations peuvent avoir des conséquences immunologiques non négligeables. Plus particulièrement, les inducteurs d'apoptose conduisant à la surexpression d'HSP sont potentiellement pertinents car susceptibles de fournir les signaux dangers

requis pour une réponse immunitaire. En effet, l'HSP70 est aujourd'hui considérée comme un signal danger permettant l'activation et la maturation des DC (Kuppner et al., 2001). En outre, l'association entre immunogénicité des cellules tumorales et l'expression des HSP70 est désormais clairement établie (Clark and Menoret, 2001) (Srivastava and Udono, 1994).

C'est pourquoi, nous avons dans un premier temps étudié différents modes d'induction d'apoptose et comparé l'expression de l'HSP70 en terme d'efficacité anti-tumorale dans un modèle colo-rectal de rat. Nos résultats montrent que des injections répétées de corps apoptotiques stressés exprimant l'HSP70 obtenus à partir d'un choc thermique suivi d'une exposition aux UV inhibent significativement la croissance tumorale chez tous les rats. A contrario, la vaccination des rats avec des corps apoptotiques dépourvus d'HSP70 issus d'une simple exposition des cellules tumorales aux UV semble induire une tolérance immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Il apparaît par conséquent que les cellules apoptotiques exercent des influences variées sur la réponse immunitaire en fonction des stratégies d'induction utilisées. Ce double constat indique que les corps apoptotiques d'une même cellule n'ont pas de rôle immunologique unique, et peuvent donc être manipulés de manière à orienter la réponse immunitaire (Figure 23).

L'expression de l'HSP70 dans les cellules apoptotiques a déjà été rapportée comme un élément important pour la réponse immunitaire (Feng et al., 2002b; Feng et al., 2001). Les mécanismes expliquant le rôle des HSP présentes au sein des corps apoptotiques ne sont pas cependant clairement établis. Quelle que soit la stratégie d'induction d'apoptose, l'injection de corps apoptotiques produits *ex vivo* puis injectés en sous cutané, sont efficacement phagocytés par les DC et transportés jusqu'aux sites ganglionnaires. Il est important de noter que seules les DC ayant phagocyté des cellules apoptotiques stressées (HSP70+) ont la capacité de maturer en réponse au Poly-IC. Le degré de maturation déterminant les capacités subséquentes de sensibilisation et stimulation lymphocytaire, il est possible que l'incapacité des DC ayant phagocyté des cellules apoptotiques (HSP70-) à induire des réponses anti-tumorales soit associée à l'incapacité de celles-ci à maturer en réponse au Poly-IC. Un autre paramètre intéressant à considérer est que, seules les cellules apoptotiques HSP70- sécrètent du TGF- β qui est une cytokine immunosuppressive (Chen et al., 2001a). En fait, nos résultats montrent que c'est précisément celle-ci qui entrave l'activation des DC. En effet, l'utilisation des anticorps neutralisant anti-TGF- β restaure la capacité des DC chargées en cellules apoptotiques (HSP70-) à maturer en réponse au Poly-IC. Il est donc vraisemblable que le pouvoir maturant des cellules apoptotiques stressées soit associé à l'extinction du TGF- β plutôt qu'à l'augmentation de l'expression de l'HSP70. D'ailleurs, l'exposition des DC à des corps apoptotiques stressés HSP70+ n'induit de maturation spontanée des DC, suggérant de ce fait que l'HSP70 libérée

par les corps apoptotiques ne fixe pas les récepteurs CD91, TLR-2 ou TLR-4 dont l'engagement est supposé entraîner un programme de maturation. L'ensemble de ces résultats tend à conclure que l'HSP70 exprimée par les cellules apoptotiques stressées ne joue aucun rôle actif sur le processus de maturation des DC.

Il est, en effet, beaucoup plus concevable que le pouvoir immunogène de corps apoptotiques stressés se situe au niveau de la capacité de l'HSP70 à faciliter le trafic des épitopes dans la voie présentation de CMH de classe I, comme rapporté précédemment (Srivastava et al., 1994).

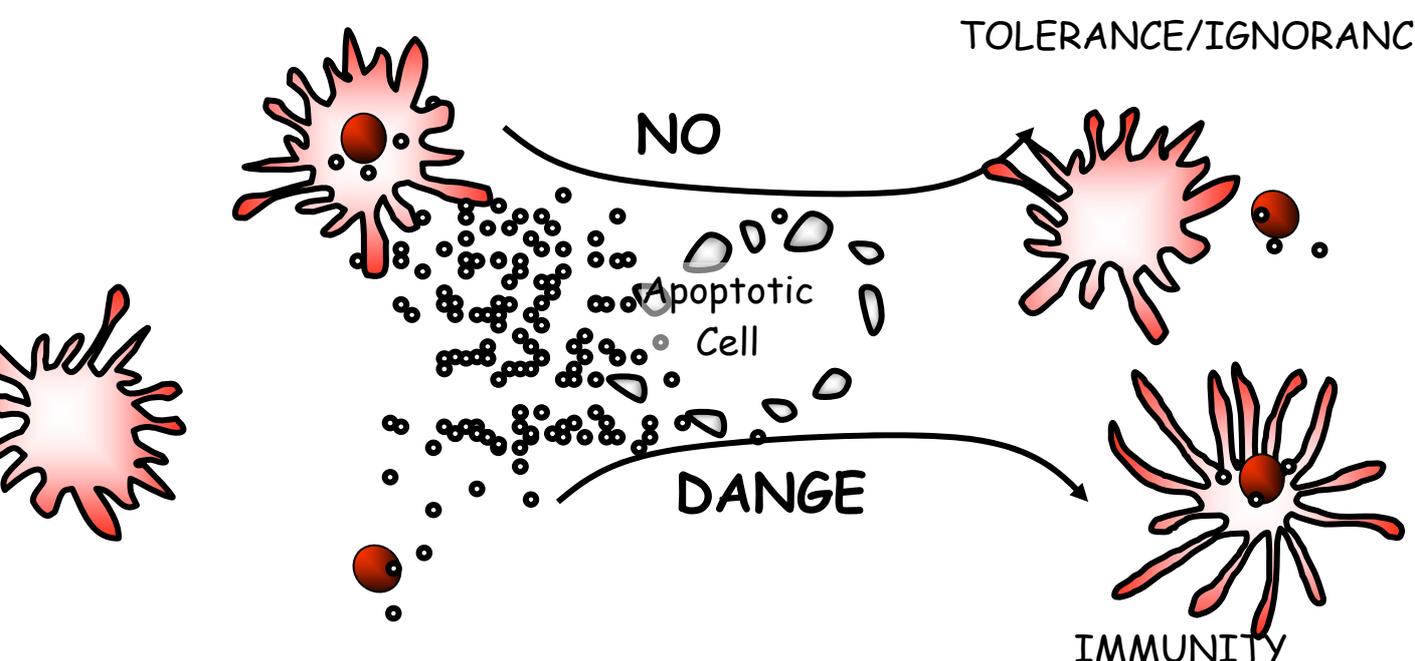


Figure 23 : Phagocytose des cellules apoptotiques et leurs conséquences potentielles pour la réponse immunitaire.

Dans un deuxième temps, nous avons confirmé la pertinence de l'utilisation de cellules apoptotiques exprimant l'HSP70 dans un modèle humain de MPM. Le MPM est un cancer d'incidence croissante et de mauvais pronostic dont le développement corrèle très étroitement avec l'exposition prolongée à l'amiante (Wagner et al., 1960) (Selikoff et al., 1965). Malheureusement, les traitements conventionnels impliquant la chirurgie, radiothérapie ou chimiothérapie s'avèrent inefficaces contre ce type de tumeur (Boutin et al., 1998) (Curran et al., 1998). De même, le potentiel

très limité des thérapies basées sur l'injection de cytokines recombinantes telles l'IL-2 (Castagneto et al., 2001) (Astoul et al., 1993), l'IL-12 (Caminschi et al., 1998) ou l'IFN γ (Boutin et al., 1998) sur la prolongation de la survie des patients souligne la nécessité d'envisager d'autres alternatives thérapeutiques. Dans cette étude, nous montrons la faisabilité de générer, dans des conditions allogéniques, des réponses T cytotoxiques spécifiquement dirigées contre des tumeurs de MPM via la stimulation de PBL naïfs par des DC ayant phagocyté des corps apoptotiques stressés (HSP70+). A l'instar des résultats obtenus dans le modèle de rat, il est vraisemblable que l'HSP70 ne joue pas de rôle majeur dans le processus de maturation des DC. En effet, les deux préparations apoptotiques sont équivalentes quant à leur impact sur la sensibilité des DC à répondre à la combinaison TNF α + Poly-IC. Il est une nouvelle fois plus vraisemblable que l'HSP70 intervienne dans l'initiation de la réponse immunitaire en facilitant le trafic des peptides antigéniques vers la voie de présentation de CMH de classe I. Nous spéculons que l'HSP70 grâce à ses propriétés d'interactions avec les peptides antigéniques (Srivastava and Udono, 1994; Udono and Srivastava, 1993) cible ses récepteurs LOX-1, SR-A ou CD91 favorisant ainsi le recrutement massif de matériel antigénique par la DC, comme indiqué sur la figure 24.

Ainsi, grâce aux propriétés immunostimulatrices de cette protéine sur les DC, on peut envisager l'utilisation de corps apoptotiques exprimant celle-ci pour le développement d'une nouvelle génération de vaccins thérapeutiques et prophylactiques contre le cancer. Ce travail démontre que l'adjonction de l'HSP70 aux corps apoptotiques peut être la source antigénique idéale pour les immunothérapies futures.

Nous avons ensuite procédé à la recherche de marqueurs tumoraux exprimés par nos lignées cellulaires de MPM. La principale découverte de ce travail est l'expression fréquente des antigènes MUC1 et mésothéline. La mésothéline est un antigène de différenciation dont l'expression a déjà été rapportée dans les mésothéliomes (Chang and Pastan, 1996), cancers pancréatiques (Thomas et al., 2004), et les carcinomes ovariens (Muminova et al., 2004). Récemment, Thomas et collaborateurs sont parvenus à identifier 6 peptides antigéniques dérivés de la mésothéline (A2₍₂₀₋₂₈₎, A2₍₅₃₀₋₅₃₈₎, A3₍₈₃₋₉₁₎, A3₍₂₂₅₋₂₃₃₎, A24₍₄₃₅₋₄₄₃₎ et A24₍₄₇₅₋₄₈₃₎) et à démontrer leur pertinence immunologique anti-tumorale pour l'induction de CTL spécifiques par des vaccins protéiques ou peptidiques chez des patients atteints de cancer pancréatique (Thomas et al., 2004). Naturellement, l'étude la réactivité de lymphocytes T anti-mésothéline vis-à-vis des lignées de MPM exprimant cet antigène est actuellement en cours au laboratoire.

Quant à MUC1, il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type I qui est exprimée à la surface apicale de la plupart des épithéliums simples comme les glandes mammaires. Cette protéine est sur-exprimée et déglycosylée dans de nombreux types de tumeurs telles le sein (McGuckin et al., 1995), le myélome multiple (Takahashi et al., 1994), le carcinome rénal (Langner et al., 2004), le carcinome ovarien (Feng et al., 2002a) ou bien encore le lymphome (Dyomin et al., 2000). En effet, cet antigène est connu pour permettre l'induction de réponses immunitaires cellulaire et humorale chez une proportion importante de patients atteints de tumeurs exprimant MUC1 comme le myélome multiple (Choi et al., 2004). Ainsi, ces résultats bien que préliminaires suggèrent que la conception d'une immunothérapie active basée sur MUC1 pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse pour le traitement de patients atteints de MPM.

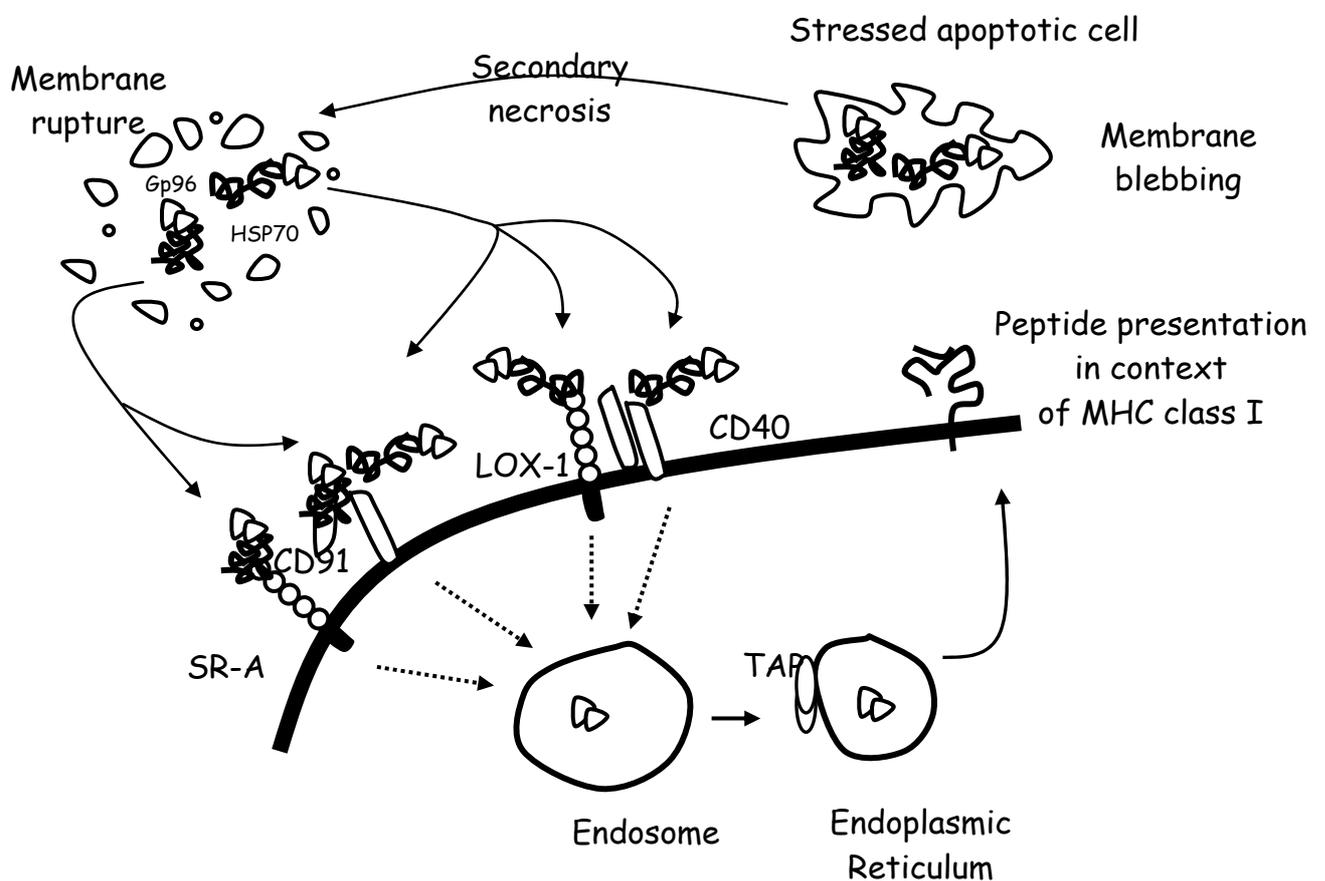


Figure 24 : Modèle proposé de recrutement des antigènes exogènes dérivés des cellules apoptotiques enrichies en HSP.

Nous avons donc par la suite étudié la présentation croisée de deux peptides de MUC1 (MUC1₁₂₋₂₀ et MUC1₉₅₀₋₉₅₈) par des DC ayant phagocyté cellules apoptotiques et oncolysats cellulaires de MPM enrichies ou pas en HSP70, selon que les cellules tumorales aient subi un choc thermique de 30' à 42°C avant exposition aux UV ou 4 cycles rapides de congélation/décongélation, respectivement. Dans les résultats présentés dans ce mémoire, les oncolysats cellulaires ont une activité maturante quel que soit le niveau d'enrichissement en HSP70 suggérant ainsi que cette protéine ne soit pas directement impliquée dans la promotion d'un quelconque processus d'activation. Ces données sont en désaccords avec des études rapportant que l'immunogénicité des lysats est associée à leur capacité à relarguer des HSP permettant l'activation et la maturation des DC (Basu et al., 2000; Somersan et al., 2001). Toutefois, plus récemment, le rôle de l'HSP70 dans l'induction d'un programme de maturation est devenu de plus en plus controversé, notamment grâce à une étude rapportant que l'effet maturant de cette protéine était uniquement due à des contaminations par des endotoxines (Bausinger et al., 2002).

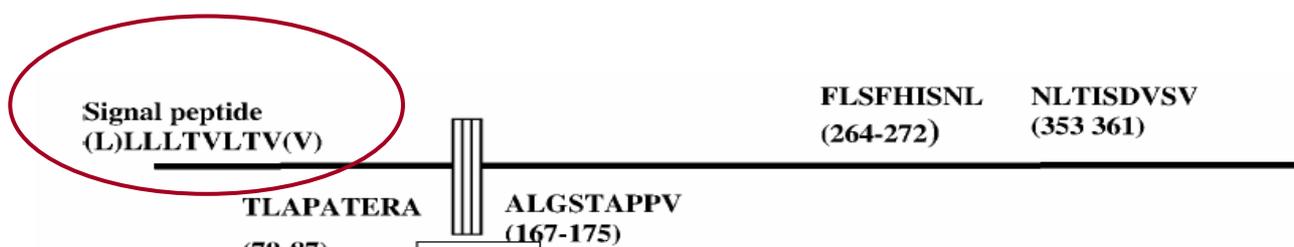
Dans cette étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présentation croisée d'aucun des deux épitopes connus de MUC1 restreints à l'haplotype HLA*A0201 par DC phagocytaires de corps apoptotiques de MPM quel que soit le niveau d'expression de l'HSP70. Toutefois, cela ne signifie pas qu'il n'y ait pas présentation croisée d'autres épitopes de MUC1. En effet, dans des études plus récentes, au cours de sensibilisations par DC ayant phagocyté des corps apoptotiques HSP70+, nous avons réussi à détecter des lymphocytes T anti-MUC1 en utilisant comme cibles des cellules COS-7 transfectées par les gènes MUC1 et HLA*A0201 (résultats non montrés). Il semblerait ainsi que les DC appréhendent les antigènes issus de la phagocytose de cellules apoptotiques de façon à donner naissance à des épitopes différents que ceux actuellement connus. Naturellement, ces résultats préliminaires réclament des expériences plus approfondies comme le clonage des lymphocytes T réactifs vis-à-vis des cellules COS-7 exprimant MUC1 et HLA*A0201 afin de pouvoir déterminer la (ou les) séquence(s) peptidique(s) des épitopes cross-présentés.

Quant à l'oncolysat cellulaire comme source d'antigènes de tumeurs pour les DC, seule la présentation croisée de l'épitope MUC1₉₅₀₋₉₅₈ a pu être détectée. L'augmentation sélective de fréquence des lymphocytes T CD8+ contre ce peptide présent au sein de séquences répétées de la protéine MUC1 mature, peut être en partie attribuée à des différences dans la capacité des DC à cross-présenter différentes classe d'épitopes. La polarisation vers la présentation croisée de l'épitope MUC1₉₅₀₋₉₅₈ peut être une conséquence d'une incapacité spécifique à cross-présenter des épitopes présents au sein d'un peptide signal, ou peut refléter un effet négatif de la localisation de l'épitope en position N-terminale (Wolkers et al., 2004). En effet, il est important de noter que l'épitope MUC1₁₂₋

²⁰ qui n'est pas cross-présenté provient du peptide signal de la protéine (Figure 26). Potentiellement, les peptides sigaux interagissent avec des facteurs cellulaires qui peuvent réduire leur accessibilité à la voie de présentation de CMH de classe I. Alternativement, si la présentation exogène implique le transfert d'antigènes non apprêtés, c'est vraisemblablement inefficace pour les molécules qui sont rapidement dégradées après leur synthèse. Dans la mesure où les réponses T reposent souvent sur le phénomène de présentation croisée, la compréhension des mécanismes qui détermine l'efficacité de la présentation exogène est importante dans l'amélioration de la conception des vaccins.

Enfin, la dernière partie de ce mémoire est dédiée à l'étude de la présentation croisée de 3 antigènes de mélanome par des DC ayant phagocyté de l'oncolysat cellulaire. Une nouvelle fois, il nous a été impossible de mettre en évidence la présentation croisée des épitopes Melan-A/MART-1₂₆₋₃₅, NA17-A₁₋₉ et gp-100₂₈₀₋₂₈₈. Contrairement à l'épitope MUC1₁₂₋₂₀, aucun de ces peptides est une séquence signal de la protéine et il est vraisemblable que le défaut de présentation croisée de ces épitopes soit attribué à d'autres phénomènes. Nous pensons notamment que la très faible efficacité des DC phagocytaires à stimuler les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques vis-à-vis de ces 3 antigènes de tumeurs peut s'expliquer par la faible densité des complexes CMH/peptide exprimés à la surface des DC après ingestion. Elle peut également être due par le défaut de prise en charge des antigènes en question par l'immunprotéasome des DC, cela a déjà été rapporté pour Melan-A/MART-1 (Morel et al., 2000). Enfin, elle peut s'expliquer aussi par la très faible fréquence des lymphocytes T CD8⁺ précurseurs anti-NA17-A et anti-gp100.

En outre, il a récemment été suggéré que la présentation croisée de NYESO-1 nécessitait l'apport obligatoire du CD40L et de l'IFN- γ comme signal de maturation (Schnurr et al., 2004). Par conséquent, il serait intéressant de ré-envisager les protocoles de sensibilisation afin d'apporter aux DC ce deuxième signal de maturation dérivant des lymphocytes T CD4⁺ qui favoriserait la présentation croisée de certains antigènes.



Enfin, on ne peut pas exclure que la nature des antigènes aussi bien que l'affinité et la concentration intracellulaire des peptides antigéniques relatifs soient critiques dans les phénomènes de présentation croisée (Spiotto et al., 2002). En effet, après ingestion de cellules mortes, il est fortement imaginable que seules les peptides antigéniques qui sont suffisamment concentrés aient accès aux compartiments d'apprêtement des DC avant de se lier aux molécules HLA de classe I.

Jusqu'ici, on suppose qu'une grande quantité de fragments d'antigènes est internalisée par les DC, après exposition à des cellules apoptotiques, grâce au nombre élevé de récepteurs spécifiques impliqués dans l'identification et à l'ingestion subséquente de ces cellules mortes. On pense qu'une efficacité si saisissante dans la prise en charge des corps apoptotiques favorise la fourniture de nombreux antigènes et donc la formation de nouveaux complexes CMH/peptide de classe I exprimés à la surface des DC pour la présentation aux lymphocytes T de CD8+. Réciproquement, la prise en charge des cellules nécrotiques par les DC n'est pas très documentée mais il est vraisemblable qu'elle ne fasse pas appel à autant de récepteurs spécifiques. Il est ainsi probable qu'une petite fraction des antigènes particuliers soit internalisée par les DC, suggérant probablement que de tels peptides dérivés des cellules nécrotiques ingérées seulement soient mal concentrés.

Il est ainsi fortement imaginable que les DC chargées en cellules nécrotiques soient douées de présentation croisée, à condition que la tumeur soit dotée d'un répertoire antigénique important. Cette explication est en accord avec quelques études rapportant l'échec des DC pulsées avec de l'oncolysat cellulaire pour la cross-activation de CTL (Albert et al., 1998b; Scheffer et al., 2003). Ceci souligne donc l'importance de charger les DC avec une grande quantité d'antigènes et, dans

cette situation, nul ne peut exclure que les cellules apoptotiques soient une source probablement plus efficace que l'oncolysat cellulaire.

V. Références bibliographiques

Abi-Hanna, D., Wakefield, D., and Watkins, S. (1988). HLA antigens in ocular tissues. I. In vivo expression in human eyes. *Transplantation* 45, 610-613.

Abrams, S. I., Stanziale, S. F., Lunin, S. D., Zaremba, S., and Schlom, J. (1996). Identification of overlapping epitopes in mutant ras oncogene peptides that activate CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. *Eur J Immunol* 26, 435-443.

Ackerman, A. L., and Cresswell, P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 5, 678-684.

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

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, 713-717.

Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T., and Pulendran, B. (2003). Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 171, 4984-4989.

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, 1359-1368.

Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998b). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.

Andreesen, R., Hennemann, B., and Krause, S. W. (1998). Adoptive immunotherapy of cancer using monocyte-derived macrophages: rationale, current status, and perspectives. *J Leukoc Biol* 64, 419-426.

Anichini, A., Maccalli, C., Mortarini, R., Salvi, S., Mazzocchi, A., Squarcina, P., Herlyn, M., and Parmiani, G. (1993). Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J Exp Med* 177, 989-998.

Antonia, S. J., Seigne, J., Diaz, J., Muro-Cacho, C., Extermann, M., Farmelo, M. J., Friberg, M., Alsarraj, M., Mahany, J. J., Pow-Sang, J., *et al.* (2002). Phase I trial of a B7-1 (CD80) gene modified autologous tumor cell vaccine in combination with systemic interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 167, 1995-2000.

Arienti, F., Belli, F., Rivoltini, L., Gambacorti-Passerini, C., Furlan, L., Mascheroni, L., Prada, A., Rizzi, M., Marchesi, E., Vaglini, M., and *et al.* (1993). Adoptive immunotherapy of advanced melanoma patients with interleukin-2 (IL-2) and tumor-infiltrating lymphocytes selected in vitro with low doses of IL-2. *Cancer Immunol Immunother* 36, 315-322.

- Arienti, F., Sule-Suso, J., Belli, F., Mascheroni, L., Rivoltini, L., Melani, C., Maio, M., Cascinelli, N., Colombo, M. P., and Parmiani, G. (1996). Limited antitumor T cell response in melanoma patients vaccinated with interleukin-2 gene-transduced allogeneic melanoma cells. *Hum Gene Ther* 7, 1955-1963.
- Asavaroengchai, W., Kotera, Y., and Mule, J. J. (2002). Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 931-936.
- Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J. A., Bare, O., Auron, P. E., Stevenson, M. A., and Calderwood, S. K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277, 15028-15034.
- Astoul, P., Viallat, J. R., Laurent, J. C., Brandely, M., and Boutin, C. (1993). Intrapleural recombinant IL-2 in passive immunotherapy for malignant pleural effusion. *Chest* 103, 209-213.
- Austyn, J. M. (1996). New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 183, 1287-1292.
- Bach, J. F. (2003). Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 3, 189-198.
- Balazs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17, 341-352.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., Palucka, A. K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K. M., Bhardwaj, N., *et al.* (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61, 6451-6458.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Bancroft, G.J. (1993). The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr Opin Immunol* 5, 503-510.
- Bancroft, G. J., Schreiber, R. D., and Unanue, E. R. (1991). Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 124, 5-24.
- Barratt-Boyes, S. M. (1996). Making the most of mucin: a novel target for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 43, 142-151.
- Barros, L. F., Hermosilla, T., and Castro, J. (2001). Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130, 401-409.
- Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., *et al.* (1996). Phase II study of weekly intravenous

recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* *14*, 737-744.

Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T., and Srivastava, P. K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* *14*, 303-313.

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*, 1539-1546.

Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J. W., Scherer, B., Kremer, J. P., Wagner, H., and Lipford, G. B. (2001). Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* *166*, 5000-5007.

Bausinger, H., Lipsker, D., Ziylan, U., Manie, S., Briand, J. P., Cazenave, J. P., Muller, S., Haeuw, J. F., Ravanat, C., de la Salle, H., and Hanau, D. (2002). Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur J Immunol* *32*, 3708-3713.

Becker, T., Hartl, F. U., and Wieland, F. (2002). CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* *158*, 1277-1285.

Benlalam, H., Labarriere, N., Linard, B., Derre, L., Diez, E., Pandolfino, M. C., Bonneville, M., and Jotereau, F. (2001). Comprehensive analysis of the frequency of recognition of melanoma-associated antigen (MAA) by CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy. *Eur J Immunol* *31*, 2007-2015.

Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1997). Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* *186*, 65-70.

Berard, F., Blanco, P., Davoust, J., Neidhart-Berard, E. M., Nouri-Shirazi, M., Taquet, N., Rimoldi, D., Cerottini, J. C., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2000). Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* *192*, 1535-1544.

Berwin, B., Hart, J. P., Rice, S., Gass, C., Pizzo, S. V., Post, S. R., and Nicchitta, C. V. (2003). Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *Embo J* *22*, 6127-6136.

Binder, R. J., Anderson, K. M., Basu, S., and Srivastava, P. K. (2000a). Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo. *J Immunol* *165*, 6029-6035.

Binder, R. J., Han, D. K., and Srivastava, P. K. (2000b). CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol* *1*, 151-155.

Binder, R. J., and Srivastava, P. K. (2004). Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 6128-6133.

Bodey, B., Bodey, B., Jr., Siegel, S. E., and Kaiser, H. E. (2000). Failure of cancer vaccines: the significant limitations of this approach to immunotherapy. *Anticancer Res* *20*, 2665-2676.

- Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C. B. (1993). *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
- Boisteau, O., Gautier, F., Cordel, S., Henry, F., Harb, J., Douillard, J. Y., Vallette, F. M., Meflah, K., and Gregoire, M. (1997). Apoptosis induced by sodium butyrate treatment increases immunogenicity of a rat colon tumor cell line. *Apoptosis* 2, 403-412.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C., and Steinman, R. M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.
- Bosch, G. J., Joosten, A. M., Kessler, J. H., Melief, C. J., and Leeksa, O. C. (1996). Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* 88, 3522-3527.
- Bouso, P., and Robey, E. (2003). Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol* 4, 579-585.
- Boutin, C., Schlessler, M., Frenay, C., and Astoul, P. (1998). Malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 12, 972-981.
- Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., Reichardt, V. L., Kanz, L., and Brugger, W. (2000a). Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96, 3102-3108.
- Brossart, P., Zobywalski, A., Grunebach, F., Behnke, L., Stuhler, G., Reichardt, V. L., Kanz, L., and Brugger, W. (2000b). Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res* 60, 4485-4492.
- Brouckaert, G., Kalai, M., Krysko, D. V., Saelens, X., Vercammen, D., Ndlovu, Haegeman, G., D'Herde, K., and Vandenabeele, P. (2004). Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell* 15, 1089-1100.
- Brown, S., Heinisch, I., Ross, E., Shaw, K., Buckley, C. D., and Savill, J. (2002). Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418, 200-203.
- Bukczynski, J., Wen, T., Ellefsen, K., Gauldie, J., and Watts, T. H. (2004). Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1291-1296.
- Burch, P. A., Breen, J. K., Buckner, J. C., Gastineau, D. A., Kaur, J. A., Laus, R. L., Padley, D. J., Peshwa, M. V., Pitot, H. C., Richardson, R. L., *et al.* (2000). Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6, 2175-2182.

- Burnet, F. (1957). Cancer- A biological approach. *Brit Med J I*, 841-847.
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.
- Buttiglieri, S., Galetto, A., Forno, S., De Andrea, M., and Matera, L. (2003). Influence of drug-induced apoptotic death on processing and presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Int J Cancer* 106, 516-520.
- Cambi, A., and Figdor, C. G. (2003). Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 15, 539-546.
- Caminschi, I., Venetsanakos, E., Leong, C. C., Garlepp, M. J., Scott, B., and Robinson, B. W. (1998). Interleukin-12 induces an effective antitumor response in malignant mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 738-746.
- Castagneto, B., Zai, S., Mutti, L., Lazzaro, A., Ridolfi, R., Piccolini, E., Ardizzoni, A., Fumagalli, L., Valsuani, G., and Botta, M. (2001). Palliative and therapeutic activity of IL-2 immunotherapy in unresectable malignant pleural mesothelioma with pleural effusion: Results of a phase II study on 31 consecutive patients. *Lung Cancer* 31, 303-310.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258-261.
- 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 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90, 1458-1470.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, 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 alpha. *J Exp Med* 184, 695-706.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-923.
- Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9, 10-16.
- Cerwenka, A., Bakker, A. B., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (2000). Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12, 721-727.
- Chan, A. D., and Morton, D. L. (1998). Active immunotherapy with allogeneic tumor cell vaccines: present status. *Semin Oncol* 25, 611-622.
- Chang, C. C., Ciubotariu, R., Manavalan, J. S., Yuan, J., Colovai, A. I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., and Suciuc-Foca, N. (2002). Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3, 237-243.
- Chang, K., and Pastan, I. (1996). Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 136-140.

- 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, 143-148.
- Chen, Q., Daniel, V., Maher, D. W., and Hersey, P. (1994). Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer* 56, 755-760.
- Chen, W., Antonenko, S., Sederstrom, J. M., Liang, X., Chan, A. S., Kanzler, H., Blom, B., Blazar, B. R., and Liu, Y. J. (2004). Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 103, 2547-2553.
- Chen, W., Frank, M. E., Jin, W., and Wahl, S. M. (2001a). TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14, 715-725.
- Chen, Z., Moyana, T., Saxena, A., Warrington, R., Jia, Z., and Xiang, J. (2001b). Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *Int J Cancer* 93, 539-548.
- Cheng, F., Wang, H. W., Cuenca, A., Huang, M., Ghansah, T., Brayer, J., Kerr, W. G., Takeda, K., Akira, S., Schoenberger, S. P., *et al.* (2003). A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 19, 425-436.
- Choi, C., Witzens, M., Bucur, M., Feuerer, M., Sommerfeldt, N., Trojan, A., Ho, A., Schirmacher, V., Goldschmidt, H., and Beckhove, P. (2004). Enrichment of functional CD8 memory T cells specific for MUC1 in bone marrow of multiple myeloma patients. *Blood*.
- Clark, P. R., and Menoret, A. (2001). The inducible Hsp70 as a marker of tumor immunogenicity. *Cell Stress Chaperones* 6, 121-125.
- Clayton, A. R., Prue, R. L., Harper, L., Drayson, M. T., and Savage, C. O. (2003). Dendritic cell uptake of human apoptotic and necrotic neutrophils inhibits CD40, CD80, and CD86 expression and reduces allogeneic T cell responses: relevance to systemic vasculitis. *Arthritis Rheum* 48, 2362-2374.
- Cocco, R. E., and Ucker, D. S. (2001). Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. *Mol Biol Cell* 12, 919-930.
- Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Lin, W., Boyd, J. G., Moser, B., Wood, D. E., *et al.* (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 187, 2009-2021.
- Colombat, P., Salles, G., Brousse, N., Eftekhari, P., Soubeyran, P., Delwail, V., Deconinck, E., Haioun, C., Foussard, C., Sebban, C., *et al.* (2001). Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood* 97, 101-106.
- Coughlin, C. M., Salhany, K. E., Gee, M. S., LaTemple, D. C., Kotenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J. E., Liu, L., *et al.* (1998). Tumor cell responses to IFN-gamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity* 9, 25-34.

- Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3, 609-620.
- Curran, D., Sahmoud, T., Therasse, P., van Meerbeeck, J., Postmus, P. E., and Giaccone, G. (1998). Prognostic factors in patients with pleural mesothelioma: the European Organization for Research and Treatment of Cancer experience. *J Clin Oncol* 16, 145-152.
- De Backer, O., Arden, K. C., Boretti, M., Vantomme, V., De Smet, C., Czekay, S., Viars, C. S., De Plaen, E., Basseur, F., Chomez, P., *et al.* (1999). Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* 59, 3157-3165.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., Basseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C., and *et al.* (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40, 360-369.
- 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, 1413-1424.
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Basseur, F., and Boon, T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7149-7153.
- De Vries, I. J., Krooshoop, D. J., Scharenborg, N. M., Lesterhuis, W. J., Diepstra, J. H., Van Muijen, G. N., Strijk, S. P., Ruers, T. J., Boerman, O. C., Oyen, W. J., *et al.* (2003). Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 63, 12-17.
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J., and Jeannin, P. (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 17, 353-362.
- Deo, Y. M., Sundarapandiyam, K., Keler, T., Wallace, P. K., and Graziano, R. F. (1998). Bispecific molecules directed to the Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) and tumor antigens efficiently promote cell-mediated cytotoxicity of tumor targets in whole blood. *J Immunol* 160, 1677-1686.
- Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L., and Gregory, C. D. (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392, 505-509.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovskiy, 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, 233-238.
- Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M., and Raulet, D. H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413, 165-171.
- 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, 373-386.
- Dillman, R. O., Beutel, L. D., Barth, N. M., de Leon, C., O'Connor, A. A., DePriest, C., and Nayak, S. K. (2002). Irradiated cells from autologous tumor cell lines as patient-specific vaccine therapy in

125 patients with metastatic cancer: induction of delayed-type hypersensitivity to autologous tumor is associated with improved survival. *Cancer Biother Radiopharm* 17, 51-66.

Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3539-3543.

Dranoff, G., Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Kolesar, K., Liebster, L., Lam, P., Duda, R., Mentzer, S., *et al.* (1997). A phase I study of vaccination with autologous, irradiated melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Hum Gene Ther* 8, 111-123.

Dudley, M. E., Wunderlich, J., Nishimura, M. I., Yu, D., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Sherry, R., *et al.* (2001). Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24, 363-373.

Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., *et al.* (2002a). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.

Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R. M., Marincola, F. M., Leitman, S. F., Seipp, C. A., *et al.* (2002b). A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 25, 243-251.

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-998.

Dyomin, V. G., Palanisamy, N., Lloyd, K. O., Dyomina, K., Jhanwar, S. C., Houldsworth, J., and Chaganti, R. S. (2000). MUC1 is activated in a B-cell lymphoma by the t(1;14)(q21;q32) translocation and is rearranged and amplified in B-cell lymphoma subsets. *Blood* 95, 2666-2671.

Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.

Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., *et al.* (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 194, 1823-1834.

Ebstein, F., Sapede, C., Royer, P. J., Marcq, M., Ligeza-Poisson, C., Barbieux, I., Cellier, L., Dabouis, G., and Gregoire, M. (2004). Cytotoxic T cell responses against mesothelioma by apoptotic cell-pulsed dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 1322-1330.

Ehrlich, P. (1909). Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 5, 273-290.

Ellem, K. A., O'Rourke, M. G., Johnson, G. R., Parry, G., Misko, I. S., Schmidt, C. W., Parsons, P. G., Burrows, S. R., Cross, S., Fell, A., *et al.* (1997). A case report: immune responses and clinical

course of the first human use of granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor-transduced autologous melanoma cells for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 44, 10-20.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Evan, G. I., and Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.

Eymard, J. C., Lopez, M., Cattan, A., Bouche, O., Adjizian, J. C., and Bernard, J. (1996). Phase I/II trial of autologous activated macrophages in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 32A, 1905-1911.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Guthrie, L., and Henson, P. M. (2001). Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol* 166, 6847-6854.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., and Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-898.

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, 2207-2216.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 1206-1212.

Faradji, A., Bohbot, A., Schmitt-Goguel, M., Roeslin, N., Dumont, S., Wiesel, M. L., Lallot, C., Eber, M., Bartholeyns, J., Poindron, P., and et al. (1991). Phase I trial of intravenous infusion of ex-vivo-activated autologous blood-derived macrophages in patients with non-small-cell lung cancer: toxicity and immunomodulatory effects. *Cancer Immunol Immunother* 33, 319-326.

Faradji, A., Bohbot, A., Schmitt-Goguel, M., Siffert, J. C., Dumont, S., Wiesel, M. L., Piemont, Y., Eischen, A., Bergerat, J. P., Bartholeyns, J., and et al. (1994). Large scale isolation of human blood monocytes by continuous flow centrifugation leukapheresis and counterflow centrifugation elutriation for adoptive cellular immunotherapy in cancer patients. *J Immunol Methods* 174, 297-309.

Feng, H., Ghazizadeh, M., Konishi, H., and Araki, T. (2002a). Expression of MUC1 and MUC2 mucin gene products in human ovarian carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 32, 525-529.

Feng, H., Zeng, Y., Graner, M. W., and Katsanis, E. (2002b). Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood* 100, 4108-4115.

Feng, H., Zeng, Y., Whitesell, L., and Katsanis, E. (2001). Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. *Blood* 97, 3505-3512.

Ferlazzo, G., and Munz, C. (2004). NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol* 172, 1333-1339.

- 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.
- Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., and Munz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKP30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* *195*, 343-351.
- Ferlazzo, G., Wesa, A., Wei, W. Z., and Galy, A. (1999). Dendritic cells generated either from CD34+ progenitor cells or from monocytes differ in their ability to activate antigen-specific CD8+ T cells. *J Immunol* *163*, 3597-3604.
- Ferrone, S., and Marincola, F. M. (1995). Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* *16*, 487-494.
- Fields, R. C., Shimizu, K., and Mule, J. J. (1998). Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 9482-9487.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., and Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* *2*, 77-84.
- Finke, J. H., Zea, A. H., Stanley, J., Longo, D. L., Mizoguchi, H., Tubbs, R. R., Wiltrot, R. H., O'Shea, J. J., Kudoh, S., Klein, E., and et al. (1993). Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* *53*, 5613-5616.
- Fisk, B., Blevins, T. L., Wharton, J. T., and Ioannides, C. G. (1995). Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med* *181*, 2109-2117.
- Flynn, G. C., Chappell, T. G., and Rothman, J. E. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* *245*, 385-390.
- Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., Breen, J. K., Strang, G., Ruegg, C. L., and Engleman, E. G. (2001a). Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol* *167*, 7150-7156.
- Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., Wu, L., and Engleman, E. G. (2001b). Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* *166*, 4254-4259.
- 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*, 979-986.
- Fujii, S., Shimizu, K., Fujimoto, K., Kiyokawa, T., Tsukamoto, A., Sanada, I., and Kawano, F. (2001). Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic-dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells. *Leuk Lymphoma* *42*, 357-369.
- Fujii, S., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L., and Steinman, R. M. (2003). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in

vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J Exp Med* 198, 267-279.

Fujimoto, Y., Tu, L., Miller, A. S., Bock, C., Fujimoto, M., Doyle, C., Steeber, D. A., and Tedder, T. F. (2002). CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell* 108, 755-767.

Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5, 1249-1255.

Gallucci, S., and Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13, 114-119.

Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., and Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152, 165-180.

Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., Glew, S., Ruiz-Cabello, F., and Stern, P. L. (1993). Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14, 491-499.

Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J. P., Van der Spek, C. W., Patard, J. J., Boon, T., Schrier, P., and Van den Eynde, B. J. (1996). A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 44, 323-330.

Geiger, J., Hutchinson, R., Hohenkirk, L., McKenna, E., Chang, A., and Mule, J. (2000). Treatment of solid tumours in children with tumour-lysate-pulsed dendritic cells. *Lancet* 356, 1163-1165.

Geiger, J. D., Hutchinson, R. J., Hohenkirk, L. F., McKenna, E. A., Yanik, G. A., Levine, J. E., Chang, A. E., Braun, T. M., and Mule, J. J. (2001). Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 61, 8513-8519.

Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., *et al.* (2000a). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.

Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585.

Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O., and Durandy, A. (1999). TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 162, 4567-4575.

Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195, 327-333.

Gervois, N., Labarriere, N., Le Guiner, S., Pandolfino, M. C., Fonteneau, J. F., Guilloux, Y., Diez, E., Dreno, B., and Jotereau, F. (2000). High avidity melanoma-reactive cytotoxic T lymphocytes are efficiently induced from peripheral blood lymphocytes on stimulation by peptide-pulsed melanoma cells. *Clin Cancer Res* 6, 1459-1467.

- Gett, A. V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Geginat, J. (2003). T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4, 355-360.
- Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E., and Hayday, A. C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605-609.
- Gitlitz, B. J., Beldegrun, A. S., Zisman, A., Chao, D. H., Pantuck, A. J., Hinkel, A., Mulders, P., Moldawer, N., Tso, C. L., and Figlin, R. A. (2003). A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J Immunother* 26, 412-419.
- Ghiringelli F., Larmonier N., Schmitt E., Parcellier A., Cathelin D., Garrido C., Chauffert B., Solary E., Bonotte., Martin F. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol.* 34, 336-344.
- Glucksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26, 59-86.
- Goedert, J. J., Cote, T. R., Virgo, P., Scoppa, S. M., Kingma, D. W., Gail, M. H., Jaffe, E. S., and Biggar, R. J. (1998). Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet* 351, 1833-1839.
- Goldszmid, R. S., Idoyaga, J., Bravo, A. I., Steinman, R., Mordoh, J., and Wainstok, R. (2003). Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma. *J Immunol* 171, 5940-5947.
- Gorelik, L., and Flavell, R. A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 7, 1118-1122.
- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.
- Haas, G. G., Jr., D'Cruz, O. J., and De Bault, L. E. (1988). Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 18, 47-51.
- Haight, A. E., Bowman, L. C., Ng, C. Y., Vanin, E. F., and Davidoff, A. M. (2000). Humoral response to vaccination with interleukin-2-expressing allogeneic neuroblastoma cells after primary therapy. *Med Pediatr Oncol* 35, 712-715.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Harada, M., Kimura, G., and Nomoto, K. (1998). Heat shock proteins and the antitumor T cell response. *Biotherapy* 10, 229-235.
- Harkiss, G. D., Hopkins, J., and McConnell, I. (1990). Uptake of antigen by afferent lymph dendritic cells mediated by antibody. *Eur J Immunol* 20, 2367-2373.
- Heiser, A., Coleman, D., Dannull, J., Yancey, D., Maurice, M. A., Lallas, C. D., Dahm, P., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2002). Autologous dendritic cells transfected with

prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 109, 409-417.

Hemmila, M. R., and Chang, A. E. (1999). Clinical implications of the new biology in the development of melanoma vaccines. *J Surg Oncol* 70, 263-274.

Hennemann, B., Rehm, A., Kottke, A., Meidenbauer, N., and Andreesen, R. (1997). Adoptive immunotherapy with tumor-cytotoxic macrophages derived from recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhuGM-CSF) mobilized peripheral blood monocytes. *J Immunother* 20, 365-371.

Hennemann, B., Scheibenbogen, C., Schumichen, C., and Andreesen, R. (1995). Intrahepatic adoptive immunotherapy with autologous tumorcytotoxic macrophages in patients with cancer. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 18, 19-27.

Henry, F., Boisteau, O., Bretaudeau, L., Lieubeau, B., Meflah, K., and Gregoire, M. (1999). Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines. *Cancer Res* 59, 3329-3332.

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

Herr, W., Ranieri, E., Olson, W., Zarour, H., Gesualdo, L., and Storkus, W. J. (2000). Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte responses. *Blood* 96, 1857-1864.

Herrmann, M., Voll, R. E., Zoller, O. M., Hagenhofer, M., Ponner, B. B., and Kalden, J. R. (1998). Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41, 1241-1250.

Hesketh, R. (1997). *The Oncogene and Tumor Suppressor Genes*. In Facts Book, A. Press, ed. (London).

Hodge, J. W. (1996). Carcinoembryonic antigen as a target for cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 43, 127-134.

Hoffmann, T. K., Meidenbauer, N., Dworacki, G., Kanaya, H., and Whiteside, T. L. (2000). Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res* 60, 3542-3549.

Holti, L., Zelle-Rieser, C., Gander, H., Papesh, C., Ramoner, R., Bartsch, G., Rogatsch, H., Barsoum, A. L., Coggin, J. H., Jr., and Thurnher, M. (2002). Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 8, 3369-3376.

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168, 4531-4537.

Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G., and Levy, R. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2, 52-58.

- Hu, X., Chakraborty, N. G., Sporn, J. R., Kurtzman, S. H., Ergin, M. T., and Mukherji, B. (1996). Enhancement of cytolytic T lymphocyte precursor frequency in melanoma patients following immunization with the MAGE-1 peptide loaded antigen presenting cell-based vaccine. *Cancer Res* 56, 2479-2483.
- Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J. F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., and Coulie, P. G. (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6, 199-208.
- Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 95-109.
- Inge, T. H., Hoover, S. K., Susskind, B. M., Barrett, S. K., and Bear, H. D. (1992). Inhibition of tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 52, 1386-1392.
- Ip, W. K., and Lau, Y. L. (2004). Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases. *J Immunol* 173, 189-196.
- Ishii, K. J., Suzuki, K., Coban, C., Takeshita, F., Itoh, Y., Matoba, H., Kohn, L. D., and Klinman, D. M. (2001). Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* 167, 2602-2607.
- Ishii, S., Hiroishi, K., Eguchi, J., and Mitamura, K. (2003). Dendritic cell maturation induced by delivery of ultraviolet-mediated apoptotic colorectal cancer cell lines. *Anticancer Res* 23, 2457-2463.
- Ishii, T., Udono, H., Yamano, T., Ohta, H., Uenaka, A., Ono, T., Hizuta, A., Tanaka, N., Srivastava, P. K., and Nakayama, E. (1999). Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96. *J Immunol* 162, 1303-1309.
- Jager, E., Jager, D., and Knuth, A. (2002). Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol* 14, 178-182.
- Janetzki, S., Palla, D., Rosenhauer, V., Lochs, H., Lewis, J. J., and Srivastava, P. K. (2000). Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer* 88, 232-238.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., and Schoenberger, S. P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.
- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 3388-3393.
- Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J. P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225-234.

Jenne, L., Arrighi, J. F., Jonuleit, H., Saurat, J. H., and Hauser, C. (2000). Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8⁺ T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Res* 60, 4446-4452.

Jerome, K. R., Domenech, N., and Finn, O. J. (1993). Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin complementary DNA. *J Immunol* 151, 1654-1662.

Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151-155.

Johnson, P. W., Watt, S. M., Betts, D. R., Davies, D., Jordan, S., Norton, A. J., and Lister, T. A. (1993). Isolated follicular lymphoma cells are resistant to apoptosis and can be grown in vitro in the CD40/stromal cell system. *Blood* 82, 1848-1857.

Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T. B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P. P., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2001). A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 93, 243-251.

Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27, 3135-3142.

Jonuleit, H., and Schmitt, E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 171, 6323-6327.

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, 1213-1222.

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, 219-226.

Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., 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, 863-869.

Kast, W. M., and Melief, C. J. (1991). Fine peptide specificity of cytotoxic T lymphocytes directed against adenovirus-induced tumours and peptide-MHC binding. *Int J Cancer Suppl* 6, 90-94.

Kast, W. M., Offringa, R., Peters, P. J., Voordouw, A. C., Meloen, R. H., van der Eb, A. J., and Melief, C. J. (1989). Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell* 59, 603-614.

Kawakami, Y., Dang, N., Wang, X., Tupesis, J., Robbins, P. F., Wang, R. F., Wunderlich, J. R., Yannelli, J. R., and Rosenberg, S. A. (2000). Recognition of shared melanoma antigens in association with major HLA-A alleles by tumor infiltrating T lymphocytes from 123 patients with melanoma. *J Immunother* 23, 17-27.

Keler, T., Graziano, R. F., Mandal, A., Wallace, P. K., Fisher, J., Guyre, P. M., Fanger, M. W., and Deo, Y. M. (1997). Bispecific antibody-dependent cellular cytotoxicity of HER2/neu-overexpressing tumor cells by Fc gamma receptor type I-expressing effector cells. *Cancer Res* 57, 4008-4014.

Kerr, J. F. (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105, 13-20.

Kerr, J. F., Gobe, G. C., Winterford, C. M., and Harmon, B. V. (1995). Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 46, 1-27.

Kikuchi, T., Akasaki, Y., Abe, T., Fukuda, T., Saotome, H., Ryan, J. L., Kufe, D. W., and Ohno, T. (2004). Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother* 27, 452-459.

Kikuchi, T., Akasaki, Y., Irie, M., Homma, S., Abe, T., and Ohno, T. (2001). Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother* 50, 337-344.

Klarnet, J. P., Kern, D. E., Okuno, K., Holt, C., Lilly, F., and Greenberg, P. D. (1989). FBL-reactive CD8+ cytotoxic and CD4+ helper T lymphocytes recognize distinct Friend murine leukemia virus-encoded antigens. *J Exp Med* 169, 457-467.

Knight, S. C., Farrant, J., Bryant, A., Edwards, A. J., Burman, S., Lever, A., Clarke, J., and Webster, A. D. (1986). Non-adherent, low-density cells from human peripheral blood contain dendritic cells and monocytes, both with veiled morphology. *Immunology* 57, 595-603.

Kopp, E., and Medzhitov, R. (2003). Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 396-401.

Korsmeyer, S. J. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80, 879-886.

Kotera, Y., Shimizu, K., and Mule, J. J. (2001). Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res* 61, 8105-8109.

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

Krieger, M., and Herz, J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 63, 601-637.

Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Muller, C. A., Becker, V., *et al.* (2000). Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 6, 332-336.

Kuppner, M. C., Gastpar, R., Gelwer, S., Nossner, E., Ochmann, O., Scharner, A., and Issels, R. D. (2001). The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol* 31, 1602-1609.

- Kurokawa, T., Oelke, M., and Mackensen, A. (2001). Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells. *Int J Cancer* *91*, 749-756.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* *186*, 239-245.
- Lacerna, L. V., Jr., Stevenson, G. W., and Stevenson, H. C. (1988). Adoptive cancer immunotherapy utilizing lymphokine activated killer cells and gamma interferon activated killer monocytes. *Pharmacol Ther* *38*, 453-465.
- 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*, 311-316.
- Langerhans, P. (1868). Über die : Nerven der meschllichen Haut Virchows. *Arch Path Anat Physiol* *44*, 325-337.
- Langner, C., Ratschek, M., Rehak, P., Schips, L., and Zigeuner, R. (2004). Expression of MUC1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases. *Mod Pathol* *17*, 180-188.
- Lardon, F., Snoeck, H. W., Berneman, Z. N., Van Tendeloo, V. F., Nijs, G., Lenjou, M., Henckaerts, E., Boeckxtaens, C. J., Vandenabeele, P., Kestens, L. L., *et al.* (1997). Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using GM-CSF, TNF-alpha, and additional cytokines: antagonistic effects of IL-4 and IFN-gamma and selective involvement of TNF-alpha receptor-1. *Immunology* *91*, 553-559.
- Lau, R., Wang, F., Jeffery, G., Marty, V., Kuniyoshi, J., Bade, E., Ryback, M. E., and Weber, J. (2001). Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* *24*, 66-78.
- Lechmann, M., Berchtold, S., Hauber, J., and Steinkasserer, A. (2002). CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol* *23*, 273-275.
- Lee, A. W., Truong, T., Bickham, K., Fonteneau, J. F., Larsson, M., Da Silva, I., Somersan, S., Thomas, E. K., and Bhardwaj, N. (2002). A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* *20 Suppl 4*, A8-A22.
- Lee, J. J., Nam, C. E., Nam, J. H., Lee, H. C., Chung, I. J., Park, M. S., Choi, B. H., Song, W. H., Lee, I. K., Park, K. S., *et al.* (2004). Generation of cytotoxic donor CD8+ T cells against relapsing leukemic cells following allogeneic transplantation by stimulation with leukemic cell- or leukemic lysate pulsed donor cell-derived dendritic cells. *Leuk Res* *28*, 517-524.
- Lee, P. K., Chang, C. J., and Lin, C. M. (2003). Lipopolysaccharide preferentially induces 4-1BB ligand expression on human monocyte-derived dendritic cells. *Immunol Lett* *90*, 215-221.
- Lee, P. P., Yee, C., Savage, P. A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J. S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P. D., *et al.* (1999). Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* *5*, 677-685.

- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-258.
- Lethe, B., van der Bruggen, P., Brasseur, F., and Boon, T. (1997). MAGE-1 expression threshold for the lysis of melanoma cell lines by a specific cytotoxic T lymphocyte. *Melanoma Res* 7 Suppl 2, S83-88.
- Liao, F., Rabin, R. L., Yannelli, J. R., Koniaris, L. G., Vanguri, P., and Farber, J. M. (1995). Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 182, 1301-1314.
- Lim, S. H., and Bailey-Wood, R. (1999). Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer* 83, 215-222.
- Liso, A., Stockerl-Goldstein, K. E., Auffermann-Gretzinger, S., Benike, C. J., Reichardt, V., van Beckhoven, A., Rajapaksa, R., Engleman, E. G., Blume, K. G., and Levy, R. (2000). Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 6, 621-627.
- Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* 3, 822-829.
- Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S., and Linehan, D. C. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169, 2756-2761.
- Lopez-Rios, F., Illei, P. B., Rusch, V., and Ladanyi, M. (2004). Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *Lancet* 364, 1157-1166.
- Lotze, M. T., Hellerstedt, B., Stolinski, L., Tueting, T., Wilson, C., Kinzler, D., Vu, H., Rubin, J. T., Storkus, W., Tahara, H., *et al.* (1997). The role of interleukin-2, interleukin-12, and dendritic cells in cancer therapy. *Cancer J Sci Am* 3 Suppl 1, S109-114.
- Ludewig, B., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Paulin, D., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (2000). Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J Exp Med* 191, 795-804.
- Luster, A. D., and Leder, P. (1993). IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 178, 1057-1065.
- Luster, A. D., and Ravetch, J. V. (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 166, 1084-1097.
- Lustgarten, J., Theobald, M., Labadie, C., LaFace, D., Peterson, P., Disis, M. L., Cheever, M. A., and Sherman, L. A. (1997). Identification of Her-2/Neu CTL epitopes using double transgenic mice expressing HLA-A2.1 and human CD.8. *Hum Immunol* 52, 109-118.
- 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* 168, 1172-1180.

- Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P., and Browning, J. (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 21, 231-264.
- Mackensen, A., Herbst, B., Chen, J. L., Kohler, G., Noppen, C., Herr, W., Spagnoli, G. C., Cerundolo, V., and Lindemann, A. (2000). Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer* 86, 385-392.
- Mackey, M. F., Gunn, J. R., Maliszewsky, C., Kikutani, H., Noelle, R. J., and Barth, R. J., Jr. (1998). Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol* 161, 2094-2098.
- Maier, T., Tun-Kyi, A., Tassis, A., Jungius, K. P., Burg, G., Dummer, R., and Nestle, F. O. (2003). Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intranodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells. *Blood* 102, 2338-2344.
- Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T., and van der Bruggen, P. (1997). A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 186, 785-793.
- Marrogi, A. J., Munshi, A., Merogi, A. J., Ohadike, Y., El-Habashi, A., Marrogi, O. L., and Freeman, S. M. (1997). Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. *Int J Cancer* 74, 492-501.
- Martin, E., O'Sullivan, B., Low, P., and Thomas, R. (2003). Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 18, 155-167.
- Masse, D., Voisine, C., Henry, F., Cordel, S., Barbieux, I., Josien, R., Meflah, K., Gregoire, M., and Lieubeau, B. (2002). Increased vaccination efficiency with apoptotic cells by silica-induced, dendritic-like cells. *Cancer Res* 62, 1050-1056.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305.
- McAdam, A. J., Schweitzer, A. N., and Sharpe, A. H. (1998). The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* 165, 231-247.
- McCune, C. S., O'Donnell, R. W., Marquis, D. M., and Sahasrabudhe, D. M. (1990). Renal cell carcinoma treated by vaccines for active specific immunotherapy: correlation of survival with skin testing by autologous tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 32, 62-66.
- McGuckin, M. A., Walsh, M. D., Hohn, B. G., Ward, B. G., and Wright, R. G. (1995). Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Hum Pathol* 26, 432-439.
- 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, 581-587.
- Mellman, I., and Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.

- Mellor, A. L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P. A., Iwashima, M., and Munn, D. H. (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* *171*, 1652-1655.
- Miller, M. J., Wei, S. H., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2002). Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* *296*, 1869-1873.
- Mizoguchi, H., O'Shea, J. J., Longo, D. L., Loeffler, C. M., McVicar, D. W., and Ochoa, A. C. (1992). Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* *258*, 1795-1798.
- Mocikat, R., Braumuller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmuller, G., *et al.* (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* *19*, 561-569.
- Moingeon, P. (2001). Cancer vaccines. *Vaccine* *19*, 1305-1326.
- Monnet, I., Breau, J. L., Moro, D., Lena, H., Eymard, J. C., Menard, O., Vuillez, J. P., Chokri, M., Romet-Lemonne, J. L., and Lopez, M. (2002). Intrapleural infusion of activated macrophages and gamma-interferon in malignant pleural mesothelioma: a phase II study. *Chest* *121*, 1921-1927.
- Morel, S., Levy, F., Bulet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A. L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J. C., Boon, T., *et al.* (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* *12*, 107-117.
- Morse, M. A., Coleman, R. E., Akabani, G., Niehaus, N., Coleman, D., and Lyerly, H. K. (1999a). Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* *59*, 56-58.
- Morse, M. A., Deng, Y., Coleman, D., Hull, S., Kitrell-Fisher, E., Nair, S., Schlom, J., Ryback, M. E., and Lyerly, H. K. (1999b). A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* *5*, 1331-1338.
- Morse, M. A., Lyerly, H. K., Gilboa, E., Thomas, E., and Nair, S. K. (1998). Optimization of the sequence of antigen loading and CD40-ligand-induced maturation of dendritic cells. *Cancer Res* *58*, 2965-2968.
- Mortarini, R., Anichini, A., Di Nicola, M., Siena, S., Bregni, M., Belli, F., Molla, A., Gianni, A. M., and Parmiani, G. (1997). Autologous dendritic cells derived from CD34+ progenitors and from monocytes are not functionally equivalent antigen-presenting cells in the induction of melan-A/Mart-1(27-35)-specific CTLs from peripheral blood lymphocytes of melanoma patients with low frequency of CTL precursors. *Cancer Res* *57*, 5534-5541.
- Morton, D. L., Foshag, L. J., Hoon, D. S., Nizze, J. A., Famatiga, E., Wanek, L. A., Chang, C., Davtyan, D. G., Gupta, R. K., Elashoff, R., and *et al.* (1992). Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Ann Surg* *216*, 463-482.
- Morton, D. L., Hoon, D. S., Nizze, J. A., Foshag, L. J., Famatiga, E., Wanek, L. A., Chang, C., Irie, R. F., Gupta, R. K., and Elashoff, R. (1993). Polyvalent melanoma vaccine improves survival of patients with metastatic melanoma. *Ann N Y Acad Sci* *690*, 120-134.

- Mukherji, B., Chakraborty, N. G., Yamasaki, S., Okino, T., Yamase, H., Sporn, J. R., Kurtzman, S. K., Ergin, M. T., Ozols, J., Meehan, J., and et al. (1995). Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8078-8082.
- Muminova, Z. E., Strong, T. V., and Shaw, D. R. (2004). Characterization of human mesothelin transcripts in ovarian and pancreatic cancer. *BMC Cancer* 4, 19.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., *et al.* (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297, 1867-1870.
- Murphy, G. P., Tjoa, B. A., Simmons, S. J., Jarisch, J., Bowes, V. A., Ragde, H., Rogers, M., Elgamal, A., Kenny, G. M., Cobb, O. E., *et al.* (1999a). Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease. *Prostate* 38, 73-78.
- Murphy, G. P., Tjoa, B. A., Simmons, S. J., Ragde, H., Rogers, M., Elgamal, A., Kenny, G. M., Troychak, M. J., Salgaller, M. L., and Boynton, A. L. (1999b). Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment. *Prostate* 39, 54-59.
- Murphy, G. P., Tjoa, B. A., Simmons, S. J., Rogers, M. K., Kenny, G. M., and Jarisch, J. (2000). Higher-dose and less frequent dendritic cell infusions with PSMA peptides in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients. *Prostate* 43, 59-62.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Nagayama, H., Sato, K., Morishita, M., Uchimar, K., Oyaizu, N., Inazawa, T., Yamasaki, T., Enomoto, M., Nakaoka, T., Nakamura, T., *et al.* (2003). Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2. *Melanoma Res* 13, 521-530.
- Nair, S. K., Boczkowski, D., Snyder, D., and Gilboa, E. (1997). Antigen-presenting cells pulsed with unfractionated tumor-derived peptides are potent tumor vaccines. *Eur J Immunol* 27, 589-597.
- Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., and Ohtani, H. (1998). CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 3491-3494.
- Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., Suzuki, Y., Shintaku, I., Nagura, H., and Ohtani, H. (2001). Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 61, 5132-5136.
- Neidhardt-Berard, E. M., Berard, F., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2004). Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Breast Cancer Res* 6, R322-328.

Nelson, W. G., Simons, J. W., Mikhak, B., Chang, J. F., DeMarzo, A. M., Carducci, M. A., Kim, M., Weber, C. E., Baccala, A. A., Goeman, M. A., *et al.* (2000). Cancer cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using *ex vivo* gene transfer as vaccines for the treatment of genitourinary malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 *Suppl*, S67-72.

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, 328-332.

Newton, D. A., Acierno, P. M., Brescia, F. J., Brown, E. A., and Gattoni-Celli, S. (2002). Semi-allogeneic vaccines for patients with cancer and AIDS. *J Immunother* 25, 334-341.

Ngo, V. N., Tang, H. L., 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, 181-191.

Noguchi, Y., Chen, Y. T., and Old, L. J. (1994). A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3171-3175.

Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Bell, D., Burkeholder, S., Kraus, E. T., Davoust, J., and Palucka, K. A. (2000). Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J Immunol* 165, 3797-3803.

Ochsenbein, A. F., Klenerman, P., Karrer, U., Ludewig, B., Pericin, M., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1999). Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2233-2238.

Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806-809.

O'Neill, D. W., Adams, S., and Bhardwaj, N. (2004). Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* 104, 2235-2246.

O'Rourke, M. G., Schmidt, C. W., O'Rourke, T. R., and Ellem, K. A. (1997). Immunotherapy, including gene therapy, for metastatic melanoma. *Aust N Z J Surg* 67, 834-841.

Paczesny, S., Ueno, H., Fay, J., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2003). Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer. *Semin Cancer Biol* 13, 439-447.

Palliser, D., Huang, Q., Hacohen, N., Lamontagne, S. P., Guillen, E., Young, R. A., and Eisen, H. N. (2004). A role for toll-like receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8(+) T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein. *J Immunol* 172, 2885-2893.

Palucka, K., Banchereau J. (1999). Dendritic cells : a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol* 19, 12-25.

Panelli, M. C., Wunderlich, J., Jeffries, J., Wang, E., Mixon, A., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. (2000). Phase 1 study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100. *J Immunother* 23, 487-498.

- Panjwani, N. N., Popova, L., and Srivastava, P. K. (2002). Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol* *168*, 2997-3003.
- Pardoll, D. M. (2002). Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* *2*, 227-238.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* *299*, 1033-1036.
- Peace, D. J., Smith, J. W., Chen, W., You, S. G., Cosand, W. L., Blake, J., and Cheever, M. A. (1994). Lysis of ras oncogene-transformed cells by specific cytotoxic T lymphocytes elicited by primary in vitro immunization with mutated ras peptide. *J Exp Med* *179*, 473-479.
- Peifer, M. (1997). Beta-catenin as oncogene: the smoking gun. *Science* *275*, 1752-1753.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S., and Gordon, S. (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* *14*, 123-128.
- Pietra, G., Mortarini, R., Parmiani, G., and Anichini, A. (2001). Phases of apoptosis of melanoma cells, but not of normal melanocytes, differently affect maturation of myeloid dendritic cells. *Cancer Res* *61*, 8218-8226.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C. J., Sherwood, S. W., Baldwin, D. T., *et al.* (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* *396*, 699-703.
- Plata, F., Langlade-Demoyen, P., Abastado, J. P., Berbar, T., and Kourilsky, P. (1987). Retrovirus antigens recognized by cytolytic T lymphocytes activate tumor rejection in vivo. *Cell* *48*, 231-240.
- Probst, H. C., Lagnel, J., Kollias, G., and van den Broek, M. (2003). Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity* *18*, 713-720.
- Qian, H. N., Liu, G. Z., Cao, S. J., Feng, J., and Ye, X. (2002). The experimental study of ovarian carcinoma vaccine modified by human B7-1 and IFN-gamma genes. *Int J Gynecol Cancer* *12*, 80-85.
- Qin, Z., and Blankenstein, T. (2000). CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* *12*, 677-686.
- Rafiq, K., Bergtold, A., and Clynes, R. (2002). Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest* *110*, 71-79.
- Rains, N., Cannan, R. J., Chen, W., and Stubbs, R. S. (2001). Development of a dendritic cell (DC)-based vaccine for patients with advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* *48*, 347-351.
- Reichardt, V. L., Okada, C. Y., Liso, A., Benike, C. J., Stockerl-Goldstein, K. E., Engleman, E. G., Blume, K. G., and Levy, R. (1999). Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study. *Blood* *93*, 2411-2419.
- Ressing, M. E., Sette, A., Brandt, R. M., Ruppert, J., Wentworth, P. A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H. M., Melief, C. J., and Kast, W. M. (1995). Human CTL epitopes encoded by human

papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol* 154, 5934-5943.

Restifo, N. P., Esquivel, F., Kawakami, Y., Yewdell, J. W., Mule, J. J., Rosenberg, S. A., and Bennink, J. R. (1993a). Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 177, 265-272.

Restifo, N. P., Kawakami, Y., Marincola, F., Shamamian, P., Taggarse, A., Esquivel, F., and Rosenberg, S. A. (1993b). Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenethrapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother* 14, 182-190.

Restifo, N. P., Marincola, F. M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., Yannelli, J. R., and Rosenberg, S. A. (1996). Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 88, 100-108.

Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183, 1185-1192.

Robbins, P. F., el-Gamil, M., Li, Y. F., Topalian, S. L., Rivoltini, L., Sakaguchi, K., Appella, E., Kawakami, Y., and Rosenberg, S. A. (1995). Cloning of a new gene encoding an antigen recognized by melanoma-specific HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 154, 5944-5950.

Robinson, B. W., Robinson, C., and Lake, R. A. (2001). Localised spontaneous regression in mesothelioma -- possible immunological mechanism. *Lung Cancer* 32, 197-201.

Robinson, C., Robinson, B. W., and Lake, R. A. (1998). Sera from patients with malignant mesothelioma can contain autoantibodies. *Lung Cancer* 20, 175-184.

Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445-455.

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M., and Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180, 83-93.

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.

Ronchetti, A., Rovere, P., Iezzi, G., Galati, G., Heltai, S., Protti, M. P., Garancini, M. P., Manfredi, A. A., Rugarli, C., and Bellone, M. (1999). Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* 163, 130-136.

Ropke, M., Hald, J., Guldborg, P., Zeuthen, J., Norgaard, L., Fugger, L., Svejgaard, A., Van der Burg, S., Nijman, H. W., Melief, C. J., and Claesson, M. H. (1996). Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53-derived peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14704-14707.

Rosenberg, S. A. (1992). Gene therapy for cancer. *Jama* 268, 2416-2419.

Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F. P., Leitman, S., Linehan, W. M., Robertson, C. N., Lee, R. E., Rubin, J. T., and et al. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316, 889-897.

Rosenberg, S. A., Spiess, P., and Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233, 1318-1321.

Rosenberg, S. A., and White, D. E. (1996). Vitiligo in patients with melanoma: normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19, 81-84.

Rosenberg, S. A., Yannelli, J. R., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. (1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 86, 1159-1166.

Rovere, P., Sabbadini, M. G., Vallinoto, C., Fascio, U., Zimmermann, V. S., Bondanza, A., Ricciardi-Castagnoli, P., and Manfredi, A. A. (1999). Delayed clearance of apoptotic lymphoma cells allows cross-presentation of intracellular antigens by mature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 66, 345-349.

Rovere, P., Vallinoto, C., Bondanza, A., Crosti, M. C., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rugarli, C., and Manfredi, A. A. (1998). Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* 161, 4467-4471.

Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275, 1790-1792.

Rutault, K., Alderman, C., Chain, B. M., and Katz, D. R. (1999). Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med* 26, 232-238.

Sadanaga, N., Nagashima, H., Mashino, K., Tahara, K., Yamaguchi, H., Ohta, M., Fujie, T., Tanaka, F., Inoue, H., Takesako, K., *et al.* (2001). Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 7, 2277-2284.

Saikh K.U., Khan A.S., Kissner T., Ulrich R.G. (2001). IL-15-induced conversion of monocytes to mature dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 126, 447-455.

Sakaguchi, S. (2003). Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors. *J Exp Med* 197, 397-401.

Sakahira, H., Takemura, Y., and Nagata, S. (2001). Enzymatic active site of caspase-activated DNase (CAD) and its inhibition by inhibitor of CAD. *Arch Biochem Biophys* 388, 91-99.

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 alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.

- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Mackay, C. R. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* *19*, 568-574.
- 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*, 1617-1625.
- Sanchez, E. Q., Marubashi, S., Jung, G., Levy, M. F., Goldstein, R. M., Molmenti, E. P., Fasola, C. G., Gonwa, T. A., Jennings, L. W., Brooks, B. K., and Klintmalm, G. B. (2002). De novo tumors after liver transplantation: a single-institution experience. *Liver Transpl* *8*, 285-291.
- 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*, 423-434.
- Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* *407*, 784-788.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* *14*, 131-136.
- Schadendorf, D., Paschen, A., and Sun, Y. (2000). Autologous, allogeneic tumor cells or genetically engineered cells as cancer vaccine against melanoma. *Immunol Lett* *74*, 67-74.
- Scheffer, S. R., Nave, H., Korangy, F., Schlote, K., Pabst, R., Jaffee, E. M., Manns, M. P., and Greten, T. F. (2003). Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. *Int J Cancer* *103*, 205-211.
- Schnurr, M., Chen, Q., Shin, A., Chen, W., Toy, T., Jenderek, C., Green, S., Miloradovic, L., Drane, D., Davis, I. D., *et al.* (2004). Tumor antigen processing and presentation depends critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood*.
- Schnurr, M., Galambos, P., Scholz, C., Then, F., Dauer, M., Endres, S., and Eigler, A. (2001). Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res* *61*, 6445-6450.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* *393*, 480-483.
- Schuler-Thurner, B., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Bender, A., Maczek, C., Jonuleit, H., Roder, C., Haendle, I., Leisgang, W., Dunbar, R., *et al.* (2000). Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* *165*, 3492-3496.
- Schuler-Thurner, B., Schultz, E. S., Berger, T. G., Weinlich, G., Ebner, S., Woerl, P., Bender, A., Feuerstein, B., Fritsch, P. O., Romani, N., and Schuler, G. (2002). Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* *195*, 1279-1288.
- Schumacher, K., Haensch, W., Roefzaad, C., and Schlag, P. M. (2001). Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* *61*, 3932-3936.

- Schwartzentruber, D. J., Hom, S. S., Dadmarz, R., White, D. E., Yannelli, J. R., Steinberg, S. M., Rosenberg, S. A., and Topalian, S. L. (1994). In vitro predictors of therapeutic response in melanoma patients receiving tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2. *J Clin Oncol* 12, 1475-1483.
- Selikoff, I. J., Churg, J., and Hammond, E. C. (1965). Relation between exposure to asbestos and mesothelioma. *N Engl J Med* 272, 560-565.
- Serrano, A., Garcia, A., Abril, E., Garrido, F., and Ruiz-Cabello, F. (1996). Methylated CpG points identified within MAGE-1 promoter are involved in gene repression. *Int J Cancer* 68, 464-470.
- Sgadari, C., Angiolillo, A. L., and Tosato, G. (1996). Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 87, 3877-3882.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Shedlock, D. J., and Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.
- Shi, Y., Evans, J. E., and Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516-521.
- Shi, Y., Zheng, W., and Rock, K. L. (2000). Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14590-14595.
- Shimizu, K., Fields, R. C., Giedlin, M., and Mule, J. J. (1999). Systemic administration of interleukin 2 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2268-2273.
- 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, 1835-1837.
- Sigalotti, L., Coral, S., Altomonte, M., Natali, L., Gaudino, G., Cacciotti, P., Libener, R., Colizzi, F., Vianale, G., Martini, F., *et al.* (2002). Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications. *Br J Cancer* 86, 979-982.
- Simons, J. W. (1997). Bioactivity of human GM-CSF gene therapy in metastatic renal cell carcinoma and prostate cancer. *Hinyokika Kyo* 43, 821-822.
- Simons, J. W., Jaffee, E. M., Weber, C. E., Levitsky, H. I., Nelson, W. G., Carducci, M. A., Lazenby, A. J., Cohen, L. K., Finn, C. C., Clift, S. M., *et al.* (1997). Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Res* 57, 1537-1546.
- Simons, J. W., Mikhak, B., Chang, J. F., DeMarzo, A. M., Carducci, M. A., Lim, M., Weber, C. E., Baccala, A. A., Goemann, M. A., Clift, S. M., *et al.* (1999). Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res* 59, 5160-5168.

Singh-Jasuja, H., Hilf, N., Scherer, H. U., Arnold-Schild, D., Rammensee, H. G., Toes, R. E., and Schild, H. (2000a). The heat shock protein gp96: a receptor-targeted cross-priming carrier and activator of dendritic cells. *Cell Stress Chaperones* 5, 462-470.

Singh-Jasuja, H., Scherer, H. U., Hilf, N., Arnold-Schild, D., Rammensee, H. G., Toes, R. E., and Schild, H. (2000b). The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* 30, 2211-2215.

Skipper, J., and Stauss, H. J. (1993). Identification of two cytotoxic T lymphocyte-recognized epitopes in the Ras protein. *J Exp Med* 177, 1493-1498.

Smyth, M. J., Godfrey, D. I., and Trapani, J. A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2, 293-299.

Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J. C., Hodi, F. S., Liebster, L., Lam, P., Mentzer, S., *et al.* (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13141-13146.

Somersan, S., Larsson, M., Fonteneau, J. F., Basu, S., Srivastava, P., and Bhardwaj, N. (2001). Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 167, 4844-4852.

Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R., and Mantovani, A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161, 1083-1086.

Sparwasser, T., Koch, E. S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G. B., Ellwart, J. W., and Wagner, H. (1998). Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 28, 2045-2054.

Spiotto, M. T., Yu, P., Rowley, D. A., Nishimura, M. I., Meredith, S. C., Gajewski, T. F., Fu, Y. X., and Schreiber, H. (2002). Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity* 17, 737-747.

Spisek, R., Chevallier, P., Morineau, N., Milpied, N., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J. L., Meflah, K., and Gregoire, M. (2002). Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. *Cancer Res* 62, 2861-2868.

Srivastava, P. K., and Udono, H. (1994). Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 6, 728-732.

Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E., and Li, Z. (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 39, 93-98.

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, 1142-1162.

Steinman, R. M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711.

- Steinman, R. M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P., and Mellman, I. (1999). Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* *60*, 562-567.
- 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.
- Stern, M., Savill, J., and Haslett, C. (1996). Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am J Pathol* *149*, 911-921.
- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T. M., and Germain, R. N. (2002). Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* *296*, 1873-1876.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* *69*, 217-245.
- Streilein, J. W. (1995). Unraveling immune privilege. *Science* *270*, 1158-1159.
- Strobl, H., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C., Pickl, W. F., Rappersberger, K., Majdic, O., and Knapp, W. (1996). TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol* *157*, 1499-1507.
- Stuart, L. M., Lucas, M., Simpson, C., Lamb, J., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2002). Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* *168*, 1627-1635.
- Stutman, O. (1979a). Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst* *62*, 353-358.
- Stutman, O. (1979b). Spontaneous tumors in nude mice: effect of the viable yellow gene. *Exp Cell Biol* *47*, 129-135.
- Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2003). Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* *63*, 2127-2133.
- Sun, J. C., and Bevan, M. J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* *300*, 339-342.
- Suri, R. M., and Austyn, J. M. (1998). Bacterial lipopolysaccharide contamination of commercial collagen preparations may mediate dendritic cell maturation in culture. *J Immunol Methods* *214*, 149-163.
- Suto, R., and Srivastava, P. K. (1995). A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* *269*, 1585-1588.
- 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*, 13146-13151.
- Tada, T., Ohzeki, S., Utsumi, K., Takiuchi, H., Muramatsu, M., Li, X. F., Shimizu, J., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. (1991). Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function.

Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol* *146*, 1077-1082.

Takahashi, K., Shichijo, S., Noguchi, M., Hirohata, M., and Itoh, K. (1995). Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res* *55*, 3478-3482.

Takahashi, T., Makiguchi, Y., Hinoda, Y., Kakiuchi, H., Nakagawa, N., Imai, K., and Yachi, A. (1994). Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J Immunol* *153*, 2102-2109.

Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* *21*, 335-376.

Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* *195*, 161-169.

Tanaka, Y., Tevethia, M. J., Kalderon, D., Smith, A. E., and Tevethia, S. S. (1988). Clustering of antigenic sites recognized by cytotoxic T lymphocyte clones in the amino terminal half of SV40 T antigen. *Virology* *162*, 427-436.

Tani, K., Nakazaki, Y., Hase, H., Takahashi, K., Azuma, M., Ohata, J., Kitamura, R., Komine, F., Oiwa, M., Masunaga, A., *et al.* (2000). Progress reports on immune gene therapy for stage IV renal cell cancer using lethally irradiated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced autologous renal cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* *46 Suppl*, S73-76.

Taylor, P. R., Carugati, A., Fadok, V. A., Cook, H. T., Andrews, M., Carroll, M. C., Savill, J. S., Henson, P. M., Botto, M., and Walport, M. J. (2000). A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med* *192*, 359-366.

Tenderich, G., Deyerling, W., Schulz, U., Heller, R., Hornik, L., Schulze, B., Jahanyar, J., and Koerfer, R. (2001). Malignant neoplastic disorders following long-term immunosuppression after orthotopic heart transplantation. *Transplant Proc* *33*, 3653-3655.

Thomas, A. M., Santarsiero, L. M., Lutz, E. R., Armstrong, T. D., Chen, Y. C., Huang, L. Q., Laheru, D. A., Goggins, M., Hruban, R. H., and Jaffee, E. M. (2004). Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J Exp Med* *200*, 297-306.

Thomas, L. (1959). Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states (New York).

Thomas, R., Chambers, M., Boytar, R., Barker, K., Cavanagh, L. L., MacFadyen, S., Smithers, M., Jenkins, M., and Andersen, J. (1999). Immature human monocyte-derived dendritic cells migrate rapidly to draining lymph nodes after intradermal injection for melanoma immunotherapy. *Melanoma Res* *9*, 474-481.

Thornberry, N. A. (1999). Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ* *6*, 1023-1027.

Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* *281*, 1312-1316.

Turner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., *et al.* (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-

pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* *190*, 1669-1678.

Timmerman, J. M., Czerwinski, D. K., Davis, T. A., Hsu, F. J., Benike, C., Hao, Z. M., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C. B., Okada, C. Y., *et al.* (2002). Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* *99*, 1517-1526.

Titzer, S., Christensen, O., Manzke, O., Tesch, H., Wolf, J., Emmerich, B., Carsten, C., Diehl, V., and Bohlen, H. (2000). Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *Br J Haematol* *108*, 805-816.

Tjoa, B. A., Erickson, S. J., Bowes, V. A., Ragde, H., Kenny, G. M., Cobb, O. E., Ireton, R. C., Troychak, M. J., Boynton, A. L., and Murphy, G. P. (1997). Follow-up evaluation of prostate cancer patients infused with autologous dendritic cells pulsed with PSMA peptides. *Prostate* *32*, 272-278.

Tjoa, B. A., Simmons, S. J., Bowes, V. A., Ragde, H., Rogers, M., Elgamal, A., Kenny, G. M., Cobb, O. E., Ireton, R. C., Troychak, M. J., *et al.* (1998). Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* *36*, 39-44.

Tjoa, B. A., Simmons, S. J., Elgamal, A., Rogers, M., Ragde, H., Kenny, G. M., Troychak, M. J., Boynton, A. L., and Murphy, G. P. (1999). Follow-up evaluation of a phase II prostate cancer vaccine trial. *Prostate* *40*, 125-129.

Todryk, S., Melcher, A. A., Hardwick, N., Linardakis, E., Bateman, A., Colombo, M. P., Stoppacciaro, A., and Vile, R. G. (1999). Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol* *163*, 1398-1408.

Topalian, S. L., Gonzales, M. I., Parkhurst, M., Li, Y. F., Southwood, S., Sette, A., Rosenberg, S. A., and Robbins, P. F. (1996). Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med* *183*, 1965-1971.

Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* *47*, 187-376.

Trinchieri, G., and Scott, P. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. *Res Immunol* *146*, 423-431.

Triozi, P. L., Khurram, R., Aldrich, W. A., Walker, M. J., Kim, J. A., and Jaynes, S. (2000). Intratumoral injection of dendritic cells derived in vitro in patients with metastatic cancer. *Cancer* *89*, 2646-2654.

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

Udono, H., and Srivastava, P. K. (1993). Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* *178*, 1391-1396.

Urban, B. C., Willcox, N., and Roberts, D. J. (2001). A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8750-8755.

Uyttenhove, C., Godfraind, C., Lethe, B., Amar-Costesec, A., Renauld, J. C., Gajewski, T. F., Duffour, M. T., Warnier, G., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (1997). The expression of mouse gene P1A in testis does not prevent safe induction of cytolytic T cells against a P1A-encoded tumor antigen. *Int J Cancer* *70*, 349-356.

Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C. J., Issels, R. D., and Wagner, H. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277, 15107-15112.

Valladeau, J., Duvert-Frances, V., Pin, J. J., Dezutter-Dambuyant, C., Vincent, C., Massacrier, C., Vincent, J., Yoneda, K., Banchereau, J., Caux, C., *et al.* (1999). The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* 29, 2695-2704.

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 den Eynde, B., Lethe, B., Van Pel, A., De Plaen, E., and Boon, T. (1991). The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J Exp Med* 173, 1373-1384.

Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S., and Boon, T. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 182, 689-698.

Verdijk, R. M., Mutis, T., Esendam, B., Kamp, J., Melief, C. J., Brand, A., and Goulmy, E. (1999). Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol* 163, 57-61.

Vermorken, J. B., Claessen, A. M., van Tinteren, H., Gall, H. E., Ezinga, R., Meijer, S., Scheper, R. J., Meijer, C. J., Bloemena, E., Ransom, J. H., *et al.* (1999). Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 353, 345-350.

Vilella, R., Benitez, D., Mila, J., Lozano, M., Vilana, R., Pomes, J., Tomas, X., Costa, J., Vilalta, A., Malvehy, J., *et al.* (2004). Pilot study of treatment of biochemotherapy-refractory stage IV melanoma patients with autologous dendritic cells pulsed with a heterologous melanoma cell line lysate. *Cancer Immunol Immunother* 53, 651-658.

Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350-351.

Wagner, J. C., Sleggs, S. A., and Marchand, P. (1960). Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western cape province. *Br J Ind Med* 17, 260-271.

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J. P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-617.

Wen, Y. J., and Lim, S. H. (1997). T cells recognize the VH complementarity-determining region 3 of the idiotypic protein of B cell non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Immunol* 27, 1043-1047.

Wen, Y. J., Min, R., Tricot, G., Barlogie, B., and Yi, Q. (2002). Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. *Blood* 99, 3280-3285.

- Wiethe, C., Dittmar, K., Doan, T., Lindenmaier, W., and Tindle, R. (2003). Provision of 4-1BB ligand enhances effector and memory CTL responses generated by immunization with dendritic cells expressing a human tumor-associated antigen. *J Immunol* *170*, 2912-2922.
- Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* *3*, 521-530.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* *269*, 1281-1284.
- Wolkers, M. C., Brouwenstijn, N., Bakker, A. H., Toebes, M., and Schumacher, T. N. (2004). Antigen bias in T cell cross-priming. *Science* *304*, 1314-1317.
- Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R., and June, C. H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* *61*, 4766-4772.
- Woo, E. Y., Yeh, H., Chu, C. S., Schlienger, K., Carroll, R. G., Riley, J. L., Kaiser, L. R., and June, C. H. (2002). Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* *168*, 4272-4276.
- Wustrow, T.P., Zenner, H.P. (1985). Natural killer cells activity in patients with carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* *95*, 1391-1400.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* *284*, 555-556.
- Wyllie, A. H. (1997). Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* *53*, 451-465.
- Yamanaka, R., Abe, T., Yajima, N., Tsuchiya, N., Homma, J., Kobayashi, T., Narita, M., Takahashi, M., and Tanaka, R. (2003). Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial. *Br J Cancer* *89*, 1172-1179.
- Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H., and Yamaguchi, Y. (1998). EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol* *161*, 3096-3102.
- Yannelli, J. R., Hyatt, C., Johnson, S., Hwu, P., and Rosenberg, S. A. (1993). Characterization of human tumor cell lines transduced with the cDNA encoding either tumor necrosis factor alpha (TNF- α) or interleukin-2 (IL-2). *J Immunol Methods* *161*, 77-90.
- Yee, C., Thompson, J. A., Roche, P., Byrd, D. R., Lee, P. P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M. M., Riddell, S. R., and Greenberg, P. D. (2000). Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J Exp Med* *192*, 1637-1644.
- Yokoyama, W. M. (2000). Now you see it, now you don't! *Nat Immunol* *1*, 95-97.
- Young, J. W., and Inaba, K. (1996). Dendritic cells as adjuvants for class I major histocompatibility complex-restricted antitumor immunity. *J Exp Med* *183*, 7-11.

Yu, J. S., Liu, G., Ying, H., Yong, W. H., Black, K. L., and Wheeler, C. J. (2004). Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 64, 4973-4979.

Yu, J. S., Wheeler, C. J., Zeltzer, P. M., Ying, H., Finger, D. N., Lee, P. K., Yong, W. H., Incardona, F., Thompson, R. C., Riedinger, M. S., *et al.* (2001). Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res* 61, 842-847.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., *et al.* (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348, 203-213.

Zheng, H., Dai, J., Stoilova, D., and Li, Z. (2001). Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J Immunol* 167, 6731-6735.

Etude de la présentation croisée d'antigènes de tumeurs par cellules dendritiques ayant phagocyté des cellules mortes.

Résumé

Le récent essor dans l'identification d'antigènes exprimés par les cellules tumorales et reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ a permis d'envisager le développement d'immunothérapies des cancers. Aujourd'hui, l'injection de cellules dendritiques (DC) exprimant des antigènes de tumeurs est considérée comme l'une des approches d'immunothérapie active les plus prometteuses. La source d'antigènes de tumeurs pour les DC reste un élément critique qui va déterminer l'efficacité de ces vaccins anti-tumoraux. Dans cette étude, nous avons mis en évidence la pertinence de l'utilisation de cellules apoptotiques exprimant des protéines de stress (HSP) comme stratégie de chargement d'antigènes de tumeurs pour les DC. En effet, nous montrons la faisabilité de générer des réponses T cytotoxiques spécifiquement dirigées contre des tumeurs de mésothéliome via la stimulation de lymphocytes T naïfs par des DC ayant phagocyté des corps apoptotiques exprimant des HSP. L'ensemble de ces résultats soulignent l'importance d'associer l'apoptose à des signaux dangers dans le but d'induire des réponses anti-tumorales.

Mots-clés : Cellules dendritiques, apoptose, immunothérapie, mésothéliome.

Study of the cross-presentation of tumour antigens from dendritic cells loaded with dead cells.

Abstract

Over the past decade, the increasing knowledge in the molecular identification of tumour antigens that are capable of eliciting T-cell responses has revolutionised the field of cancer therapy. To date, injections of tumour antigen-expressing dendritic cells (DC) represent a promising of active immunotherapy strategy. However, the source of tumour-associated antigens (TAA) remains a critical issue which will further determine the efficacy of DC-based vaccines. In this study, we show the relevance of using heat shock proteins (HSP)-expressing apoptotic cells as TAA loading strategy for DC. Indeed, we demonstrate the feasibility of inducing mesothelioma tumour-specific cytotoxic T cell responses from stimulations of naïve T cells with DC loaded with HSP-expressing apoptotic cells. Altogether, these results emphasize the importance of providing danger signals to apoptosis in order to induce potent anti-tumour responses.

Key words : Dendritic cells, apoptosis, immunotherapy, mesothelioma.