

Université de Nantes  
Faculté de Médecine et Techniques Médicales

# **Optimisation de la production de cellules dendritiques pour leur utilisation en immunothérapie anti-tumorale**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE  
Discipline : Sciences de la vie et de la Santé  
Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**SIMON Thomas**

Le 9 novembre 2009, devant le jury ci-dessous

<i>Président du jury</i>	PLUMAS Joël, Directeur de recherche EFS, Grenoble
<i>Rapporteurs</i>	GAUGLER Béatrice, Chargée de recherche, Besançon
<i>Examineur</i>	BACH Jean-Marie, Directeur de recherche, Nantes
<i>Directeur de Thèse</i>	GREGOIRE Marc, Directeur de recherche, Nantes

## ABREVIATIONS

aGvHD:	“ acute graft versus host disease”
ACT:	“adoptive cell transfert”
ADCC :	“antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity”
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire d’un brin d’ARN
AEP :	“asparagine-specific endopeptidase”
AICD:	“activation-induced cell death”
APRIL:	“a proliferation-inducing ligand”
ARN:	acide ribonucléique
B2R :	récepteur à la bradykinine
B7-H:	“B7-homologue”
BAFF / BlyS:	“B cell-activating factor / B lymphocyte stimulator”
BCR:	“B-cell receptor”
BDCA:	“blood DC antigen”
BTLA:	“B- and T-lymphocyte attenuator”
CD:	“cluster of differentiation”
CDC	“Complement Dependant Cytotoxicity”
CLA :	“cutaneous lymphocyte-associated antigen”
CLEC:	“C-type lectin-like receptor”
CLIP:	“class II-associated Ii-derived peptide”
CLR:	“c-type lectin receptor”
CMH :	complexe majeur d’histocompatibilité
CMV:	cytomégalovirus
CO :	monoxyde de carbone
COX :	cyclooxygénase
APC :	“ antigen presenting cell” (ou CPA)
CR:	“complement récepteur”
CRD:	“carbohydrate recognition domain”
CSF-R:	“colony stimulating factor receptor”
CTL:	“cytotoxic T lymphocyte”
CTLA-4:	“cytotoxic T lymphocyte-associated 4”
DAK:	“DC-mediated activation of killer cells”
DC:	“dendritic cell”
DCAR:	“DC immunoactivating receptor”
DCIR:	“dendritic cell immunoreceptor”
DC-SIGN:	“dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin”
Dectin:	“DC-associated C-type lectin”
dsRNA:	“double strand RNA”
EBI3:	“Epstein Barr virus-induced gene 3”
ERAAP :	“Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing”
ERAD :	ER-Associated Degradation system
FcR:	récepteur au fragment Fc des Ig
FGF:	“fibroblast growth factor”
FoxP3 :	“Forkhead box P3”
GITR :	“glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor”
GM-CSF:	“granulocyte macrophage – colony stimulating factor”

GMP :	“Good Manufacturing Practice
GP96:	glycoprotéine 96
GTP:	guanine tri-phosphate
HEV:	“high endothelial veinule”
HIV:	“human immunodeficiency virus”
HLA:	“human leukocyte antigen”
HMGB1:	“high mobility group box 1”
HO-1:	“heme oxygenase-1”
HSP:	“heat-shock protein”
HVEM:	“Herpesvirus entry mediator”
ICAM:	“intercellular adhesion molecule”
ICOS:	“inducible T-cell costimulator”
IDO:	“indoleamine dioxygenase”
IFN:	interféron
IFNAR :	“IFNalpha recepteur”
Ig :	Immunoglobuline
IGIF :	“IFN $\gamma$ inducing factor”
IL:	interleukine
IL3Ra:	chaîne alpha du récepteur à l’interleukine 3
IL1RA:	“IL1 recepteur antagonist”
i-NOS:	“ inducible- nitric oxyde synthase”
ITAM :	“ immunoreceptor tyrosine-based activation motif”
ITIM	“ immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif”
KIR:	“killer-cell immunoglobulin-like receptor”
KLH	“Keyhole Limpet Hemocyanine”
IRF:	“interferon regulatory factor”
LAF :	“lymphocyte activating factor”
LCA:	“leukocyte common antigen”
LFA:	“ Lymphocyte Function-associated Antigen”
LIF :	“leukaemia inhibitory factor”
LMP:	“large multicatalytic protease”
LOX-1:	“lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor -1”
LPS:	lipopolysaccharide
LRR :	“ Leucin-Rich-Repeat
MIIC:	“MHC II compartment”
MCM	“Monocyte-Conditioned Medium”
MCP	“Monocyte Chemoattractant Protein ”
M-CSF:	“macrophage-colony stimulating factor”
MDA-5:	“melanoma differentiation-associated gene 5” (=Helicard)
MECL-1:	“ Multicatalytic endopeptidase complex subunit”
MICL:	“myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor”
MIP	“Macrophage Inflammatory Protein”
MMP:	“matrix metalloproteinase”
MMR :	“ macrophage mannose receptor”
MPS:	système phagocytaire mononucléaire
MR:	“mannose receptor” (MMR: macrophage mannose receptor)
1-MT:	1-méthyl tryptophane
MyD88:	“myeloid differentiation primary response gene 88”
NALP:	“NACHT-LRR-PYR-containing proteins”
NFkB:	“nuclear factor kappa-B”

NK:	“natural killer”
NKR:	“natural killer recepteur”
NKT cell:	“natural killer T cell”
NLR:	“Nod-like receptor”
NO:	“nitric oxide”
Nod:	“nucleotide-binding oligomerisation domain”
PAF:	“platelet-activating factor”
PAMP:	“pathogen-associated molecular pattern”
PAP :	“Prostatic Antigen Phosphatase”
PBMC :	“Peripheral Blood Mononuclear Cells”
PCR	“ Polymerase Chain Reaction”
PD-1:	“programmed death-1”
PD-L:	“programmed death – ligand”
PKR:	“double-stranded RNA-dependent protein kinase”
polyIC:	“polyinositic cytidilic acid”
PRR:	“pattern recognition receptor”
RANK :	“Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B”
RANTES	“ Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted”
RE:	réticulum endoplasmique
RIG-1:	“retinoic acid-inducible gene 1”
RLR:	“RIG-1-like receptor”
SAP:	“SLAM-associated protein”
SARM:	“sterile alpha motif and armadillo motif domain-containing protein”
SLAM:	“signalling lymphocyte activation molecule”
SLC	“Secondary Lymphoid-Tissue Chemokine”
SMAC:	“supramolecular activation cluster”
SP-A:	“surfactant protein-A”
SR:	“scavenger receptor”
TAP:	“transporter associated with antigen processing”
TEM:	lymphocytes T effecteurs-mémoires
TCGF :	“T cell growth factor”
TCM:	lymphocytes T centraux-mémoires
TCR:	“T-cell receptor”
TGF:	“tissue growth factor”
Th1:	lymphocyte T helper de type 1
Th2:	lymphocyte T helper de type 2
TIL:	“tumor-infiltrating lymphocyte”
TIMP:	“tissue inhibitor of metalloproteinase”
TIR:	“TLR / IL1R domain”
TIRAP:	“TIR-domain-containing adaptor protein (= MAL)”
TLR:	“toll-like receptor”
TNF:	“tumor necrosis factor”
TNFR:	“TNF receptor”
TRAM:	“TRIF-related adaptor molecule (= TIRP ou TICAM-2)”
TRANCE :	“TNF-related activation-induced cytokine”
Treg:	lymphocyte T régulateur
Ts:	lymphocyte T supresseur
TRIF:	“TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ (= TICAM-1)”
VIP:	“vasoactive intestinal peptide”
VLA:	“very late activation protein”

WARS: “tryptophanyl t-RNA synthetase”

<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>I) Les cellules dendritiques</b>	<b>9</b>
I.1) Découverte, histoire	9
I.2) Sous-populations et localisations	10
I.3) Caractérisation - description phénotypique	13
I.3.a) Récepteurs du « non-soi » : TLR, RLR et NLR	13
I.3.b) Récepteurs d'endocytose	18
I.3.c) Récepteurs de danger	22
I.3.d) Molécules de présentation antigénique	24
I.3.e) Molécules de costimulation	24
α) Famille B7	25
β) Famille de TNF/TNFR	29
γ) Autres	32
I.3.f) Molécules solubles : cytokines et chimiokines	33
α) Les Chimiokines	33
β) Les Cytokines	36
I.4) Fonctions	44
I.4.a) Recrutement des DC vers les tissus périphériques	44
I.4.b) Internalisation des antigènes	45
I.4.c) Apprêtement et présentation des antigènes internalisés	47
α) Présentation des antigènes sur le CMH de classe I	47
β) Présentation des antigènes sur le CMH de classe II	50
γ) Présentation restreinte au système CD1	50
I.4.d) Maturation	51
I.4.e) Migration des DC vers les tissus périphériques	52
I.5) <i>Activation du système immunitaire</i>	53
I.5.a) Interaction DC/Lymphocytes T	53
α) Synapse immunologique	54
β) Activation des lymphocytes T	55
γ) Conditionnement des DC par les lymphocytes CD4	56
δ) Génération de lymphocytes T CD8 mémoires	57
ε) Génération de lymphocytes T régulateurs	61
I.5.b) Interaction DC/cellules NK	63
I.5.c) Interaction DC/lymphocytes B	64
II.1) L'immunothérapie passive	66
II.1.a) Les anticorps monoclonaux	66
II.1.b) Les macrophages	67
II.1.c) Les lymphocytes	67
II.2) L'immunothérapie active	68
II.2.a) Vaccination par injection d'antigènes de tumeur	68
II.2.b) Vaccination par injection de cellules tumorales	68
II.2.c) Vaccination par injection de cellules dendritiques	69
II.3) Les DC et la vaccination anti-tumorale	70
II.4) Préparation des cellules dendritiques	72
II.4.a) Sous-populations de DC utilisées	72
α) DC circulantes isolées <i>in vivo</i>	73
β) DC dérivées des précurseurs CD34+	73
γ) DC dérivées des monocytes	73
δ) DC dérivées de cellules tumorales	74
II.4.b) Maturation des DC dérivées de monocytes	75
II.4.c) Chargement des DC	77
α) Peptides	77
β) Cellules mortes	78
γ) Protéines	79

δ) ADN-ARN	79
ε) Fusion	80
II.4.d) Posologie et site d'injection	80
<b>RESULTATS</b>	<b>85</b>
<b>I) Production de DC pour un usage clinique</b>	<b>85</b>
I.1) Introduction	85
I.2) Article	85
<b>II) Maturation séquentielle des DC et signaux helpers</b>	<b>95</b>
II.1) Introduction	95
II.2) Article	95
II.3) Résultats supplémentaires	122
<b>DISCUSSION - PERSPECTIVES</b>	<b>125</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>129</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>156</b>

# ***INTRODUCTION***

# INTRODUCTION

Le système immunitaire est structuré autour d'organes lymphoïdes I et II aux fonctions complémentaires et son efficacité tient du fait qu'une grande partie des cellules immunocompétentes est capable de circuler dans les tissus et dans l'ensemble de l'organisme grâce aux systèmes lymphatiques et sanguins.

Les organes lymphoïdes I que sont la moëlle osseuse et le thymus sont le site de production de toutes les cellules de l'immunité et en particulier des lymphocytes « naïfs ». Les organes lymphoïdes II que sont la rate, les nœuds lymphatiques, les plaques de Peyer et les structures lymphoïdes associées aux muqueuses (amygdales) permettent le regroupement des éléments (antigènes, particules et cellules) issus du drainage des tissus par le système sanguin et lymphatique. Les cellules dendritiques (DC) font partie intégrante de ce système de collecte puisqu'elles migrent dans les organes II pour venir présenter aux lymphocytes T les antigènes capturés en périphérie. Ainsi, les organes lymphoïdes secondaires permettent aux cellules immunocompétentes de se regrouper, d'interagir et de produire anticorps, cytokines et cellules activées pour l'immunité spécifique.

## **I) Les cellules dendritiques**

### **I.1) Découverte, histoire**

Les DC ont initialement été considérées comme des artéfacts. De par leurs longs prolongements cytoplasmiques (« dendrites »), elles ont au préalable été assimilées à des terminaisons nerveuses, d'où leur nom. Mais leur localisation particulière (peau, muqueuses et tissus lymphoïdes secondaires) et leur fonction ont permis de les distinguer des cellules nerveuses. Bien qu'exprimant certaines molécules neurodynamiques, comme les sémaphorines (Kikutani and Kumanogoh 2003) (impliquées dans la croissance des axones neuronaux), elles n'ont aucune propriété de transduction d'influx électriques, mais représentent par contre un élément central pour la transmission de signaux de danger et l'orientation de la réponse immunitaire.

Leurs premières observations datent de 1868, par Paul Langerhans, qui donna par la suite son nom à un sous-type de DC, présentes dans la peau. De nombreuses années furent nécessaires à la découverte de leur origine, rôle et fonctionnement. Ce n'est qu'en 1973 que leur rôle dans la présentation antigénique fut démontré (Steinman and Cohn 1973) et en 1979 que leur origine hématopoïétique fut établie (Katz *et al.* 1979).

## I.2) Sous-populations et localisations

On distingue deux types de population de DC selon leur origine cellulaire: lymphoïdes et myéloïdes. Dérivant d'un progéniteur hématopoïétique commun (CD34+), à l'origine de deux types majeurs de précurseurs sanguins, leur filiation n'est pas encore totalement éclaircie (Figure 1). La différenciation des divers types de DC dépend du microenvironnement et des stimuli présents dans les organes lymphoïdes primaires et les tissus périphériques, mais la précocité de cette distinction est encore controversée. Etant donnée la complexité de caractérisation des sous-populations de DC et les différences observées entre le modèle animal, murin en particulier, et le modèle humain, nous ne détaillerons pas le profil des DC de souris et nous nous limiterons aux DC humaines.

Peu d'études ont été réalisées sur la filiation *in vivo* des DC humaines, la distinction des sous-types se basant essentiellement sur des études de culture *in vitro*.

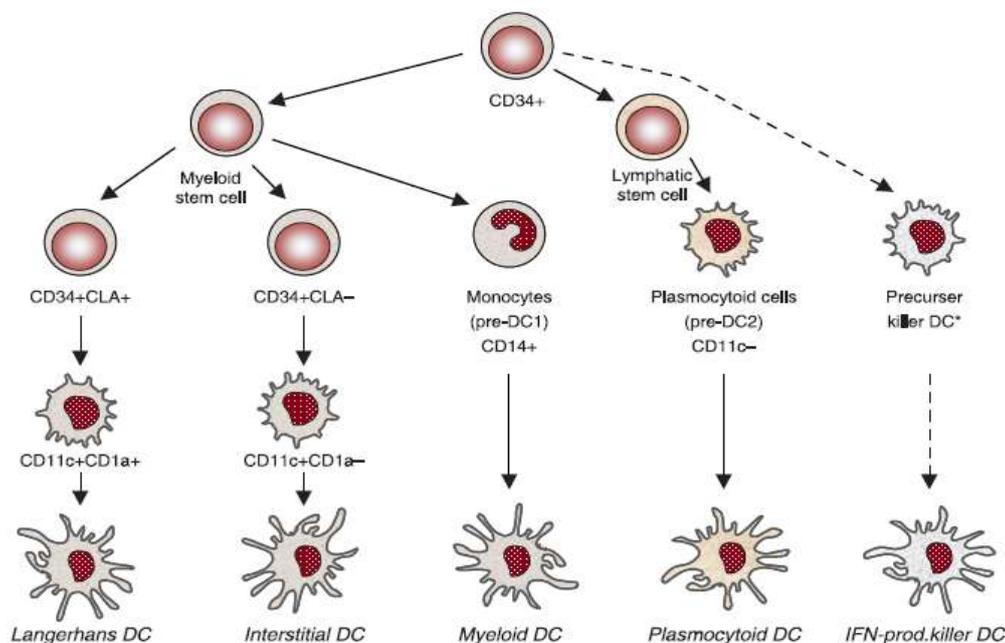


Figure 1: Voies de développement des DC humaines (Schott 2006)

CLA : cutaneous lymphocyte-associated antigen ,

Il semblerait que les cellules dendritiques interstitielles du derme, ainsi que les cellules de Langerhans des épithéliums de la peau et des muqueuses, dérivent d'un progéniteur aux caractéristiques myéloïdes (CD11c+) (Luft *et al.* 2002) (Table 1), sous l'effet de cytokines produites par les cellules endothéliales et les cellules stromales (GM-CSF et IL-4 pour les premières, TGF $\beta$ , TNF ou IL-15 pour les secondes) (Palucka and Banchereau 2006). Elles pourraient aussi dériver directement des monocytes sanguins (CD14+ CD11c+). Récemment, il a été démontré chez la souris que les cellules de Langerhans dérivent d'un sous-type de monocytes (CSF1R+, Gr-1+) (Ginhoux *et al.* 2006). Il est possible que ce soit également le cas chez l'homme, les monocytes étant, entre autres, aussi à l'origine de la lignée macrophagique. Monocytes, macrophages et DC forment ainsi avec les ostéoclastes et les cellules microgliales le système phagocytaire mononucléaire (MPS).

Les cellules de Langerhans, qui se caractérisent par l'expression spécifique de la Langerine, ainsi que par des organites particuliers, les granules de Birbeck, forment avec les DC interstitielles ce que l'on appelle les DC conventionnelles.

Les cellules lymphoïdes, quant à elles, dérivent d'un progéniteur CD14- CD11c- IL-3R $\alpha$ + (CD123) sous l'effet de l'IL-3 et du CD40L. On les prénomme aussi les cellules dendritiques plasmacytoïdes, spécialisées dans la production des interférons de type I. La distinction entre les deux types de lignage n'est pas parfaite puisqu'un troisième précurseur CD14- CD11c+ a été décrit, donnant *in vitro* différents types de cellules dendritiques, mais dont la différenciation semble plutôt spontanée. Il est de ce fait soumis à controverse.

Nomenclature	Plasmacytoid DC	Interstitial DC	Langerhans DC
<b>Precursors in blood</b>	CD11c- IL-3R+	CD11c+ CD1a+ IL-3R- or CD14+ CD11c+ monocytes	CD11c+ CD1a+ IL-3R- or CD14+ CD11c+ monocytes
<b>Phenotype</b> (6-11, 57, 60, 62, 70, 71)	CD11c- IL-3R+ high HLA-DR+ CD11b- CD13- CD33- CD4+ CD1a- Birbeck granule- Factor V111+ Langerin- CD86+ CD40+ CD80+	CD11c+ IL-3R dull HLA-DR+ CD11b+ CD13+ CD33+ CD4+ CD1a- Birbeck granule- Factor V111+ Langerin- CD86+ CD40+ CD80+	CD11c+ IL-3R- HLA-DR+ CD11b+ CD13+ CD33+ CD4+ CD1a+ Birbeck granule+ Factor V111- Langerin+ CD86+ CD40+ CD80+
<b>Localization</b> (58, 59, 78)	T-cell zones of lymphoid organs; DC precursors in blood	Germinal centers (GCDC)? DC precursors in blood; Immature cells in tissue interstices	T-cell zones of lymphoid organs; DC precursors in blood; Immature cells in epithelia
<b>Function</b>			
TLR expression on precursors (111, 112)	TLR 7++ 9++	CD14+ : TLR 1+2+4+5+ 8+ CD11c+ : TLR 1+2+3+	CD14+ : TLR 1+2+4+5+ 8+ CD11c+ : TLR 1+2+3+
IL-12(p70) secretion (89-93)	+/-	++++	++++
IL-10 secretion (6-11)	-	++++	+/-
IFN- $\alpha$ secretion (6-11, 78, 97)	++++	-	-
CD4 <sup>+</sup> T-cell priming (89, 103, 104)	++	++++	++++
CD8 <sup>+</sup> T-cell priming (6-11)	++	+++	++++
CTL activity (6-11)	?	++	+++
DC-B-cell interaction (6, 110)	+++++	++++	+

DC, dendritic cell; TLR, Toll-like receptor; IFN, interferon; CTL, cytotoxic T lymphocyte; IL, interleukin; HLA, human leukocyte antigen.

Table 1: **Sous-types de DC humaines** (Pulendran 2004)

A côté de ces grands types de cellules dendritiques, localisées dans les tissus périphériques, on trouve les cellules marginales de la rate, les cellules interdigitées des ganglions lymphatiques, celles des centres germinatifs, du thymus, du foie, du sang qui sont des sous-types supplémentaires ou, de manière plus probable, des états de maturation plus avancés des cellules dendritiques périphériques.

Ceci détermine grossièrement deux grandes populations de DC : celles résidant dans les tissus périphériques tels que la peau (épiderme et derme) et les muqueuses (intestinale, pulmonaire, vaginale, oculaire), étant plutôt dans un état immature capables de phagocyter des éléments pathogènes ou d'internaliser des antigènes du non-soi. Celles situées dans la lymphe, les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus sont plutôt dans un état mature, présentant les antigènes, qui résultent d'une migration et d'une maturation des DC périphériques.

Les DC étant en très faible proportion dans le sang (1 à 2 %), beaucoup d'études sont effectuées sur les DC dérivées des monocytes, grâce à la facilité pour isoler ces cellules à partir du sang, en grande quantité, et de les différencier en DC par l'ajout de GM-CSF et d'IL-4 (Romani *et al.* 1994; Sallusto and Lanzavecchia 1994). Bien que la différenciation des DC *in*

*in vivo* reste encore mal définie, il a été montré que les cellules NK étaient capables d'induire des DC à partir de monocytes grâce au GM-CSF et au CD40L qu'ils expriment (Zhang *et al.* 2007).

### **I.3) Caractérisation - description phénotypique**

Les DC ont longtemps été ignorées comme cellules immunitaires, ce n'est qu'en 1973 que Steinman et Crohn les décrivent comme les meilleures cellules professionnelles dans la présentation antigénique. Elles partagent, avec les lymphocytes B et les monocytes, quelques propriétés comme une forte expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et la capacité de phagocyter du matériel pathogène et de présenter à leur surface les peptides dérivants, apprêtés par les CMH. Par ce système de présentation antigénique restreinte au CMH, ces cellules présentatrices d'antigènes (CPA) peuvent déclencher une réponse immune adaptative par l'activation des lymphocytes T spécifiques différenciés.

Les DC font partie de ces CPA mais possèdent en plus l'unique capacité de stimuler des lymphocytes naïfs, de les sensibiliser pour les induire en différenciation et en prolifération. Elles sont dès lors capables d'orienter la réponse immune.

Ainsi, par leur localisation périphérique et leurs fonctions, les DC jouent le rôle de sentinelles pour le système immunitaire et se situent à l'interface entre le système inné et le système adaptatif.

#### *I.3.a) Récepteurs du « non-soi » : TLR, RLR et NLR*

Pour leur permettre de détecter une intrusion de pathogène, une inflammation ou une altération du « soi », les DC expriment différents récepteurs à leur surface ou dans le cytosol, principalement les récepteurs aux cytokines inflammatoires et les Pattern Recognition Receptors (PRR), récepteurs qui permettent la reconnaissance de motifs conservés entre les différents agents pathogènes, les Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP).

Parmi les PRR, les plus étudiés sont les Toll-like receptor (**TLR**). Ces récepteurs sont apparentés à la protéine Toll, initialement identifiée chez la drosophile, qui intervient dans la polarisation dorso-ventrale au stade larvaire et dans la réponse contre les bactéries ou les champignons chez l'adulte (Lemaitre, 2004) Les TLR se caractérisent par un domaine extracellulaire comportant des motifs LRR (Leucin-Rich-Repeat), qui interviennent dans

l'interaction avec les pathogènes, et un domaine intracellulaire TIR (Toll/IL-1R homology domain) responsable de la transmission du signal (Akira et al., 2006).

Treize TLR ont été identifiés à ce jour chez les mammifères et dix sont exprimés par les DC humaines. Par ailleurs, les populations de DC expriment un panel de récepteurs différents. Les pDC expriment en effet un répertoire restreint de TLR (TLR1, 6, 7, 9). Les résultats sont plus contradictoires concernant les DC dérivées de monocytes (Mo-DC) ou les DC myéloïdes. Les premières études concluent que ces populations n'expriment pas le TLR7 ni le TLR9 (Jarrossay *et al.*, 2001; Kadowaki *et al.*, 2001; Krug *et al.*, 2001). Plus récemment cependant, des auteurs ont mis en évidence, chez les DC myéloïdes, la présence de l'ARNm codant pour le TLR7 et leur capacité à répondre à l'imiquimod, un ligand spécifique de ce TLR (Ito *et al.*, 2002). L'expression du TLR9 par des DC conventionnelles a de plus été démontrée dernièrement (Hoene *et al.*, 2006).

Chaque TLR semble avoir une spécificité propre (Table 2). Par exemple, le groupe de Bruce Beutler a démontré en 1998 le rôle de TLR4 en tant que récepteur du *lipopolysaccharide* (LPS), molécule composante de la paroi des bactéries Gram-négatives (Poltorak A et al. 1998). De même, le TLR2 reconnaît plus spécifiquement l'acide lipoteichoïque de la paroi des bactéries Gram-positives. La plupart des TLR (TLR 1, 2, 4, 5 et 6) sont ainsi exprimées à la surface des DC. Cependant, les TLR capables de reconnaître les acides nucléiques (TLR 3, 7, 8 et 9) sont localisés dans des compartiments intracellulaires. Ces derniers sont en effet principalement destinés à reconnaître des molécules virales, tel que l'ARN simple brin ciblé par le TLR3, et sont à l'origine de la sécrétion des interférons de type I. Cependant, il est important de noter qu'une voie de reconnaissance cytoplasmique de l'ARN double brin indépendante du TLR3 a été découverte chez la souris. Elle se fait via les RIG-1-like receptor (**RLR**): RIG-1, MDA-5 (RNA helicases) et PKR dont l'activation aboutit à la sécrétion aussi bien des cytokines inflammatoires que des IFN I (Yoneyama *et al.* 2004; Kato *et al.* 2005). L'ADN viral possède aussi un récepteur cytoplasmique encore inconnu (Ishii *et al.* 2006). Ainsi, la sécrétion des IFN de type I suite à une infection virale (ARN double brin entre autres) est induite par deux familles de récepteurs mais dépend du type de DC considéré : RIG-1 pour les DC conventionnelles et les TLR pour les DC plasmacytoïdes (Kato *et al.* 2005).

Microbial Components	Species	TLR Usage
<b>Bacteria</b>		
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4
Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11
<b>Fungus</b>		
Zyosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 and TLR4
<b>Parasites</b>		
tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
<b>Viruses</b>		
DNA	Viruses	TLR9
dsRNA	Viruses	TLR3
ssRNA	RNA viruses	TLR7 and TLR8
Envelope proteins	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinin protein	Measles virus	TLR2
ND	HCMV, HSV1	TLR2
<b>Host</b>		
Heat-shock protein 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

ND = not determined. See text for references.

Table 2: **Reconnaissance des pathogènes par les différents TLR** (Akira *et al.* 2006)

L'expression des TLR peut varier au cours de la maturation. Ainsi le LPS et le polyIC induisent une augmentation d'expression du TLR2, sur les cellules de la lignée monocytes-macrophages et les DC de souris (Flo *et al.* 2001; Nilsen *et al.* 2004), alors que le TLR4, entre autres, aurait tendance à diminuer d'expression pendant la maturation.

Bien qu'associée à la maturation des DC et, de ce fait, à une diminution de leurs capacités phagocytaires, la stimulation des TLR joue néanmoins un rôle dans la capture des antigènes en induisant, de manière très rapide, une mobilisation des filaments d'actine (West *et al.* 2004).

La reconnaissance des ligands par les TLR conduit à l'activation des facteurs de transcription NF-KB ou IRF (IFN Regulatory Factor). Deux voies de signalisation peuvent être distinguées. Une première fait intervenir la molécule MyD88 (Figure 2), qui peut se fixer au domaine intracellulaire de tous les TLR excepté le TLR3. Elle aboutit à la production de cytokines de type inflammatoire comme le TNF $\alpha$ , l'IL-2 ou l'IL-6 après fixation de ligands sur les TLR 2 ou 4, et d'IFN de type I après reconnaissance de ligands par les TLR 7 et 9 (Akira *et al.*, 2006). La deuxième voie est indépendante de MyD88. Elle est impliquée dans la signalisation du TLR3 mais aussi dans celle du TLR4 et se traduit par la sécrétion d'IFN de type I. D'autres adaptateurs comme TIRAP, TRAM ou SARM ont été identifiés mais semblent secondaires, ou plutôt associés à TRIF ou MyD88.

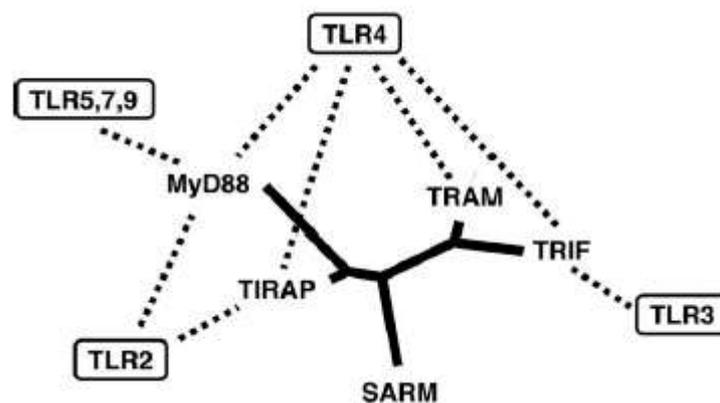


Figure 2 : Les TLR et leurs adaptateurs (Kaisho and Akira 2004)

L'activation des TLR induit préférentiellement des réponses de type Th1 mais elles n'ont pas toutes la même équivalence en terme de production d'IL-12 (Figure 3). Ainsi, le TLR2, qui forme souvent des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6, favorise plutôt des réponses Th2 par induction de peu d'IL-12 et de grandes quantités d'IL-10 alors que TLR3 ou 4 induisent de fortes productions d'IL-12p70 (Pulendran B. *et al.*, 2006).

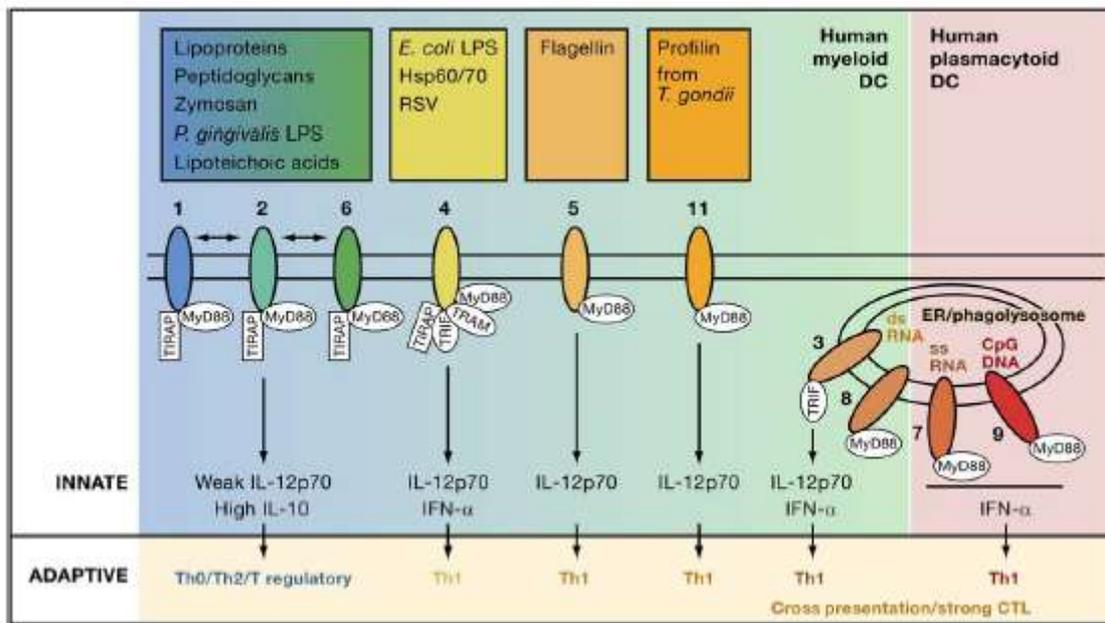


Figure 3 : **Influence des TLR sur l'orientation de la réponse adaptative** (Pulendran B. and Ahmed R., 2006)

Il existe une coopération entre les TLR. Partant du fait qu'un même pathogène peut exprimer différents PAMP, il pourra être reconnu par plusieurs TLR dont l'activation synergique aura un effet amplificateur sur la sécrétion de cytokines et l'expression de certaines molécules. C'est le cas par exemple des TLR3 et 4 qui peuvent coopérer avec les TLR 7/8 et 9 pour augmenter la sécrétion d'IL-12 et d'IL-23 ainsi que le ratio de Notch-ligands Delta-4/Jagged-1, favorisant l'induction de réponses de type Th1 (Napolitani *et al.* 2005).

Un autre groupe de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des pathogènes est représenté par les **NLR** (NOD-like receptor). Ceux-ci sont spécialisés dans la reconnaissance cytoplasmique de motifs bactériens ou de molécules de danger endogènes. Nod-1 et Nod-2, qui reconnaissent spécifiquement des murapeptides (dérivés des peptidoglycans bactériens) (Girardin *et al.* 2003). Ils activent NF $\kappa$ B alors que d'autres NLR comme les NALP activent la caspase-1, aboutissant ainsi aux formes actives de l'IL-1beta et l'IL-18.

De même que les TLR et les RLR coopèrent pour produire les protéines anti-virales, il existe une coopération importante entre les TLR et les NLR (figure 4). En effet, les TLR, comme Nod1 et Nod2, induisent la production des pro-IL-1beta et pro-IL-18. Ces « pro-cytokines » nécessitent l'intervention de la caspase-1 pour devenir actives. La caspase-1 est activée après

formation de l'inflammasome, multicomplexe protéique qui inclut entre autres les NALP. Les TLR jouent un rôle dans l'expression des molécules de l'inflammasome alors que les NALP permettent son assemblage.

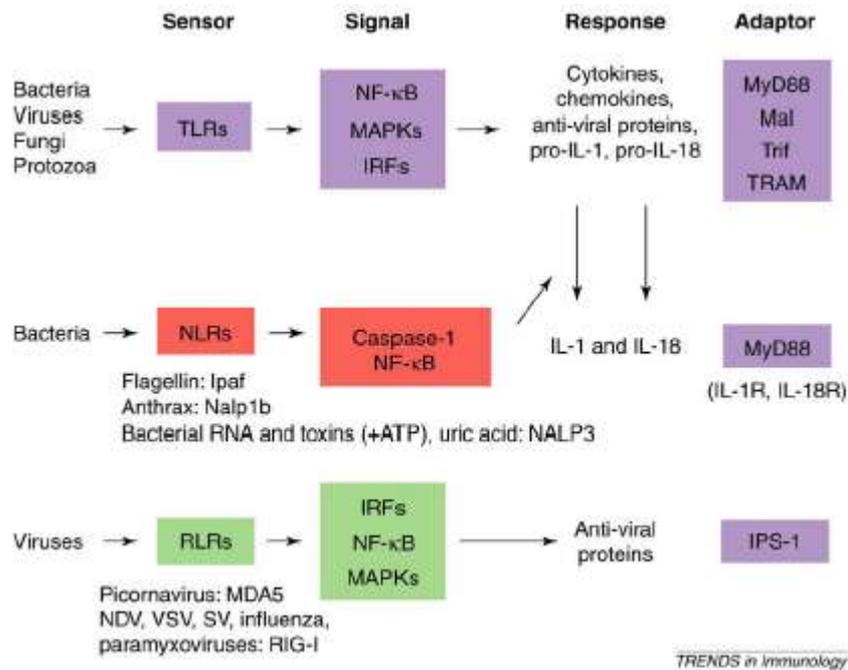


Figure 4 : Les différents types de PRR et leur signalisation (Creagh and O'Neill 2006)

Il a aussi été décrit une synergie entre les Nod-ligands et les TLR-ligands : les murapeptides amplifient les effets du LPS en augmentant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et en favorisant la maturation des DC (Fritz *et al.* 2005). Ils ont aussi un effet positif sur la sécrétion d'IL-12p70, orientant les réponses lymphocytaires T vers le type Th1 (Tada *et al.* 2005).

### 1.3.b) Récepteurs d'endocytose

Comme expliqué précédemment, les DC reconnaissent les pathogènes par divers récepteurs. Certains, comme les TLR, sont purement signalétiques et permettent l'activation du programme de maturation, mais d'autres permettent la phagocytose des antigènes. Parmi ces derniers, se trouvent les CLR (C-type lectin receptor), d'autres « scavenger receptors » et les récepteurs aux fragments Fc des anticorps et au complément.

Le terme **CLR** regroupe un ensemble de récepteurs capables de reconnaître des motifs glycosylés des antigènes, qu'ils soient du « soi » ou exogènes. Ils permettent l'internalisation de ces antigènes pour qu'ils soient dégradés dans les lysosomes puis présentés à la surface des CPA. Les CLR, en reconnaissant les protéines du soi, participent ainsi au contrôle homéostatique du système immunitaire en supprimant les réactions auto-immunes. La reconnaissance de ces mêmes auto-antigènes dans une situation de stress, ou la reconnaissance de motifs pathogènes, conduit à l'activation de réponses immunes. Le rôle des TLR étant de détecter une situation de danger, il existe une réelle coopération entre TLR et CLR qui orientera ces réponses immunitaires.

On peut subdiviser les CLR en quatre groupes (Table 3):

- les récepteurs transmembranaires de type I de la famille des « macrophage mannose receptor » (MMR).
- les récepteurs de type II comme DC-SIGN ou la Langerine (lectine exclusivement exprimée par les cellules de Langerhans, qui participe à la formation de leurs organites spécifiques, les granules de Birbeck (Valladeau *et al.* 2000)).
- les collectines, récepteurs solubles que l'on retrouve à la lumière des cellules épithéliales pulmonaires (SP-A, SP-D) ou dans le plasma (MBP). Après fixation de leur ligand, elles ciblent leurs récepteurs cellulaires spécifiques et permettent ainsi d'augmenter la phagocytose des antigènes (Kawasaki *et al.* 1983).
- les récepteurs de la famille des « NK receptors ».

Group and molecular structure <sup>(a)</sup>	C-type lectin	Pathogen	Ligand specificity
 MMR family	MMR	HIV, <i>Pneumocystis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>C. albicans</i>	Mannose, fucose, sLe <sup>x(b)</sup>
	DEC-205	Unknown	Unknown
	Endo-180	Unknown	Collagen, mannose, fucose, GlcNAc
 Collectins	MBL	HIV, IAV, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	GlcNAc, ManNAc, fucose, glucose
	SP-A	IAV, RSV, HSV-1, <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>A. fumigatus</i>	ManNAc, fucose, glucose, GlcNAc
	SP-D	IAV, RSV, <i>M. tuberculosis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i>	Maltose, mannose, glucose, lactose, galactose, GlcNAc
 Type II receptors	DC-SIGN	HIV, HCV, CMV, Dengue, <i>H. pylori</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. mansoni</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Leishmania</i>	Mannan, Le <sup>x</sup> , Le <sup>a</sup> , Le <sup>y</sup> , Le <sup>b</sup> , SLe <sup>a</sup> , ManLAM
	L-SIGN	HIV, HCV, <i>S. mansoni</i>	Mannan, Le <sup>a</sup> , Le <sup>y</sup> , Le <sup>b</sup>
	DCIR	Unknown	Unknown
	Langerin	Unknown	Unknown
	DCAL-1	Unknown	Unknown
	BDCA-2	Unknown	Unknown
 NK receptors	β-GR (Dectin-1)	<i>Pneumocystis</i> , <i>C. albicans</i>	β-Glucan
	CLEC-1	Unknown	Unknown
	CLEC-2	Unknown	Unknown

Table 3 : Récepteurs de la famille des lectines de type C (Cambi *et al.* 2005)

La particularité structurale des CLR est de posséder au moins un « carbohydrate recognition domain » (CRD) à même de reconnaître des sucres particuliers sur les antigènes, et ceci de manière calcium dépendante. Les récepteurs de type II possèdent un CRD, ceux de type I en possèdent plusieurs. Les CLR reconnaissent en majorité des résidus mannose, fucose et galactose mais également les antigènes de groupe sanguin Lewis (Appelmelk *et al.* 2003). La spécificité des CLR vient de l'agencement de ces résidus sur les protéines et de la multimérisation des récepteurs (Mitchell *et al.* 2001).

La plupart des CLR interviennent dans l'endocytose des antigènes et possèdent de ce fait un motif spécifique d'internalisation : un motif di-leucine, un complexe tri-acide ou un motif tyrosine qui cible les vésicules à clathrine (Figure 5).

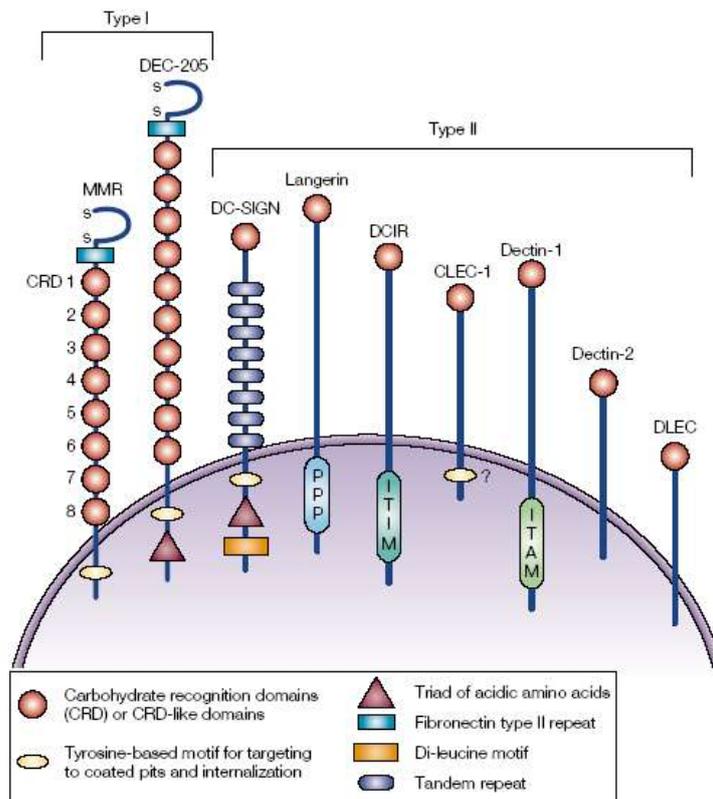


Figure 5 : **Deux grandes familles de récepteurs type lectines C : à un ou plusieurs CRD** (Hartgers *et al.* 2000)

Il est à noter que certains pathogènes utilisent les CLR pour échapper au système immunitaire et assurer leur survie en induisant la phagocytose et la présentation de leurs protéines dans un contexte de tolérance. Il a également été montré que certains de ces récepteurs étaient des voies d'entrée pour des virus, l'exemple le plus connu étant le HIV qui cible DC-

SIGN et infecte les DC dans le but d'être transporté jusqu'aux ganglions lymphatiques où il pourra être transmis aux cellules T (Geijtenbeek *et al.* 2000b).

Les lectines sont aussi des immunorécepteurs et permettent la transmission de signaux, soit activateurs, soit inhibiteurs, à la manière des récepteurs NK. Parmi les lectines de type C (ou « lectin-like »), on trouve deux grandes familles de récepteurs: la famille de Dectin-1 (CLEC-1, -2, MICL, LOX-1) et la famille de DCIR (DCAR, BDCA-2, Dectin-2, MCL, Mincle), qui se différencient par leur position génique, néanmoins toutes deux proches des gènes codant pour les récepteurs NK (chromosome 12). Ce sont tous des récepteurs de type II possédant un CRD mais qui diffèrent par leur mode de signalisation. DCIR, récepteur inhibiteur, possède un domaine ITIM dans sa partie cytoplasmique (Bates *et al.* 1999). Dectin-1 possède lui un ITAM alors que DCAR (chez la souris) forme un complexe avec l'adaptateur activateur FcRgamma (Kanazawa *et al.* 2003).

LOX-1 est un récepteur « lectin-like » mais est aussi classé dans les **récepteurs « scavenger »** (récepteurs « d'épuration »). Comme les autres récepteurs scavenger (SR), sa fonction première est de lier et phagocyter des structures polyanioniques. Ils participent ainsi à l'homéostasie lipidique.

Son rôle a cependant été étendu et il a été impliqué dans l'immunité innée. Il est capable de lier des cellules apoptotiques ou âgées, de détecter des composants bactériens (il coopère avec TLR2) et est impliqué dans la reconnaissance d'antigènes complexés par les HSP (Heat Shock Protein), ce qui favorise leur présentation croisée aux lymphocytes CD8 (Delneste *et al.* 2002).

Une voie relativement importante de l'immunité innée est la voie humorale, représentée par les **anticorps** et les molécules du **complément** qui peuvent opsoniser les antigènes en complexes immuns (Figure 6). Ces complexes ciblent des récepteurs spécifiques des DC, dont les principaux sont CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) et les récepteurs des fragments Fc gamma (entre autres), ce qui facilite la phagocytose des antigènes. Le récepteur principal au C1q, formé de la calréticuline et du CD91, permet la phagocytose de cellules apoptotiques (Ogden *et al.* 2001).

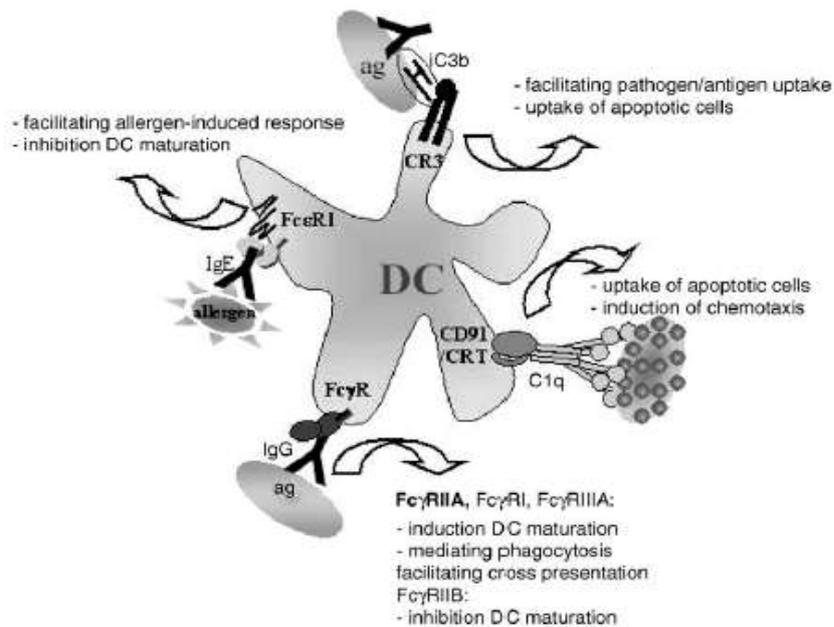


Figure 6 : Récepteurs au complément et aux fragments Fc des anticorps (Bajtay et al. 2006)

### 1.3.c) Récepteurs de danger

La notion de signal de danger détecté par le système immunitaire fut émise en 1994, avec pour postulat que ce dernier était capable de détecter outre des molécules étrangères, tous dommages tissulaires ou cellulaires (Matzinger 1994). Toute substance libérée par une cellule en état de stress ou en train de mourir est susceptible de moduler le profil des APC. Ces molécules sont nombreuses et variées et peuvent induire la maturation des DC. On peut citer la bradykinine, libérée par le tissu lésé et connue pour son rôle vasodilatateur, son effet sur la perméabilité vasculaire et son rôle dans les sensations de douleur. Elle agit sur des récepteurs spécifiques (B2R entre autres) et incite les DC à produire de l'IL-12, orientant ainsi les réponses vers le type 1 (Aliberti *et al.* 2003). L'acide urique, également libéré lors de lésions cellulaires, peut induire la maturation des DC et la « cross-présentation » d'antigènes aux lymphocytes CD8 (Shi *et al.* 2003).

Les cellules soumises à un stress métabolique sécrètent des réactifs oxygénés qui peuvent activer les DC (Rutault *et al.* 1999). Des molécules constitutives modifiées par le stress peuvent aussi agir sur les DC. C'est le cas des produits de dégradation de l'héparane sulfate (composant de la matrice extracellulaire) qui ciblent les TLR (Kodaira *et al.* 2000) ou des fragments de hyaluronane qui fixent le CD44 et activent les DC (Termeer *et al.* 2000).

Certaines molécules endogènes, comme l'ATP ou l'UTP, normalement cytosoliques, peuvent être libérées dans des conditions de stress, d'hypoxie ou d'inflammation et activer les DC via les récepteurs purinergiques (P2Z/P2X7), en conjonction avec le TNF $\alpha$  (Schnurr *et al.* 2000).

Le VIP (vasoactive intestinal peptide), un neuromédiateur qui peut être libéré en cas de dommage tissulaire, peut aussi activer les DC (Delneste *et al.* 1999).

Les Hsp (molécules de choc thermique) sont normalement intracellulaires et servent de chaperonnes pour les protéines mais sont libérées en cas de lésion membranaire (sous forme de complexes Hsp-peptides) (Basu *et al.* 2000). Elles peuvent aussi être transloquées à la membrane cellulaire sous un stress infectieux (Belles *et al.* 1999). Elles représentent un puissant signal de danger pour les DC via notamment LOX-1 qui est sans doute le principal récepteur de ces complexes. CD40 serait capable de lier les Hsp70 bactériennes (Wang *et al.* 2001), ainsi que des complexes Hsp-peptides et de les internaliser (Becker *et al.* 2002). Les TLR2 et 4 ont été impliqués dans la reconnaissance des Hsp et la transmission de signaux pour la synthèse de cytokines inflammatoires (Asea *et al.* 2002). Hsp70 pourrait aussi être reconnue par le CCR5 (Floto *et al.* 2006).

Les DC sont également sensibles à des signaux de danger inductibles. C'est le cas de différentes cytokines produites précocement à la suite d'une infection, et qui peuvent agir de manière autocrine ou paracrine. Le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  peuvent être produits par les tissus lésés ou par les DC matures, et sont considérés comme des signaux de danger primaires et de « feedback » positif. Les IFN de type I, produits en grande quantité lors d'une infection virale, peuvent activer les DC au repos ou agir en synergie avec le TNF $\alpha$  pour augmenter leur propre maturation (Luft *et al.* 1998).

Les DC sont également sensibles aux signaux de danger fournis par d'autres cellules immunitaires. C'est le cas pour l'IFN $\gamma$ , produit par les macrophages activés, les cellules NK ou encore les lymphocytes T activés. Les DC expriment le récepteur à l'IFN $\gamma$ , constitué de deux chaînes. La chaîne alpha est continuellement recyclée et est impliquée dans la signalisation du récepteur. La chaîne bêta est constitutivement exprimée par les DC mais a tendance à diminuer pendant la maturation (Kalinski *et al.* 1999). Ceci leur confère une sensibilité plus accrue à l'IFN $\gamma$  dans leurs états précoces de maturation. On peut également citer le CD40L (ou CD154), exprimé par les cellules T activées et qui peut avoir un rôle essentiel en tant que signal secondaire de maturation, via son récepteur CD40, dans les ganglions lymphatiques. Il peut

également être exprimé par les plaquettes, activées lors d'une blessure, et est de ce fait un initiateur précoce de la maturation des DC (Martinson *et al.* 2004).

### *1.3.d) Molécules de présentation antigénique*

Les DC sont capables de présenter des peptides antigéniques associés aux molécules du CMH de classe I ou II et également des motifs lipidiques sur les molécules CD1. Ces voies de présentation sont détaillées au chapitre I.4.c. Ceci leur confère une aptitude à activer un ensemble de populations lymphocytaires : de type NKT et également de type CD4 ou CD8 via leur TCR. Par les récepteurs au complément et aux immunoglobulines, elles peuvent « présenter » des antigènes opsonisés aux lymphocytes B.

### *1.3.e) Molécules de costimulation*

Outre la stimulation du TCR par les complexes CMH-peptides, les lymphocytes T nécessitent l'intervention d'autres signaux pour une activation orientée. Ces signaux, les molécules de costimulation, jouent un rôle essentiel puisqu'ils régulent les réponses immunes en induisant tolérance ou immunité. Cette régulation fait intervenir un ensemble complexe de récepteurs et ligands, dont l'expression sur les lymphocytes T et DC varie en fonction du contexte (Hochweller and Anderton 2005). On distingue plusieurs familles de molécules de costimulation (Figure 7):

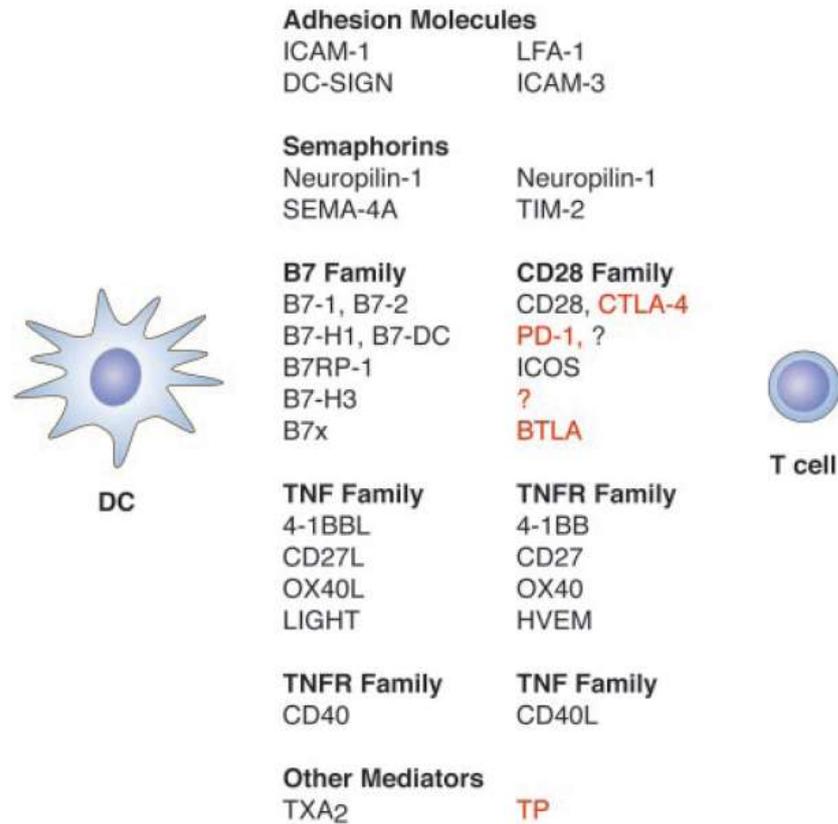


Figure 7: **Interaction DC-LT et molécules de costimulation** (O'Neill *et al.* 2004)

### α) Famille B7

#### CD80/CD86 – CD28/CTLA-4

Parmi ces molécules, CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) (Table 4 et 5) sont sans doute les plus importantes. Ces deux ligands du CD28, exprimés par les DC, amplifient de manière très forte les signaux issus de l'activation du TCR. Mais leur cinétique d'expression diffère : CD86 est exprimé constitutivement et son expression augmente rapidement lors de la maturation, alors que celle du CD80 est plus tardive. Ils ne sont pas non plus équivalents dans la différenciation des lymphocytes T CD4, CD86 étant plutôt associé aux réponses Th2 (Chen *et al.* 2006).

Au niveau de la synapse immunologique (cf § I.5.a.α), la costimulation du CD28 par CD80 et CD86 induit une prolifération et une meilleure survie des lymphocytes T avec production d'IL-2. Elle induit également une augmentation de l'expression d'autres molécules membranaires, dont CD40L et ICOS.

Il existe un homologue de CD28, CTLA4, dont les effets, après fixation des mêmes ligands CD80 et CD86, sont opposés. C'est une molécule intracellulaire (endosomale) qui devient membranaire après activation des lymphocytes T (Lindsten *et al.* 1993). La majorité des CTLA-4 intracellulaires se polarisent au site d'engagement du TCR (T Cell Receptor) (Linsley *et al.* 1996) et sont ensuite transloqués à la membrane au niveau de la synapse immunologique. Sa relocalisation est contrôlée par l'intensité du stimulus TCR (Egen and Allison 2002), et apparaît comme un moyen de régulation de l'activation T. Il augmente la mobilité des cellules T, réduisant ainsi la durée d'existence de la synapse DC- lymphocytes T, et diminue la production de cytokines et la prolifération (Schneider *et al.* 2006).

La forme membranaire du CTLA-4 exprimé par les lymphocytes T régulateurs, ainsi que la forme soluble peuvent également transmettre des signaux aux DC via CD80/CD86 en induisant de fortes sécrétions d'IFN $\gamma$ , qui par une boucle autocrine-paracrine, stimule l'expression d'indoleamine dioxygénase (IDO) par les DC (Grohmann *et al.* 2002). IDO étant impliqué dans les phénomènes de tolérance, ceci apparaît comme un autre moyen de contrôle de la réponse immune.

### ICOS – ICOS-L

ICOS-L est un membre de la famille B7 et ICOS un autre homologue de CD28. A la différence de celui-ci, ICOS n'est pas constitutif et est exprimé après activation du TCR et stimulation de CD28. Il apporte des signaux positifs secondaires pour l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T, mais n'induit pas de production d'IL-2.

Ligands de la famille B7	Synonymes
<b>B7-1</b>	<b>CD80</b>
<b>B7-2</b>	<b>CD86</b>
<b>B7-H1</b>	<b>PD-L1 ; CD274</b>
<b>B7-H2</b>	<b>ICOS-L ; B7h ; B7RP-1; LICOS; CD275</b>
<b>B7-H3</b>	CD276
<b>B7-H4</b>	B7x ; B7-S1
<b>B7-DC</b>	<b>PD-L2 ; CD273</b>

Table 4: **Famille B7**

## **PD1 - PDL1/2**

PD-1 est un autre membre de la famille B7 et de la superfamille des Immunoglobulines, mais à la différence de CD28, il est monomérique. Il possède, dans sa partie cytoplasmique, un motif ITIM qui lui donne des propriétés immuno-inhibitrices. PD-1, comme CTLA-4, nécessite une co-localisation avec le TCR et CD28 pour induire son inhibition.

Du fait de sa répartition très large sur les populations immunes (lymphocytes T, lymphocytes B, monocytes), ainsi que celle de ses ligands, il offre de nombreuses possibilités d'interactions bidirectionnelles. Ainsi il peut réguler les réponses immunes à différents niveaux, d'autant plus que PD-L1 est exprimé par des tissus non lymphoïdes (cellules endothéliales, pulmonaires, placentaires...) (Ishida *et al.* 2002; Petroff *et al.* 2003). Les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ l'expriment aussi et il semble jouer un rôle dans leurs propriétés régulatrices (Kitazawa *et al.* 2007).

Les deux ligands ne sont pas équivalents en terme de liaison à PD-1 puisque PD-L2 possède une affinité deux à six fois plus importante que PD-L1 (Zhang *et al.* 2004), mais son expression est restreinte aux macrophages et DC après activation. Ils semblent aussi impliqués dans des réponses T CD4 différentes puisque l'IFN $\gamma$  induit l'expression de PD-L1 sur les macrophages alors que l'IL-4 induit celle de PD-L2 (Loke and Allison 2003).

La voie de PD-1 pourrait être impliquée dans la régulation des infections virales chroniques (Barber *et al.* 2006). Elle apparaît également comme un moyen d'échappement des cellules tumorales (PD-L1+) au système immunitaire et représente une approche thérapeutique prometteuse (Iwai *et al.* 2002; He *et al.* 2005).

## **B7-H3**

B7-H3, un autre membre de la famille B7, est exprimé par les DC humaines immatures et matures. Il peut être induit sur les DC de souris par l'IFN $\gamma$  mais pas par l'IL-4. Son rôle peut être activateur ou inhibiteur sur les populations lymphocytaires mais son récepteur n'est pas encore identifié (Chapoval *et al.* 2001; Suh *et al.* 2003).

## B7-H4

B7-H4 (ou B7x ou B7S1) a une fonction inhibitrice de l'activation lymphocytaire (Sica *et al.* 2003). Bien qu'il ait d'abord été décrit comme étant le ligand de BTLA, son récepteur reste encore inconnu. BTLA a la même fonction inhibitrice que CTLA-4 ou PD-1 et bien que constitutif, il est aussi induit après activation des lymphocytes T (Watanabe *et al.* 2003). Il est exprimé préférentiellement par les lymphocytes CD4 Th1 mais est aussi retrouvé sur les lymphocytes B, laissant entrevoir un contrôle de ces deux types cellulaires. Son seul ligand connu à l'heure actuelle est HVEM. B7-H4 est aussi exprimé par les cellules tumorales, comme PD-L1.

D'autres membres de la famille B7 ont été identifiés (BT3) mais dont les fonctions et les récepteurs restent encore inconnus (Compte *et al.* 2004).

T cell <sup>a,b</sup>				Antigen-presenting cells						Superfamily
Expression	Signal	Receptor	Ligand	Professional			Non-professional			
				DC	B	Mφ	Endothelial cells	Epithelial cells	Other <sup>c</sup>	
Constitutive	Positive	CD28	B7-1 (CD80)	+	+	+	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	CD28/B7
		CD28	B7-2 (CD86)	+	+	+	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	CD28/B7
		CD27	CD70	+	+	+	(-)	+	+	TNF/TNFR
		HVEM	LIGHT	+	+	+	(-)	+	+	TNF/TNFR
Inducible	Positive	ICOS	ICOS-L	+	+	+	+	+	+	CD28/B7
		CD30	CD30L (CD153)	(-)	+	+	(-)	+	+	TNF/TNFR
		OX40 (CD134)	OX40L	+	+	+	+	-	+	TNF/TNFR
		4-1BB (CD137)	4-1BBL	+	+	+	(-)	(-)	+	TNF/TNFR
		SLAM (CD150) <sup>e</sup>	SLAM (CD150)	+	+	+	-	-	-	Ig
	Negative	CTLA-4 (CD152)	B7-1 (CD80)	+	+	+	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	CD28/B7
		CTLA-4 (CD152)	B7-2 (CD86)	+	+	+	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	CD28/B7
		PD-1	PD-L1	+	+	+	+	+	+	CD28/B7
		PD-1	PD-L2	+	-	+	+	+	(-)	CD28/B7
		Unknown <sup>f</sup>	B7-H3	+	(+)	+	-	+	+	CD28/B7
	BTLA	B7-H4 (BTLA-L)	(-)	+	+	(-) <sup>g</sup>	(-) <sup>g</sup>	(-) <sup>g</sup>	CD28/B7	

Table 5: **Molécules de costimulation des lymphocytes T - récepteurs et ligands** (Kroczek *et al.* 2004)

## β) Famille de TNF/TNFR

La famille du TNF (Table 6) est un autre groupe de molécules costimulatrices jouant un rôle très important dans la modulation des réponses immunes. Leur expression est régulée après activation du TCR et stimulation du CD28, les impliquant dans le contrôle de la longévité de l'activation des lymphocytes T (Hochweller and Anderton 2005).

TNFRSF	(récepteurs)	TNFSF	(ligands)
1	<b>TNFalphaR</b>	4	OX40L = CD134L = GP34
2	TNFbetaR	5	CD40L (CD154)
5	<b>CD40</b>	6	FasL (CD178 = CD95L)
6	FAS = CD95 = APO1	7	<b>CD70</b> = CD27L
6B	DcR3 (TR6)	8	CD30L = CD153
7	CD27 =(Tcell activation antigen)	9	<b>4.1 BBL</b>
9	CD137 = 4.1BB	10	TRAIL = APO2L
10A	TRAILR1 = DR4	11	OPGL = RANKL = TRANCE
10B	TRAILR2 = DR5	12	TWEAK (weak inducer of apoptosis)
10C	TRAILR3 = DcR1 (decoy receptor)	13	<b>APRIL</b> = TALL2
10D	TRAILR4 = DcR2	13B	<b>Blys</b> = <b>BAFF</b> = TALL1 = THANK
11A	<b>RANK</b> (récepteur activateur de NFkB)	14	LIGHT = HVEML
11B	OPG	15	TL1 = VEGI
13B	TACI (transmembranaire activateur)	18	GITRL = AITRL
13C	BAFFR		
14	HVEM (herpes virus entry mediator)		
16	NGFR (nerve growth factor)		
17	BCMA (B cell maturation factor)		
18	GITR		
19	TROY = TAJ		
21	DR6		
25	APO3 = DR3 (death receptor)		

Table 6: Famille du TNF – récepteurs et ligands

### CD70 – CD27

CD70 a beaucoup d'homologies avec les TNF et est exprimé par les DC et les lymphocytes activés. Son récepteur, le **CD27**, est retrouvé sur les populations lymphocytaires T, B, NK et est nécessaire pour l'expansion des lymphocytes T CD4 et CD8 en situation d'infection (Hendriks *et al.* 2000). La stimulation du CD27, sur des lymphocytes T CD8 activés par le TCR, les conduit à l'expansion et la survie grâce à l'expression du récepteur à l'IL-7 (chaîne alpha). Par contre, CD27 n'intervient pas dans les fonctions effectrices (fonction cytolytique et production d'IFN $\gamma$ ) (Carr *et al.* 2006). CD27, qui a tendance à augmenter après activation,

diminue progressivement avec l'acquisition des fonctions effectrices par les lymphocytes T (Hamann *et al.* 1999). Les CD8 mémoires, par contre, l'expriment fortement. CD70 partage un mode d'expression commun aux CMH II. Il est stocké dans les compartiments MIIC (MHC II compartment) et après interaction des DC avec les lymphocytes T, il est exporté à la membrane au niveau de la synapse immunologique (Keller *et al.* 2007).

#### **OX40 – OX40L**

OX40, d'abord identifié chez le rat, puis chez la souris et l'homme, est préférentiellement exprimé par les lymphocytes T CD4 (Taraban *et al.* 2002), et plus fortement sur les Th2. OX40L peut être exprimé par les DC, après activation par le CD40L notamment (Fillatreau and Gray 2003). Ce duo moléculaire semble amplifier l'activation des lymphocytes T et leur production de cytokines. A la manière de CD27, il apparaît plus impliqué dans la survie des lymphocytes T que dans leur division (Rogers *et al.* 2001).

#### **4-1BB – 4-1BBL**

4-1BB (CD137) est exprimé par les lymphocytes T après activation, qu'ils soient CD4+ ou CD8+, et Th1 ou Th2. Son expression coïncide avec celle de CD69, marqueur précoce d'activation lymphocytaire (Dawicki and Watts 2004). Son engagement sur les DC induit la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 (Wilcox *et al.* 2002). L'engagement de 4-1BB sur les lymphocytes T amplifie leurs fonctions effectrices (Wen *et al.* 2002), en modulant les effets de CD28 et en favorisant les réponses Th1 (Kim *et al.* 1998). Sur les lymphocytes T CD8, il a pour effet d'augmenter l'expression des molécules effectrices (perforine, granzyme A, cytokines) (Bukczynski *et al.* 2004) et pourrait jouer un rôle dans la différenciation des lymphocytes mémoires (Wiethe *et al.* 2003). 4-1BBL, dont l'implication dans les réponses antivirales a été démontrée chez la souris (Tan *et al.* 1999), induit aussi une augmentation d'expression de molécules anti-apoptotiques (Bcl-X<sub>L</sub>) favorisant la survie des CD8.

#### **HVEM – LIGHT**

HVEM est exprimé par les cellules T au repos, les monocytes et les DC immatures, et a tendance à diminuer après activation (Morel *et al.* 2000). LIGHT est retrouvé sur les lymphocytes T CD4 et CD8 après activation, les monocytes, les cellules NK et les DC immatures. Cette expression réciproque et transitoire sur les lymphocytes T et DC indique une fenêtre courte de signalisation, dans les heures qui suivent le contact cellulaire. Cet échange de signaux induit d'une part une prolifération des cellules T avec production de cytokines (Tamada

*et al.* 2000), et d'autre part une maturation des DC (Morel *et al.* 2003). Une déficience en LIGHT altère les réponses allogéniques, préférentiellement celle des lymphocytes T CD8 (Liu *et al.* 2003). L'effet d'HVEM est indépendant de CD28 et, à la manière de 4-1BB, est important en cas de déficience d'autres molécules de costimulation (Scheu *et al.* 2002).

### **GITR – GITRL**

GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) est exprimé sur les lymphocytes CD4, Th1 ou Th2 et les lymphocytes CD8 après activation, et constitutivement sur les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+. GITRL, présent sur les CPA, a un effet costimulant sur les lymphocytes T activés par le TCR (et CD28) en induisant leur prolifération et la synthèse de cytokines (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10). Il régule également l'activité des lymphocytes T régulateurs puisqu'il permet de lever leur inhibition sur les autres populations de lymphocytes T CD25- (Shimizu *et al.* 2002), du moins chez la souris car chez l'homme, cette propriété ne semble pas exister (Tuyaerts *et al.* 2007). GITRL a été identifié chez les DC (Yu *et al.* 2003a) et semble jouer un rôle dans l'activation des cellules NK (Hanabuchi *et al.* 2006).

Les DC n'expriment pas seulement des ligands impliqués dans la costimulation des lymphocytes mais également des récepteurs leur permettant de répondre à des signaux délivrés par les lymphocytes T helper. C'est le cas de HVEM ou 4-1BB, mais aussi du CD40 et de RANK.

### **CD40 – CD40L**

En dehors du fait que cette interaction moléculaire est d'une grande importance pour l'activation des lymphocytes B, CD40 est le récepteur de costimulation des DC le plus caractéristique et le plus décrit. Sa stimulation, par son ligand CD40L (CD154) ou un anticorps agoniste, est impliqué dans la maturation des DC en induisant une augmentation des molécules de costimulation CD80 et CD86 (Caux *et al.* 1994). L'interaction CD40-CD40L est aussi essentielle pour la sécrétion d'IL-12 (Cella *et al.* 1996; Koch *et al.* 1996). En son absence, la maturation des DC est altérée, induisant une faible sécrétion d'IL-12, ce qui empêche la génération d'immunité anti-tumorale (Mackey *et al.* 1998). La signalisation via CD40 est aussi impliquée dans la présentation antigénique (Machy *et al.* 2002; Delamarre *et al.* 2003).

L'interaction CD40-CD40L, en apportant l'aide nécessaire aux DC, est d'une importance capitale pour la génération de lymphocytes T cytotoxiques (Bennett *et al.* 1998; Schoenberger *et al.* 1998).

CD40L peut être présenté aux DC par les plaquettes activées en périphérie ou par les lymphocytes T helper après activation (par le CD28), ou encore par les cellules NKT (Fujii *et al.* 2004).

### **TRANCE – RANK**

En plus d'être impliqué dans l'organogénèse des ganglions lymphatiques et le développement des cellules T, TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) joue un rôle dans les réponses immunes (Kong *et al.* 1999).

Il a une grande ressemblance avec CD40L et son expression est restreinte aux lymphocytes T. RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B) est exprimé par les DC à l'état mature (Anderson *et al.* 1997). Sa stimulation induit les mêmes effets que celle du CD40, soit une meilleure survie des DC et une sécrétion de cytokines inflammatoires (Josien *et al.* 2000). Elle permet également de supplanter l'effet du CD40L et permet une différenciation des lymphocytes T CD4 en lymphocytes T Th1 par la sécrétion d'IL-12 (Bachmann *et al.* 1999). TRANCE-RANK semble être la voie CD40-indépendante d'aide des lymphocytes T helper aux DC pour l'activation des lymphocytes CD8 cytotoxiques (Lu *et al.* 2000). Il existe une réelle coopération entre CD40L, TRANCE et TNF $\alpha$  pour l'induction de lymphocytes T cytotoxiques en cas d'infection virale (Yu *et al.* 2003b).

### $\gamma$ ) Autres

### **CD83**

CD83 est le marqueur caractéristique des DC matures (Zhou and Tedder 1996), il appartient à la superfamille des Immunoglobulines. A l'état de traces dans les macrophages et les monocytes (Cao *et al.* 2005), il est très faiblement exprimé sur les DC immatures et augmente fortement au cours de la maturation, en synergie avec les molécules de costimulation. Il est peu présent sur les lymphocytes B et les lymphocytes T, mais augmente après activation (Cramer *et al.* 2000) et est impliqué dans la longévité de ces deux types cellulaires (Prazma *et al.* 2007).

Sa fonction a longtemps été mal connue et ses ligands restent encore indéterminés mais il semble qu'il joue un rôle important dans la régulation des réponses immunes, notamment dans la

génération des thymocytes et des lymphocytes T CD4 chez la souris (Fujimoto *et al.* 2002). Il joue également un rôle clé dans la fonction des cellules B puisqu'il régule l'expression du CMH II et du CD86 (Kuwano *et al.* 2007). Sa fonction, au niveau des DC, dépend de son mode d'expression. La forme membranaire participe à l'activation des cellules T, sa diminution (par l'utilisation d'ARN interférence) compromet fortement cette fonction (Aerts-Toegaert *et al.* 2007; Prechtel *et al.* 2007). La forme soluble, quant à elle, a des propriétés immuno-inhibitrices (Lechmann *et al.* 2001) et peut empêcher la prolifération des lymphocytes T (Dudziak *et al.* 2005).

Enfin, un ensemble de molécules a été décrit comme impliqué dans la régulation de la fonction activatrice des DC (Woodhead *et al.* 2000). C'est le cas de CD13 (aminopeptidase N), CD147 (neurothéline), CD98 (qui interagit avec les intégrines  $\beta 1$ ), CD87 (urokinase plasminogen activator receptor), CD148 (tyrosine phosphatase)...

### *1.3.f) Molécules solubles : cytokines et chimiokines*

Les DC produisent après activation une grande variété de chimiokines (Table 7) et cytokines. Les chimiokines assurent la répartition au sein des tissus des différents acteurs cellulaires de l'immunité et permettent leur guidage vers leur site spécifique d'action. Les cytokines ont une importance capitale dans le système immunitaire car elles permettent une communication entre les types cellulaires, assurant ainsi l'homéostasie des tissus, le contrôle de la prolifération et de la survie, ainsi que la différenciation cellulaire. Elles permettent de lier le système inné au système adaptatif.

#### $\alpha$ ) Les Chimiokines

Les chimiokines sont un groupe de petites molécules (8 à 14 kDa), impliquées dans la régulation des trafics cellulaires (leucocytes), le développement, l'homéostasie et la fonction du système immunitaire. Elles peuvent également jouer un rôle auprès des cellules du système nerveux central et des cellules endothéliales. On peut les subdiviser en quatre groupes : les C, les CC, les CXC et les CXXC selon que leurs résidus cystéines, dans la protéine mature, sont accolés ou séparés par des acides aminés.

**MIP-1 $\alpha$**  (CCL3) et **MIP-1 $\beta$**  (CCL4), avec MCP-1 (CCL2) et RANTES (CCL5), font partie des chimiokines inflammatoires secrétées précocement par les DC qui ciblent le CCR5. Elles permettent une attraction des lymphocytes T activés (Taub *et al.* 1993a). Elles sont aussi des signaux d'attraction pour les lymphocytes T naïfs sensibilisés (par des signaux inflammatoires) qui expriment alors le CCR5 et sont d'autant plus importantes pour l'initiation d'une réponse immune vis-à-vis d'un antigène. Enfin, elles ont été décrites chez la souris comme étant fortement secrétées après interaction entre les DC et les lymphocytes T CD4 helpers dans les ganglions lymphatiques, attirant les CD8 naïfs aux sites d'interaction (Castellino *et al.* 2006). Ceci a pour conséquence l'initiation d'une réponse lymphocytaire T CD8, avec en particulier un profil de cellule pré-mémoire exprimant les chaînes  $\alpha$  des récepteurs à l'IL-6 et l'IL-7 (Castellino and Germain 2007).

De plus, CCL3 et CCL4 assurent une différenciation des lymphocytes T CD4 en sous-types Th1 ou Th2 (Luther and Cyster 2001).

Une autre chimiokine, spécifique des DC, a été impliquée dans le recrutement ganglionnaire des lymphocytes T naïfs (Adema *et al.* 1997) et des lymphocytes B (Lindhout *et al.* 2001): **DC-CK1** (CCL18). Sa sécrétion est particulière puisqu'elle aurait tendance à diminuer durant la maturation (Vulcano *et al.* 2003).

**IP-10** (CXCL10) et **Mig** (CXCL9), secrétées par les DC, ont d'abord été identifiées comme des chimiokines attractives des lymphocytes T CD4 et CD8 activés (Taub *et al.* 1993b; Loetscher *et al.* 1996). Elles sont particulièrement spécifiques des lymphocytes CD4 Th1, qui expriment le récepteur CXCR3 (Bonecchi *et al.* 1998). Il a ensuite été montré que les lymphocytes mémoires expriment également le CXCR3, ce qui les rend sensibles à IP-10 et Mig (Rivino *et al.* 2004). Les DC, en sécrétant Mig et IP-10 (et I-TAC ou CXCL11), favorisent ainsi leur interaction avec les lymphocytes Th1 et CTL déjà différenciés et mémoires. Mig induit aussi la prolifération des lymphocytes T (Whiting *et al.* 2004). Les DC expriment le CXCR3 et IP-10 joue un rôle adjuvant sur les DC pour la présentation antigénique (Krathwohl and Anderson 2006).

**MDC** (CCL22) et **TARC** (CCL17) sont deux chimiokines plus spécifiques des lymphocytes CD4 Th2 (CCR4+) mais sont secrétées, avec Mig et IP-10, plus tardivement que les chimiokines inflammatoires. Le PGE2 et l'histamine, deux molécules associées aux réponses de type Th2, induisent une augmentation de production par les DC de CCL22 et CCL17 (McIlroy *et al.* 2006). Elles induisent aussi une diminution d'IP-10 et sont donc impliquées dans la création

d'un environnement favorable aux réponses humorales, en plus de la maturation des DC vers un profil pro-Th2.

Homéostatique	CCL19 (ELC), CCL21 (SLC) CCL18 (DC-CK1)	naïf CCR7 ?
	CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) CCL9 (Mig), CCL10 (IP-10), CCL11 (I-TAC)	Th1 CCR5 CXCR3
	CCL17 (TARC), CCL22 (MDC) CCL11 (Eotaxin), CCL5 (RANTES), CCL8 (MCP-2)	Th2 CCR4 (CCR3) CXCR5 (LT helper des follicules B)
Inflammatoire	CXCL13 (BLC) CXCL12 (SDF-1)	B CCR7 CXCR5 CXCR4
		mémoire CCR7 (centraux mémoires) CXCR5 (non polarisés) CXCR3 (pré-Th1) CCR4 (pré-Th2)

Table 7: **Classification des chimiokines**

Les DC sécrètent précocement CXCL8 (ou IL-8) qui est impliquée dans le recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammation (Yoshimura *et al.* 1987)

.CXCL13 est également sécrétée par les DC myéloïdes, ce qui amplifie le recrutement des lymphocytes B dans les ganglions. Sa sécrétion a tendance à diminuer après stimulation du CD40, soit après interaction avec les lymphocytes T helpers (Vissers *et al.* 2001).

Les DC répondent aux chimiokines par l'expression de différents récepteurs qui varient au cours de la maturation : CCR1, CCR2, CCR5, CXCR1 à l'état immature, CCR7 et CXCR4 à l'état mature (Sallusto *et al.* 1998). Le CCR7 est un récepteur primordial pour les DC car il leur permet de migrer vers les tissus lymphatiques (vaisseaux et ganglions) *via* un gradient croissant des molécules CCL19 (ELC) et CCL21 (SLC) (Martin-Fontecha *et al.* 2003; Ebert *et al.* 2005) (cf § I.4.e).

## β) Les Cytokines

On peut classer les cytokines de différentes manières. Certaines sont dites pro-inflammatoires, c'est le cas de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF $\alpha$ , qui sont sécrétées très tôt lors de la réponse immune. Elles sont aussi impliquées dans le « priming » des cellules T. D'autres jouent un rôle dans leur maturation : IL-12, IL-18, IL-7. L'IL-15 et l'IL-7 sont aussi dites homéostatiques car elles jouent un rôle dans la survie des lymphocytes T.

On peut également classer les cytokines selon leur famille d'appartenance : famille de l'IL-1 (IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-18...), famille de l'IL-6 (IL-6, IL-11...), famille de l'IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27).

### **IL-1 $\alpha/\beta$**

L'IL-1, ou antérieurement LAF (lymphocyte activating factor), est un médiateur clé dans la défense de l'hôte et de l'inflammation. Son rôle a été décrit il y a presque 20 ans (Dinarello 1991). L'IL-1 $\beta$ , sécrétée précocement après activation des DC, a des actions très étendues, dont l'activation de la prolifération des lymphocytes B et T et l'induction d'IL-2.

### **IL-2**

L'IL-2, ou TCGF (T cell growth factor), joue un rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes T CD4 et CD8 ; elle induit leur prolifération. Les lymphocytes T régulateurs en sont également très dépendants et expriment fortement son récepteur, le CD25. La source principale d'IL-2 vient des lymphocytes T eux-mêmes, mais il a été décrit que les DC, en présence d'IL-15, sont capables d'en produire (Feau *et al.* 2005). L'IL-2 peut agir en synergie avec d'autres cytokines (Figure 8), comme l'IL-18 ou la famille de l'IL-12, pour augmenter son rôle activateur. Elle régule aussi l'expression de l'IL-4 par les lymphocytes T CD4, favorisant ainsi le profil Th2 (Ben-Sasson *et al.* 1990). Elle a un rôle très important dans l'activation des NK (Granucci *et al.* 2004).

### **IL-6**

L'IL-6 est une cytokine pléiotropique. Sa première fonction est de favoriser les réponses humorales en activant les lymphocytes B à se différencier et à produire des anticorps (Hirano *et al.* 1985; Jego *et al.* 2003). Elle influence ainsi la balance Th1/Th2 mais peut cependant amplifier des réponses Th1. Elle active les thymocytes et les lymphocytes T pour leur production

d'IL-2 et leur différenciation en CTL (Okada *et al.* 1988). Comme pour les lymphocytes B, elle intervient au stade terminal de la différenciation des CTL, l'IL-2 (et l'IFN $\gamma$ ) restant primordiale pour l'initiation (Maraskovsky *et al.* 1989). Elle est aussi essentielle pour la survie des CTL et la génération de lymphocytes T CD8 mémoires (Castellino and Germain 2007) et préserve les lymphocytes T de l'apoptose (Atreya *et al.* 2000).

Elle appartient à la famille de cytokines pro-inflammatoires libérées précocement après infection et agit sur les hépatocytes pour la sécrétion des protéines de phase aiguë (Gauldie *et al.* 1987).

Elle influence aussi la différenciation des DC et macrophages et favorise la maturation des DC (Bernad *et al.* 1994; Berger *et al.* 2002).

Il a été montré que des DC activés par leurs TLR étaient capables d'abolir la suppression, par les lymphocytes T régulateurs, de la prolifération des lymphocytes T CD4+CD25- et que cet effet était médié par l'IL-6 (Pasare and Medzhitov 2003). Elle peut également abolir l'effet tolérogène des DC exprimant IDO (Grohmann *et al.* 2001).

L'IL-6 est impliquée dans la différenciation de certains lymphocytes T CD4 : elle inhibe l'expression de FoxP3 induite par TGF $\beta$  qui conduit à la formation de lymphocytes T régulateurs, et favorise par contre la différenciation d'un nouveau type cellulaire, les Th17, impliqués dans certaines réponses auto-immunes et anti-pathogènes (bactéries extracellulaires) (Langrish *et al.* 2005; Bettelli *et al.* 2006).

La famille de l'IL-6 comprend aussi le LIF (leukaemia inhibitory factor), l'oncostatine M et l'IL-11..

## IL-7

L'IL-7, sécrétée par les DC, est impliquée dans l'activation des lymphocytes T CD4 naïfs et leur différenciation en Th2 (Webb *et al.* 1997). Elle joue un rôle capital dans l'homéostasie et la survie des lymphocytes T en participant à l'établissement d'une mémoire immunitaire CD8 (Schluns *et al.* 2000; Kaech *et al.* 2003) et CD4 (Kondrack *et al.* 2003).

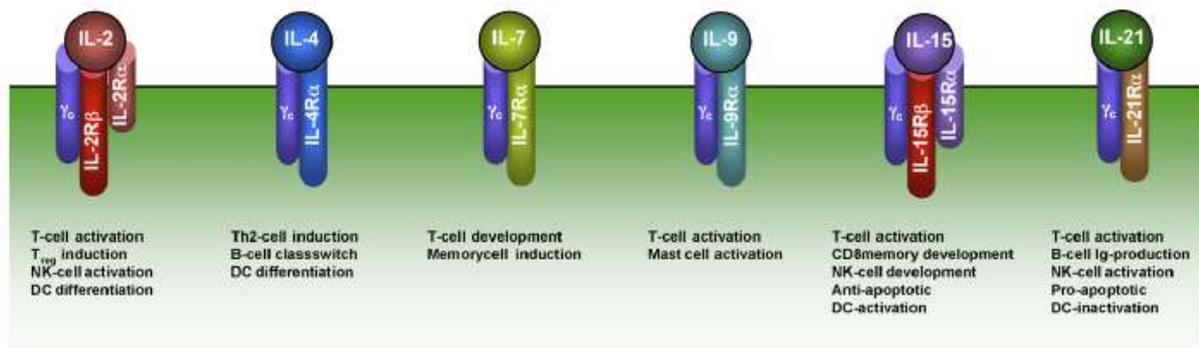


Figure 8: Famille de cytokines liant la même sous-unité  $\gamma$  de leur récepteur (Brandt *et al.* 2007)

## IL-10/IL-21

L'IL-10 a un rôle inhibiteur dans la maturation des DC. Sécrétée par les DC elles-mêmes, elle est impliquée dans la différenciation de certains lymphocytes T régulateurs (Groux *et al.* 1997). Elle peut être induite après stimulation des TLR, et c'est le ratio IL-10 versus cytokines activatrices, comme l'IL-12, qui détermine le profil de la réponse (tolérance ou immunité).

## IL-11

L'IL-11, qui fait partie de la famille de l'IL-1, est impliquée dans la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th2 (Curti *et al.* 2001).

## IL-12

L'IL-12 fut initialement identifiée comme un facteur stimulant des cellules NK et un facteur maturant des lymphocytes cytotoxiques (Kobayashi *et al.* 1989; Wolf *et al.* 1991). Elle peut agir en synergie avec l'IL-18 ou l'IL-2 pour induire la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les NK (Walker *et al.* 1999) et active la prolifération des lymphocytes T, ce qui fait d'elle un activateur aussi bien du système inné, que du système adaptatif.

Elle est le facteur primordial pour la différenciation des lymphocytes T CD4 en sous-type Th1 (Manetti *et al.* 1993; Seder *et al.* 1994), ce qui permet d'orienter les réponses immunes vers la voie cellulaire cytotoxique.

Elle est constituée de deux chaînes, la sous-unité p40 constitutive et la sous-unité p35 inductible, l'ensemble formant une cytokine active de 70 kDa. Dans la même famille, on retrouve l'IL-23 qui partage la même sous-unité p40, liée à une sous-unité p19, et l'IL-27 constituée de la p28 et de EBI3, une protéine relative à IL-12p40. L'IL-12 active est l'IL-12p70 mais il a été montré que pour bien déterminer l'activité de la cytokine, il fallait considérer toutes les formes d'IL-12 sécrétées: p70, p40 et p40(2) (homodimère), ces deux dernières étant des antagonistes de p70 (Klinke 2006).

L'IL-12p70 est principalement sécrétée par les DC myéloïdes matures, et non par les DC plasmacytoïdes (Rissoan *et al.* 1999), et est induite après stimulation des TLR (Verdijk *et al.* 1999; Agrawal *et al.* 2003), du CD40 (cf § I.3.d.β) ou action de l'IFN $\gamma$  (Vieira *et al.* 2000). Sa sécrétion est par contre inhibée par le PGE2 (Kalinski *et al.* 1997), ce médiateur induisant la production d'IL-12p40 (Kalinski *et al.* 2001).

Une combinaison de TLR (Napolitani *et al.* 2005) ou de différents récepteurs du non-soi (Tada *et al.* 2005) permet d'augmenter considérablement sa sécrétion. La stimulation conjointe du CD40 et du TLR4 également (Lapteva *et al.* 2007). La production des interférons de type I par les DC est impliquée, par boucle autocrine, dans cette sécrétion d'IL-12p70 (Gautier *et al.* 2005).

L'induction d'IL-12p70 par la stimulation des TLR ou les signaux provenant de lymphocytes T helper est une propriété des DC immatures ou semi-matures (Kalinski *et al.* 1999) et sa cinétique de sécrétion montre un maximum entre 10 et 18h après activation (Langenkamp *et al.* 2000).

## **IL-13**

Les DC peuvent sécréter de l'IL-13 dont les fonctions biologiques sont très proches de l'IL-4 car elles ciblent toutes deux le même récepteur IL-4R $\alpha$ . L'IL-13, qui semble supplanter le rôle de l'IL-4 dans la différenciation des DC elles-mêmes (Morse *et al.* 1999), apparaît comme un signal primordial de la différenciation des lymphocytes CD4 en lymphocytes Th2

(Bellinghausen et al. 2003). Il agit en diminuant la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes Th1 (Webb et al. 2007).

L'IL-13, et l'IL-4 indirectement, sont les signaux de la différenciation des lymphocytes CD4 en Th2 produits par les DC. Cependant, il existe une voie IL-4-indépendante d'induction des Th2, via les Notch-ligands (Amsen et al. 2004).

## **IL-15**

L'IL-15 est exprimée par les DC matures (CD83+). Son expression augmente après phagocytose et, à la manière de l'IL-16, elle peut promouvoir l'attraction des lymphocytes T (Jonuleit *et al.* 1997b). Elle est induite par divers signaux d'activation des DC (Mattei *et al.* 2001) dont le CD40L, qui augmente les capacités immuno-stimulatrices des DC (Kuniyoshi *et al.* 1999). L'IL-15 a un rôle fondamental dans la différenciation et la survie des cellules NK (Kennedy *et al.* 2000; Cooper *et al.* 2002). Elle est également importante pour le contrôle des réponses CD8: elle contribue à leur activation, leur survie et à la génération d'un pool de lymphocytes T CD8 mémoires (Schluns *et al.* 2002; Weng *et al.* 2002).

L'IL-15 est impliquée dans la sécrétion d'IL-2 par les DC (Feau *et al.* 2005). Ces deux cytokines ont d'ailleurs des effets biologiques très proches dans la mesure où leurs récepteurs partagent les mêmes unités de signalisation  $\beta$  et  $\gamma$ , la chaîne  $\alpha$  assurant la spécificité (Giri *et al.* 1995).

L'impact de cette cytokine sur les réponses immunes, innées ou adaptatives, est médié par une boucle autocrine-paracrine d'IL-15-IL-15R $\alpha$  agissant sur les DC pour augmenter leurs capacités d'activation immune (Ruckert *et al.* 2003). L'IL-15 est d'ailleurs impliquée dans la majorité des réactions inflammatoires (Tada *et al.* 2005).

L'IL-15, liée à son récepteur sur les DC, peut agir par trans-présentation et activer les lymphocytes B dans les follicules lymphoïdes (Park *et al.* 2004). Ce mode d'activation est aussi celui des cellules NK, contrairement à l'IL-12 qui est soluble (Ferlazzo *et al.* 2004; Lucas *et al.* 2007).

## **IL-16**

L'IL-16 fut d'abord identifiée comme un facteur chimioattractant pour les cellules T, son récepteur étant le CD4 (Center *et al.* 1996). Elle a un rôle activateur sur les lymphocytes T CD4, en synergie avec l'IL-2 ou l'IL-15, et induit l'expression de CD25 (Parada *et al.* 1998). Les DC expriment constitutivement cette cytokine et y sont également sensibles (Kaser *et al.* 1999). L'IL-16, sécrétée par les lymphocytes T et par les lymphocytes B, représente un autre moyen de

favoriser la migration des DC aux organes lymphoïdes et leur rencontre avec les lymphocytes (Kaser *et al.* 2000) (Stoitzner *et al.* 2001). La sécrétion d'IL-16 augmente avec la maturation des Mo-DC (DC dérivées des monocytes) (Reich *et al.* 2004).

## **IL-18**

L'IL-18 fait partie de la famille de l'IL-1 et nécessite l'intervention de la caspase-1 pour être active. Elle fut d'abord identifiée sous le nom de IGIF (IFN $\gamma$  inducing factor) car elle favorise la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T et les NK (via la voie des MAP kinases) (Okamura *et al.* 1995). Elle est ainsi impliquée dans la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th1, agissant en synergie avec l'IL-12 (Micallef *et al.* 1996; Tominaga *et al.* 2000) et augmente l'activité cytotoxique des NK (Hyodo *et al.* 1999). Il a cependant été montré qu'en absence d'IL-12, l'IL-18 pouvait avoir l'effet inverse en stimulant la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 par les lymphocytes T et les NK, ceci favorisant les réponses Th2, avec production d'IgE et d'IgG1 par les lymphocytes B (Yoshimoto *et al.* 2000).

Elle induit la production d'IFN $\gamma$  par les DC, en synergie avec l'IL-4 (Fukao *et al.* 2000). Elle favorise, de manière plus générale, la maturation des DC (Li *et al.* 2004) en agissant de manière autocrine-paracrine.

## **IL-23/27**

L'IL-23, comme l'IL-12 et l'IL-27, sert de co-facteur pour la prolifération des lymphocytes T mais semble agir préférentiellement sur les lymphocytes T CD4 mémoires plutôt que sur les naïfs (Oppmann *et al.* 2000). Au contraire, l'IL-27 agit sur les lymphocytes T CD4 naïfs pour induire leur prolifération, en synergie avec l'IL-12 et l'IL-2 (Pflanz *et al.* 2002).

Alors que l'IL-12 est le facteur primordial pour la différenciation des lymphocytes Th1, l'IL-23 est impliquée dans la différenciation d'un autre sous-type de lymphocytes T CD4, les Th17 (Aggarwal *et al.* 2003). L'IL-23 a un rôle dans l'homéostasie des neutrophiles, alors que l'IL-17 produite par les Th17 participe à leur recrutement aux sites d'infections (Stark *et al.* 2005).

L'IL-23, comme l'IL-27, peut cependant jouer un rôle dans les réponses Th1 en amplifiant la sécrétion d'IFN $\gamma$ . Elle peut agir en synergie avec l'IL-18 et l'IL-2 pour activer les cellules NK (Parham *et al.* 2002).. Contrairement à l'IL-12, l'IL-23 peut être induite par PGE2 (Sheibanie *et al.* 2004).

L'IL-27, qui peut sensibiliser les lymphocytes T à la polarisation induite par l'IL-12 (par expression de IL-12R $\beta$ 2), régule également la différenciation Th2 en diminuant l'expression du

facteur de transcription GATA-3 (Lucas *et al.* 2003), mais a un rôle complexe puisqu'on lui attribue aussi des propriétés suppressives de la réponse T (en cas d'infection par *T. gondii*) (Villarino *et al.* 2003). La contribution précise de chaque cytokine de la famille de l'IL-12 dans les réponses aux infections est complexe et reste encore à définir.

### **TNF $\alpha$**

Le TNF $\alpha$  est une des cytokines inflammatoires sécrétées par les DC après activation. C'est aussi un signal d'induction de leur programme de maturation, qui peut agir en synergie avec d'autres signaux, tels que les molécules de danger (Delneste *et al.* 1999; Schnurr *et al.* 2000), les cytokines inflammatoires (Berger *et al.* 2002), les motifs pathogènes (Spisek *et al.* 2001) ou les autres molécules de la famille du TNF (Yu *et al.* 2003b). Le TNF $\alpha$  seul induit la maturation mais de manière réversible (Nelson *et al.* 1999) et participe à la capacité de présentation antigénique des DC en favorisant l'accumulation des CMH II (Cella *et al.* 1997).

### **IFN de type I**

Les IFN de type I (IFN $\alpha$  et  $\beta$ ) sont des effecteurs précoces de la réaction immunitaire contre divers microbes (bactériens et viraux) et permettent de réguler les réponses adaptatives Th1/cytotoxiques. Leur rôle est assez complexe puisqu'en fonction du contexte, ils peuvent soit activer, soit réprimer ces réponses. En effet, ils sont connus pour leur rôle activateur de la prolifération des lymphocytes T (et de la cytotoxicité des NK) (Tough *et al.* 1996; Marrack *et al.* 1999), mais ils peuvent aussi inhiber la production d'IFN $\gamma$  par ces derniers (Nguyen *et al.* 2000).

La balance de ce double rôle est intimement liée aux DC et à leur état de maturation. Elles sont sensibles aux IFN de type I car elles en expriment le récepteur, et c'est d'ailleurs un des signaux autocrine-paracrine qui favorise leur maturation et leur sécrétion d'IL-12p70 (Gautier *et al.* 2005). Ils favorisent aussi la cross-présentation d'antigènes viraux par les DC (Le Bon *et al.* 2003). Pourtant, dans certains cas, ils apparaissent comme un signal inhibiteur vis-à-vis de l'IL-12p70 et de l'induction de lymphocytes T Th1 (Cousens *et al.* 1997; McRae *et al.* 1998). En fait, il semblerait que les IFN I aient un effet inhibiteur quand ils sont présents lors du « priming » des lymphocytes T, mais que ce soit l'inverse lorsqu'ils conditionnent les DC pendant leur maturation (Nagai *et al.* 2003). Ce conditionnement est aussi dépendant de la cinétique d'exposition puisque ce sont les DC en cours de maturation qui sont réceptrices aux IFN de type I pour induire des réponses Th1, alors que les DC immatures, caractéristiques des tissus périphériques, sont plutôt régulatrices (Longman *et al.* 2007).

Les DC sécrètent des IFN de type I après activation des TLR (3, 4, 7/8 et 9) (Kawai and Akira 2006). Cependant, cela reste une spécialité des DC plasmacytoïdes qui en sécrètent jusqu'à 1000 fois plus que les autres cellules (Siegal *et al.* 1999).

## IFN de type II

Bien que ce soit une caractéristique des lymphocytes des voies cytotoxiques et Th1 (cellules NK, Th1, CTL), les DC, comme les macrophages, sécrètent de l'IFN $\gamma$  en réponse à divers signaux de maturation et cytokiniques (Fukao *et al.* 2000) (Figure 9). Ceci a pour conséquence d'amplifier leur activation (augmentation de l'expression de B7-2 et de la sécrétion d'IL-12) (Yoshida *et al.* 1994) et celle des cellules environnantes.

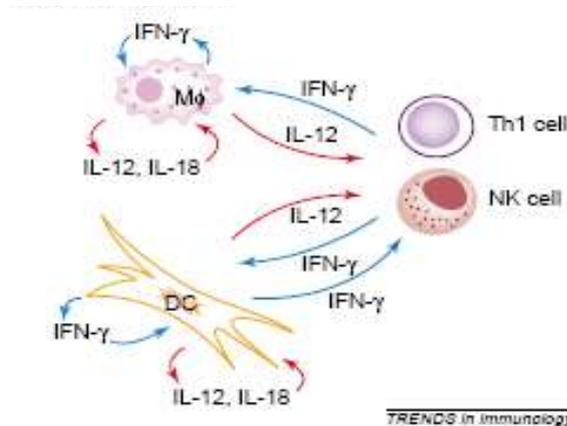


Figure 9: **IFN $\gamma$  et sources cellulaires** (Frucht *et al.* 2001)

Les DC sont sensibles à l'IFN $\gamma$  car elles expriment le récepteur (chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ ). Cependant, cette sensibilité n'est pas un phénomène constant et varie en fonction de l'état de maturation des DC : CD119 (chaîne  $\beta$  du récepteur) a tendance à diminuer chez les DC en fin de maturation (Kalinski *et al.* 1999).

L'IFN $\gamma$ , sécrété par les lymphocytes T CD4 et les NK, se présente comme un signal secondaire de maturation des DC, au même titre que le CD40L ou TRANCE. Ses actions sont multiples mais la plus importante concerne la présentation antigénique : il permet l'augmentation sur les DC des CMH I et II (Wallach *et al.* 1982). Il induit le changement de certaines sous-unités du protéasome ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5) pour basculer vers l'immuno-protéasome (LMP2, LMP7, MCL-1), à l'origine de la cross-présentation d'antigènes exogènes (Groettrup *et al.* 2001). Ce changement de la nature du protéasome permet d'augmenter la quantité, la qualité et le répertoire des peptides antigéniques.

L'IFN $\gamma$  induit aussi la sécrétion par les DC des chémokines IP-10, Mig, MIP-1 $\alpha$  et 1 $\beta$  qui favorisent l'attraction des lymphocytes T Th1 et CD8 (Taub *et al.* 1993a; Gil *et al.* 2001).

## **I.4) Fonctions**

Les DC jouent un rôle de sentinelle dans l'organisme. Lors d'une agression, elles transitent du sang vers les tissus périphériques. Là, elles internalisent les antigènes et engagent leur processus de maturation au contact des signaux de danger. Elles migrent alors vers les ganglions lymphatiques où elles rencontrent les lymphocytes T et induisent les réponses immunes. Nous suivrons ce paradigme bien qu'il s'applique préférentiellement aux DC myéloïdes et qu'il puisse être discuté par rapport aux connaissances actuelles (Reis e Sousa, 2006).

### *I.4.a) Recrutement des DC vers les tissus périphériques*

Le recrutement des DC vers les tissus périphériques est un phénomène très rapide. Des expériences menées chez la souris mettent en évidence une migration de DC immatures au niveau des sites d'inflammation 1h après injection d'agents pathogènes (McWilliam *et al.*, 1994). Ces DC, provenant du sang ou des tissus environnants, sont attirées principalement par les chimiokines inflammatoires produites par les cellules endothéliales ou épithéliales (Rollins, 1997). La présence de récepteurs aux chimiokines, à la surface des DC, détermine leur capacité de migration. Ainsi, les cellules de Langherans qui expriment la molécule CCR6 migrent en réponse à la chimiokine MIP-3 $\alpha$ . Les DC du sang CD11c<sup>+</sup> ou les Mo-DC n'expriment pas, quant à elles, le récepteur CCR6. Elles sont néanmoins capables de répondre à d'autres chimiokines telles que MCP-1, MIP-1 $\alpha$  ou RANTES, grâce respectivement à leurs récepteurs CCR2 et CCR1 ou CCR5 (Caux *et al.*, 2000; Dieu-Nosjean *et al.*, 2000; Dieu *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998). Plus généralement, diverses molécules exercent également des propriétés attractives sur les DC immatures. Ce sont par exemple la protéine C1q du complément (Vegh *et al.*, 2006), les anaphylatoxines (Gutzmer *et al.*, 2006), des peptides formylés dérivés de bactéries (Sozzani *et al.*, 1995) ou les défensines (Yang *et al.*, 2000).

Pour atteindre les sites d'inflammation, les DC doivent traverser les assemblages de collagènes, de laminines ou de protéoglycanes des tissus conjonctifs et des membranes basales

(Leblond et Inoue, 1989). Cela est permis notamment par la sécrétion de MMP (Matrix MetalloProteinase) (Ratzinger *et al.*, 2002). Il a d'ailleurs été récemment montré que la protéine RANTES favorisait la sécrétion et l'activation de la protéase MMP-9 par les DC immatures (Chabot *et al.*, 2006). Cette molécule procure donc aux DC immatures un signal chimio-attractant, ainsi que la possibilité de dégrader la matrice extracellulaire, propriété indispensable à leur migration. Enfin, au niveau des sites d'inflammation, le contact des DC immatures avec des agents dérivés de pathogènes se traduit par l'expression des chimiokines MCP-1 ou MIP-1 $\alpha$  (Means *et al.*, 2003), permettant ainsi de maintenir ou d'amplifier le recrutement d'autres DC.

Parvenues dans les tissus périphériques, les DC sont confrontées au contexte inflammatoire et/ou infectieux. L'internalisation des antigènes et le processus de maturation leur permettront d'informer les lymphocytes dans les ganglions de la nature du danger auquel elles ont été exposées.

#### *1.4.b) Internalisation des antigènes*

L'efficacité de l'internalisation des antigènes par les DC repose sur des activités de phagocytose, d'endocytose ou de macropinocytose, qui se distinguent par les récepteurs sollicités (cf § I.3.b), les mécanismes cellulaires mis en jeu, ainsi que par la nature du matériel internalisé (Figure 10).

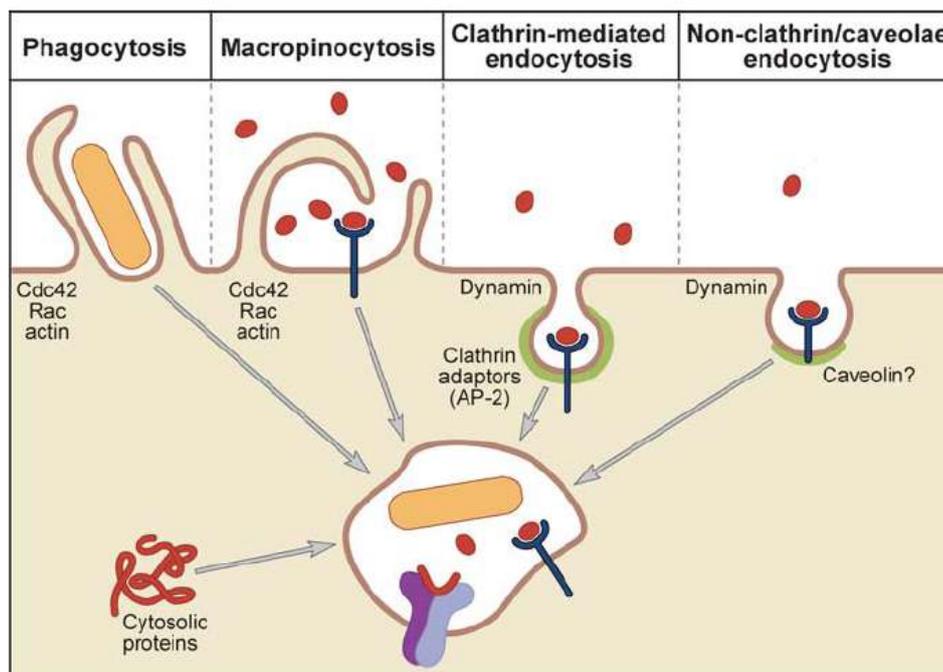


Figure 10: **Voies d'internalisation des antigènes** (Trombetta and Mellman 2005)

- la **phagocytose**. C'est un processus dépendant de l'actine, capable d'internaliser de larges particules ou pathogènes ( $\geq 1\mu\text{m}$ ). Bien que les propriétés de phagocytose des DC soient faibles par rapport à celles des macrophages, elles sont dotées de différents récepteurs leur permettant de reconnaître et d'internaliser un matériel très divers. Ainsi, les cellules apoptotiques ou nécrotiques sont phagocytées via les récepteurs au complément, la molécule de surface CD14, les intégrines  $\alpha\text{v}\beta 3$  et  $\alpha\text{v}\beta 5$ , ou les récepteurs de type scavenger comme CD36 ou CD68 (Albert *et al.*, 1998a; Berard *et al.*, 2000; Rubartelli *et al.*, 1997; Shaif-Muthana *et al.*, 2000; Subklewe *et al.*, 2001) (Savill et Fadok, 2000). La phagocytose permet aussi l'internalisation de complexes immuns (Fanger *et al.*, 1996) ou de pathogènes (Blank *et al.*, 1993; Gildea *et al.*, 2001; Inaba *et al.*, 1993; Romagnoli *et al.*, 2004; Uronen-Hansson *et al.*, 2004). S'il s'agit d'une bactérie, il en résultera généralement une réponse inflammatoire, par activation simultanée de Pattern Recognition Receptor (PRR) (cf § I.3.a). Il est à noter que la signalisation via les TLR a été décrite comme étant essentielle dans la régulation de la phagocytose, mobilisant les filaments d'actine (West et al. 2004) et augmentant la vitesse de phagocytose. Elle joue également en régulant la maturation des phagosomes, qui s'acidifient peu chez les DC, comparativement aux autres phagocytes.

- l'**endocytose** est une internalisation d'antigènes, récepteur spécifique (récepteurs aux Fc, récepteurs scavenger, récepteurs aux Hsp, lectines de type C : cf § I.3.a), qui inclut la formation de vésicules, par un réseau de clathrine (Roth 2006) ou de cavéoline (Gumbleton *et al.* 2000). Le type de vésicule dépendra de la nature de l'antigène et du récepteur mis en jeu. En fonction de la nature de l'antigène seront ciblés des compartiments endosomaux plus ou moins tardifs (à pH plus ou moins acide).

- la **macropinocytose** permet d'internaliser, de manière actine-dépendante, des antigènes solubles et de les concentrer dans des vésicules intracellulaires CMH II+ (Sallusto *et al.* 1995). Ce processus est particulièrement important chez les DC (Norbury 2006) et pourrait faire intervenir des récepteurs spécifiques (comme CD91 et la calréticuline chez les macrophages (Ogden *et al.* 2001)).

La phagocytose et la macropinocytose sont deux processus contrôlés par les GTPases Rho, Rac et cdc42.

#### *1.4.c) Apprêtement et présentation des antigènes internalisés*

Si les macrophages ou les lymphocytes B sont aussi des CPA, seules les DC sont véritablement spécialisées dans cette tâche. Les antigènes ne sont pas reconnus sous leur forme native, mais doivent subir des modifications physicochimiques aboutissant à leur fragmentation en peptides et à leur présentation sur les molécules du CMH. C'est le phénomène de processing ou d'apprêtement. Il repose sur des mécanismes protéolytiques (protéasome, lysosome), partagés par la plupart des cellules de l'organisme, mais qu'elles utilisent alors pour le catabolisme et le maintien de l'homéostasie cellulaire.

##### $\alpha$ ) Présentation des antigènes sur le CMH de classe I

La voie cytosolique permet de présenter des peptides issus de protéines nouvellement synthétisées, cellulaires ou virales. Dans le cas de protéines cellulaires, elle participe à la maintenance de la tolérance au soi.

Les protéines endogènes, nouvellement synthétisées ou rétrotransloquées de la membrane ou du RE (réticulum endoplasmique), sont d'abord ubiquitinilées dans le cytosol pour être dégradées par le protéasome et diverses peptidases (Trombetta et Mellman, 2005) (Figure 11). Le protéasome (26S) est un complexe d'enzymes protéolytiques qui se compose de deux grosses sous-unités : la sous-unité 20S « cœur » et la sous-unité régulatrice 19S (ou PA700), chacune étant elle-même constituée de multiples sous-unités. L'unité 20S comprend entre autres les unités catalytiques  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$  en double exemplaire. Le 20S, sous certaines conditions physiologiques, peut se trouver sous une deuxième forme : l'immuno-protéasome, qui possède des unités catalytiques différentes ( $\beta 1i$  ou LMP-2,  $\beta 2i$  ou MECL-1 et  $\beta 5i$  ou LMP-7) lui permettant de générer des peptides différents. Cette unité « cœur » forme un cylindre creux dans lequel la protéine est introduite pour être dégradée. L'unité 19S, quant à elle, est une unité régulatrice ATP-dépendante. D'autres régulateurs, ATP-indépendants, se lient au 20S pour réguler son activité (PA28 $\alpha\beta$ , PA200) (Demartino and Gillette 2007).

Les peptides ainsi générés accèdent alors *via* le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing) au RE. Là, ils sont clivés par la protéase ERAAP (Endoplasmic

Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing ou ERAP 1) en peptides de 9 à 10 acides aminés qui seront apprêtés sur les molécules du CMH-I (Serwold *et al.*, 2002). TAP est une protéine membranaire du RE qui sélectionne les peptides selon leur taille et leur séquence (van Endert *et al.* 1995). Les complexes CMH I-peptides sont ensuite exportés à la membrane cellulaire.

Il faut noter qu'il existe une réelle coopération entre les différentes unités de ce complexe, ce qui garantit sa stabilité : le peptide assurant une bonne conformation de la chaîne lourde du CMH avec la  $\beta$ -2 microglobuline, et ne se fixant à la chaîne lourde de manière forte qu'en présence de cette dernière.

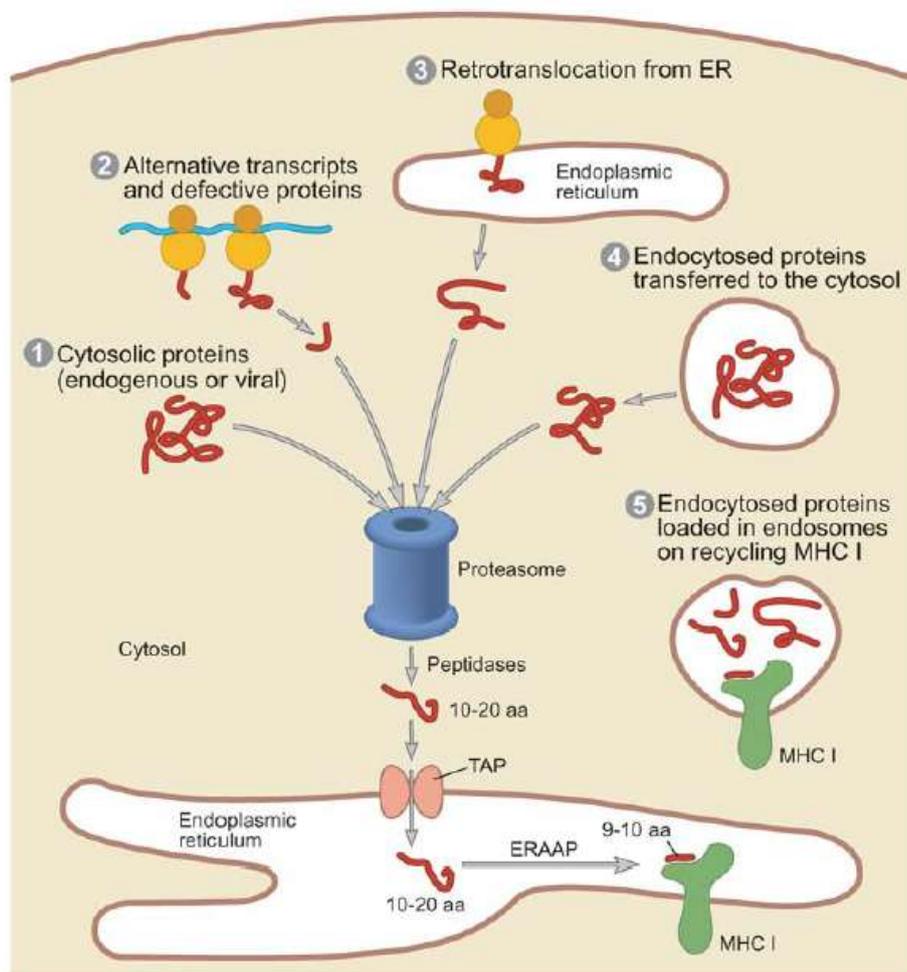


Figure 11: **Voie d'apprêtement au CMH I** (Trombetta and Mellman 2005)

Le CMH de classe I est spécialisé dans la présentation de peptides endogènes. Cependant, les DC sont également capables de présenter des peptides exogènes internalisés sur le CMH-I grâce au processus de **présentation croisée** (Albert et al., 1998b). La présentation croisée fut pour la première fois documentée dans les années 1970 par l'équipe de Bevan (Bevan 1976).

Cette voie est quantitativement moins importante que la présentation endogène. Elle est néanmoins essentielle pour générer une réponse lymphocytaire T CD8 contre les cellules tumorales ou les pathogènes qui n'infectent pas les DC.

Différents mécanismes permettent aux antigènes internalisés d'accéder au CMH-I. Ils peuvent être transférés des vésicules d'internalisation vers le cytosol grâce au système ERAD (ER-Associated Degradation system), qui reposerait sur la fusion des vésicules d'endocytose avec le réticulum endoplasmique (Guermonprez *et al.*, 2003). Les antigènes seraient alors transférés des vésicules d'endocytose vers le cytoplasme des DC par le canal Sec61 (Inaba et Inaba, 2005) et suivraient ensuite la voie protéasome/TAP/réticulum endoplasmique. La contribution de cette voie dans le processus de présentation croisée reste cependant discutée (Groothuis et Neefjes, 2005; Touret *et al.*, 2005).

Dans un autre mécanisme, les peptides peuvent être générés dans les vésicules d'endocytose après dégradation par la cathepsine S notamment, et présentés sur des molécules du CMH-I en phase de recyclage. C'est la voie TAP-indépendante (Rock et Shen, 2005; Shen et al., 2004 ; Bachmann *et al.* 1995).

Les DC régulent leur capacité de présentation croisée durant la maturation (Gil-Torregrosa *et al.* 2004). Le CD40L a été décrit comme étant un des facteurs qui favorisait cette voie de présentation antigénique (Delamarre *et al.* 2003). L'IFN $\gamma$  est connu pour induire le remplacement du protéasome constitutif par l'immunoprotéasome, permettant d'augmenter la quantité, la qualité et le répertoire des peptides présentables par le CMH I (Groettrup *et al.* 2001). L'engagement du CMH II avec le TCR des lymphocytes CD4 favorise aussi la présentation croisée d'antigènes (Machy *et al.* 2002).

## β) Présentation des antigènes sur le CMH de classe II

Cette voie d'apprêtement permet de présenter des antigènes internalisés par phagocytose ou endocytose. Les vésicules d'internalisation s'acidifient pour permettre la dégradation enzymatique des antigènes en peptides ; cette acidification sera plus ou moins modérée selon la nature de l'antigène. Les vésicules fusionnent ensuite avec le compartiment MIIC (MHC class II compartiment) pour permettre une fixation du peptide sur le CMH II. Il existe une autre théorie selon laquelle l'antigène rencontrerait très tôt (avant sa dégradation) les molécules du CMH II, celles-ci assurant la protection des épitopes, et ce n'est qu'ensuite que les peptides seraient générés (Deng *et al.* 1993).

Les molécules du CMH II se forment dans le RE par association des chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et invariante (Ii) en nonamères, et sont transférées au Golgi. Elles vont ensuite soit s'accumuler dans les compartiments MIIC, soit être exportées à la membrane cellulaire. La chaîne Ii a un rôle important puisqu'elle assure un bon repliement des molécules de CMH II dans le RE et leur transfert au Golgi. Elle empêche aussi la liaison aléatoire de peptides endogènes au CMH II par son segment CLIP qui occupe le sillon de liaison peptidique (Sette *et al.* 1995).

## γ) Présentation restreinte au système CD1

Outre les molécules du CMH I et du CMH II, les DC expriment une troisième classe de molécules impliquées dans la présentation aux lymphocytes T, les molécules CD1. Les molécules de la famille CD1 ont une structure très proche de celle des molécules du CMH I, comprenant une chaîne lourde s'associant avec la  $\beta$ -2 microglobuline. On peut les classer en trois groupes : le premier qui comprend CD1a, CD1b et CD1c présente des antigènes lipidiques aux lymphocytes T clonaux, le deuxième groupe (CD1d) est plus spécifique des cellules NKT et le troisième comprend CD1e. La présentation antigénique par les CD1 est un autre argument pour situer les DC à l'interface entre immunité innée par activation des cellules NKT (agissant en masse) et immunité acquise via les lymphocytes T spécifiques.

Les CD1 possèdent trois domaines extracellulaires, assurant la fixation de motifs lipidiques. Les molécules présentées peuvent être aussi bien d'origine endogène (cellulaire)

qu'étrangère, microbienne, c'est le cas de *Mycobacterium tuberculosis* qui possède des lipoglycanes présentables par le CD1b (Sieling *et al.* 1995).

Les molécules CD1 nouvellement synthétisées sont localisées dans le RE où elles peuvent rencontrer et fixer des molécules lipidiques cellulaires. Ces complexes sont ensuite externalisés à la membrane plasmique par la voie sécrétrice.

#### I.4.d) Maturation

Comme décrit précédemment, les DC disposent de nombreux récepteurs capables de reconnaître des molécules dérivées de pathogènes (molécules exogènes) ou des molécules endogènes produites en dehors de tout contexte infectieux (cf § I.3.a et b). Ces dernières peuvent être issues de l'environnement tumoral. La reconnaissance de ces molécules peut se traduire par la maturation des DC, caractérisée notamment par la perte des capacités de phagocytose, le développement d'extensions cytoplasmiques, la migration vers les organes lymphoïdes ou encore l'expression de molécules membranaires (cf § I.3.d et e) et de cytokines (cf § I.3.f) (Figure 12).

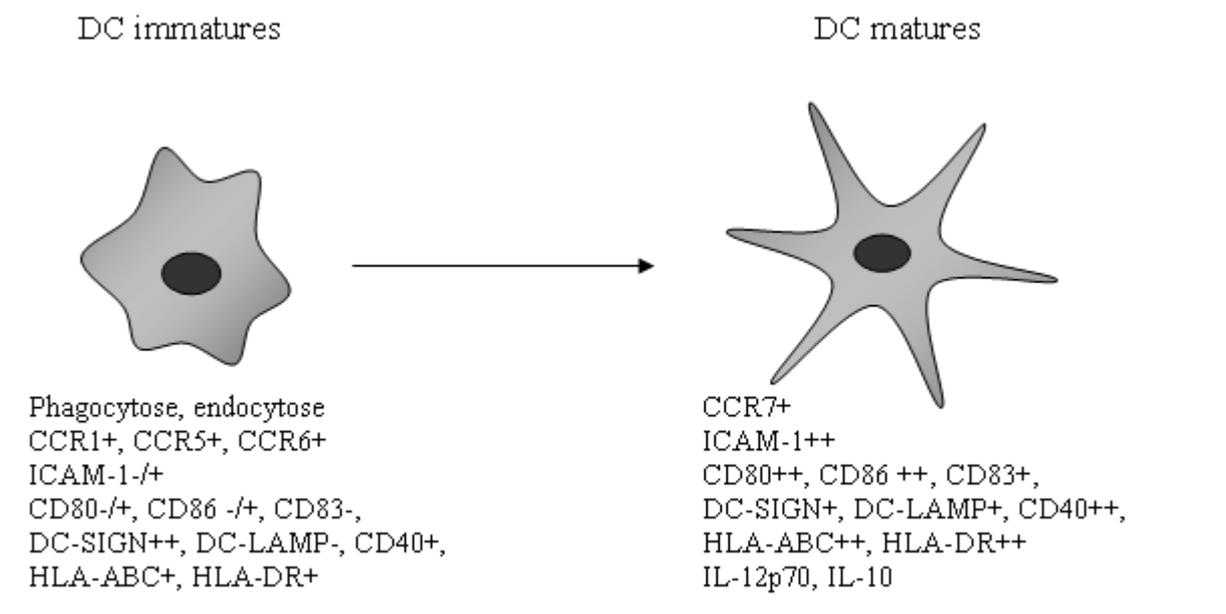


Figure 12 : **Propriétés des cellules dendritiques immatures et matures**

#### *1.4.e) Migration des DC vers les tissus périphériques*

L'activation des DC s'accompagne de leur migration *via* les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions. Les premiers travaux montrent une modification du profil d'expression des récepteurs aux chimiokines au cours de la maturation, avec une augmentation de l'expression de CCR7 conjointement à une diminution de l'expression de CCR1, CCR5 ou CCR6 (Dieu *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998). Par ailleurs, un défaut de migration des DC peut être observé chez des souris transgéniques CCR7<sup>-/-</sup> (Forster *et al.*, 1999; Trefzer *et al.*, 2004). Néanmoins, la preuve formelle de l'implication directe de la molécule CCR7 dans la migration des DC vers les ganglions lymphatiques proviendra d'expériences de transfert adoptif de DC de phénotype CCR7<sup>-/-</sup> dans des souris CCR7<sup>+/+</sup> (Martín-Fontecha *et al.*, 2003).

L'expression de la molécule CCR7 est donc nécessaire à la migration des DC vers les organes périphériques. Elle permet aux DC de répondre aux chimiokines CCL19 et CCL21 (cf § 1.3.f.α) produites par les cellules stromales des régions T des ganglions (Kellermann *et al.*, 1999). L'expression de CCR7 n'est cependant pas suffisante pour assurer la migration des DC. Sa fonctionnalité repose sur l'expression membranaire de l'ADP-ribosyl cyclase CD38 (Partida-Sanchez *et al.*, 2004) et sur la présence dans l'environnement de molécules comme PGE2 (prostaglandine E2) (Scandella *et al.*, 2002), les leucotriènes (Robbiani *et al.*, 2000) ou le NO (oxyde nitrique) (Giordano *et al.*, 2006). Il a aussi été démontré que la présence de cellules apoptotiques, associée à un signal de maturation (TNFα ou LPS), pouvait induire la migration des DC (Bertho *et al.*, 2005). Aujourd'hui, les mécanismes moléculaires impliqués dans la sensibilisation du récepteur CCR7 restent largement inconnus. Récemment, il a été démontré qu'une boucle autocrine-paracrine de la molécule nucléaire HMGB1 (High Mobility Group Box 1), suite à l'induction de maturation, était nécessaire à l'augmentation de l'expression de CCR7 et de CXCR4 à la surface des DC et à la migration de celles-ci (Dumitriu *et al.* 2007).

Après contact avec un pathogène, les DC arrivent dans les ganglions en moins de 24h (Legge et Braciale, 2003). Les DC pulmonaires rejoignent les ganglions bronchiaux 6 heures après contact avec un agent pathogène (Legge and Braciale 2003). Une autre étude a montré qu'il leur fallait 18 heures pour amener les antigènes du site d'injection sous-cutané vers les ganglions (Itano *et al.* 2003). La migration des cellules de Langherans (LC) est par contre

beaucoup plus lente (3jours). Les LC pourraient de fait être impliquées dans la reconnaissance de pathogènes particuliers, nécessitant une réponse retardée, ou dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T effecteurs et mémoires uniquement au niveau de la peau (Kamath *et al.*, 2002; Villadangos et Heath, 2005). Les pDC sont, elles, capables d'accéder directement du sang aux ganglions, indépendamment des vaisseaux lymphatiques, mais *via* les HEV (High Endothelial Venules) (Yoneyama *et al.*, 2004).

Au cours de la migration, le contact avec les chimiokines CCL19 et CCL21 permet de renforcer la maturation des DC et leur capacité à activer les lymphocytes T et à générer une réponse de type Th1 (Marsland *et al.*, 2005).

## **1.5) Activation du système immunitaire**

On peut classer les réponses immunes adaptatives induites par les DC en deux grands sous-types : le type 1 est associé à la génération de lymphocytes cytotoxiques CD8 (CTL) avec ou non la coopération de lymphocytes T helper (CD4+) Th1, le type 2 concerne l'activation des lymphocytes B en plasmocytes, avec la participation des lymphocytes T helper Th2. Le choix de la réponse sera fonction de la nature de l'agent pathogène.

### *1.5.a) Interaction DC/Lymphocytes T*

Les DC pénétrant dans les ganglions lymphatiques sont dirigées par un gradient de chimiokines vers les aires paracorticales où elles vont interagir avec les lymphocytes T. Il a été montré, par des études dynamiques en microscopie photonique, que les interactions courtes qui ont lieu dans les premières heures de la maturation des DC deviennent beaucoup plus longues après 10h de maturation, permettant ainsi un meilleur échange de signaux. Ces interactions redeviennent courtes par la suite (après 20h) (Hugues *et al.* 2004; Lindquist *et al.* 2004).

Pour promouvoir ces interactions, les DC sécrètent des chimiokines attractives des lymphocytes T naïfs et différenciés/mémoires (CCL19, CCL21, CCL3, CCL4, Mig...(cf § I.3.f.α)). CCL3 et CCL4 ont d'ailleurs été décrites comme indispensables pour permettre l'activation des lymphocytes T CD8 les attirant vers le site des interactions DC-CD4 (Castellino *et al.* 2006).

L'interaction entre DC et lymphocyte T se traduit au cours de la formation de la synapse immunologique par un échange de signaux de costimulation ou d'inhibition (Figure 7 (cf § I.3.e)). Elle conduit au "priming" des lymphocytes T et au déclenchement d'une réaction immunitaire ou à leur inactivation.

### α) Synapse immunologique

Le contact entre DC et lymphocyte T conduit à une polarisation du cytosquelette d'actine et des microtubules et à la concentration, au sein d'une synapse immunologique, de molécules de présentation, de costimulation et d'adhérence (figure 13). La synapse immunologique s'organise en régions concentriques. La partie centrale appelée cSMAC (central Supramolecular Activation Cluster) comprend principalement le TCR, interagissant avec le CMH-peptide, et les molécules de costimulation. A la périphérie, se trouve la région pSMAC (peripheral Supramolecular Activation Cluster), composée des molécules d'adhésion, notamment ICAM 1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) et LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) (Friedl *et al.*, 2005).

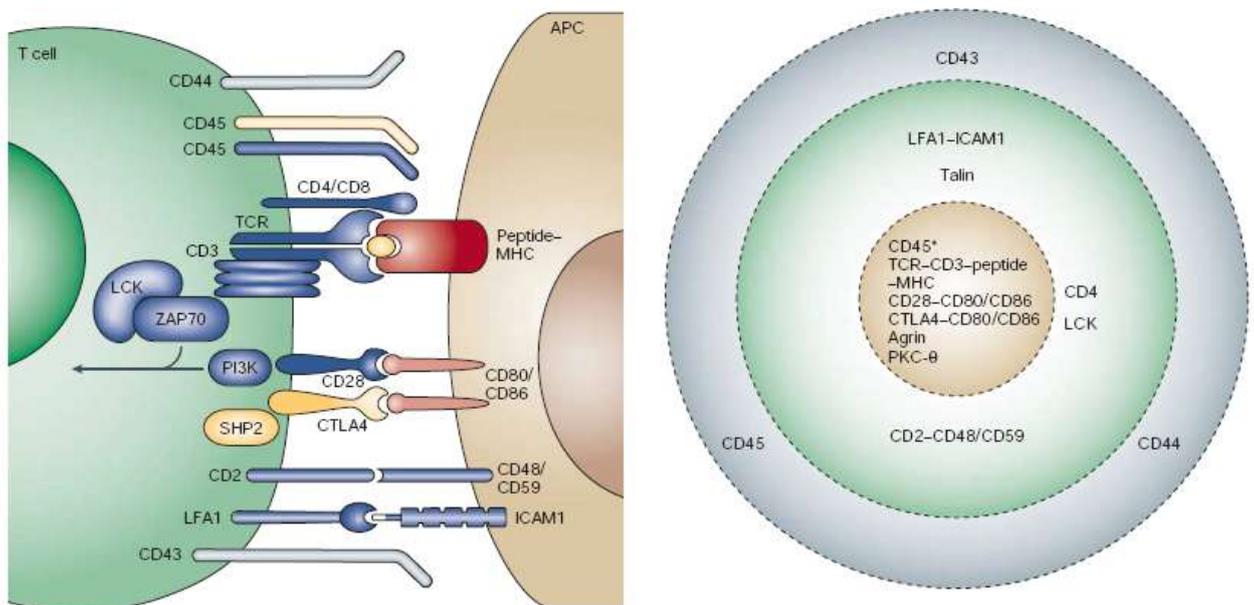


Figure 13 : **Synapse immunologique et SMAC** (Huppa and Davis 2003)

Le rôle biologique de la synapse immunologique n'est pas clairement défini. Une hypothèse est que son organisation spatiale facilite la signalisation entre les lymphocytes T et les DC (Dustin et Cooper, 2000). Mais il a été aussi montré que la signalisation *via* le TCR précède

la formation de la synapse (Lee *et al.*, 2002b). Il semble que l'interaction T-DC peut se faire selon différentes modalités qui déterminent la réponse engagée. Par exemple, un priming des lymphocytes T implique des interactions stables avec les DC (plusieurs heures), alors qu'en situation de tolérance, les contacts sont transitoires (quelques minutes) et répétitifs (Hugues *et al.*, 2004).

### β) Activation des lymphocytes T

L'activation efficace et fonctionnelle des lymphocytes T naïfs se traduit par une expansion clonale et leur différenciation en cellules mémoires et en cellules effectrices sécrétrices de cytokines. L'amplitude de la réponse immunitaire dépend de nombreux facteurs comme la concentration en antigène à la surface des DC, l'affinité du TCR pour le CMH-peptide correspondant ou le niveau de maturation des DC, ainsi que la nature du stimulus de maturation (Gett *et al.*, 2003). Une stimulation par des DC matures induit une prolifération des lymphocytes T et leur différenciation en cellules effectrices et mémoires. Les lymphocytes ont alors la capacité de répondre aux cytokines telles que l'IL-7 et l'IL-15, et présentent une résistance accrue à l'apoptose en l'absence de cytokines ou d'autres stimulations antigéniques.

L'interaction entre DC et lymphocytes T est un processus complexe et ordonné, qui fait intervenir de nombreux signaux membranaires ou solubles habituellement classés en 3 catégories. Le signal 1 consiste en la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Seul, il ne permet pas l'activation des lymphocytes. Il doit être suivi par un signal 2, de costimulation, qui fait intervenir les molécules CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) et CD28 (figure 7 (cf § I.3.e.α)). L'expression des molécules de costimulation est directement liée à l'état d'activation des lymphocytes. Dès lors, les molécules CD28 et HVEM présentes sur les lymphocytes T naïfs seraient les premières impliquées dans l'interaction avec les DC (Croft, 2003). L'expansion clonale ferait intervenir les protéines CD28 et CD27 et ultérieurement, l'expression des molécules 4-1BB et d'OX40 procurerait des signaux de survie aux lymphocytes T.

Enfin, les DC procurent un signal 3, responsable de l'orientation de la réponse immune. L'activité fonctionnelle des lymphocytes CD4 peut en effet être polarisée vers un type Th1, caractérisé par la sécrétion d'IFN $\gamma$  et de TNF $\beta$ , favorisant la différenciation des lymphocytes T CD8 en lymphocytes T cytotoxiques capables d'éliminer les cellules cibles, ou vers un type Th2,

avec sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13, assurant une réponse humorale contre les microorganismes extracellulaires (Murphy et Reiner, 2002). L'orientation de la réponse immune dépend principalement du stimulus de maturation (de Jong *et al.*, 2002; Mazzoni et Segal, 2004) mais aussi d'autres facteurs comme le type de DC impliquées (myéloïdes ou plasmacytoïdes) (Rissoan *et al.*, 1999), la concentration en antigène lors du chargement des DC (Boonstra *et al.*, 2003; Hosken *et al.*, 1995), le ratio entre DC et lymphocytes T (Tanaka *et al.*, 2000) ou la cinétique de la maturation (Langenkamp *et al.*, 2000).

En effet, des DC en début de maturation seraient plutôt pro-Th1 (Camporeale *et al.* 2003), et plus sensibles à des signaux supplémentaires délivrés dans les ganglions (par les lymphocytes T CD4 eux-même via CD40L par exemple) (Kalady *et al.* 2004), alors que dans un état de maturation plus tardif, elles sont plutôt pro-Th2 (Langenkamp *et al.* 2000), voire même « exhausted » et réfractaires à des signaux sub-séquents (Spisek *et al.* 2003).

D'un point de vue moléculaire, l'IL-12p70 produite en grande quantité après reconnaissance de pathogènes suivie d'une stimulation par CD40L (Krug *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2000) est un élément majeur de la polarisation Th1. Il a d'ailleurs été montré que le maximum de sécrétion de l'IL-12p70 se situe entre 10 et 18h après induction de maturation, ce qui correspond à l'intervalle de temps où les DC sont dans les ganglions et interagissent fortement avec les lymphocytes T (Langenkamp *et al.* 2000). Néanmoins, des molécules comme l'IL-23, l'IL-27, l'IL-18, l'IFN (de Jong *et al.*, 2005; Trinchieri *et al.*, 2003), ou l'expression du ligand de Notch Delta favorisent également les réponses Th1. Par contre, la présence du marqueur OX40L (Akiba *et al.*, 2000), du ligand de Notch Jagged (Lehar et Bevan, 2004) ou une forte expression, par les DC, de la molécule CD86 par rapport à CD80 (Kuchroo *et al.*, 1995) sont des inducteurs de réponses Th2.

### γ) Conditionnement des DC par les lymphocytes CD4

Il est communément admis que ce sont les mêmes DC qui rencontrent les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 (Bennett *et al.*, 1998). Mais, contrairement à ce que l'on pensait auparavant, il n'y a pas forcément d'interaction simultanée entre ces trois types cellulaires, mais plutôt une rencontre en série (Toes et al., 1998). Les DC jouent dans ce cas le rôle de « pont temporel » (temporal bridge) entre les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 (Ridge *et al.*, 1998). Elles rencontrent en premier lieu les CD4, induisant leur différenciation en lymphocytes T helpers de type I (Th1) qui à leur tour conditionnent les DC afin qu'elles puissent activer les lymphocytes T CD8 en CTL effecteurs. C'est en fait l'interaction CD40/CD40L qui

assure cet effet "licensing" (Bennett *et al.*, 1998; Schoenberger *et al.*, 1998). En effet, comme expliqué précédemment, la liaison du CD40L à son récepteur induit la sécrétion d'IL-12 par les DC (Cella *et al.* 1996; Koch *et al.* 1996 (cf § I.3.e.β)). De même, l'IFN $\gamma$  sécrétés par les lymphocytes CD4 Th1 est un puissant signal de maturation (Wallach *et al.* 1982; Taub *et al.* 1993a; Gil *et al.* 2001 (cf § I.3.f.β)).

De plus, des études ont montré que la présence de lymphocytes T CD4 auxiliaires était nécessaire, lors du "priming", pour l'induction de lymphocytes T CD8 mémoires (Figure 14) (Janssen *et al.*, 2003; Shedlock et Shen, 2003; Sun et Bevan, 2003). Castellino et coll. ont présenté des données intéressantes (chez la souris) concernant les interactions DC-CD4-CD8. Ils ont en effet constaté que les DC, suite à l'interaction avec les lymphocytes CD4 helpers, sécrétaient des chimiokines (CCL3, CCL4) permettant l'attraction des CD8 (Castellino *et al.* 2006). Ce trio cellulaire serait alors essentiel à la différenciation des CD8 à phénotype de mémoire à long terme ou centraux, exprimant CD27, CD28 et, de manière très forte, la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7 (Castellino and Germain 2007).

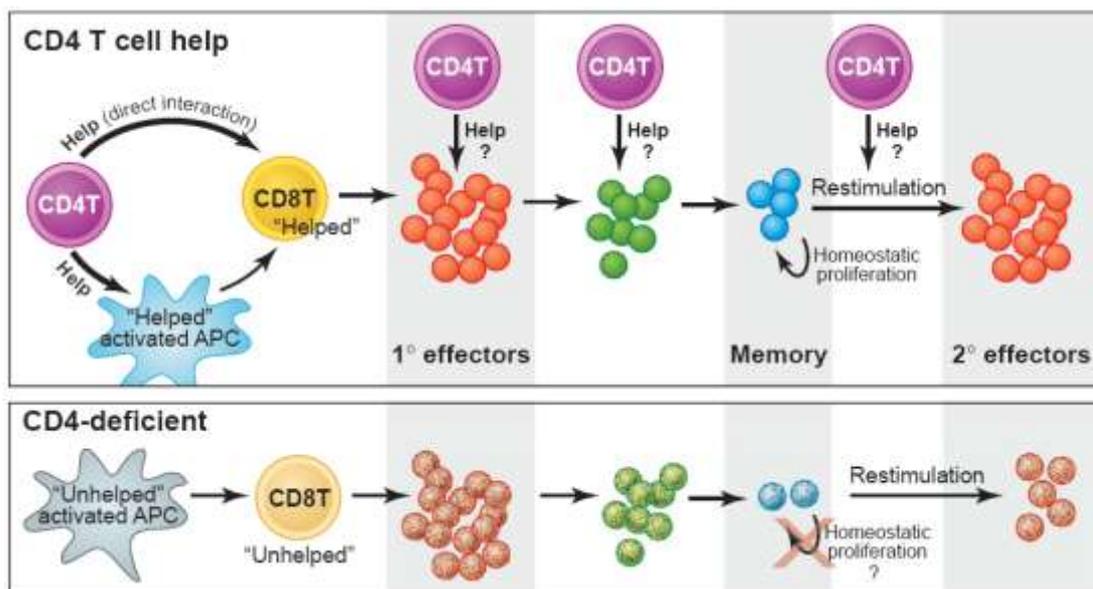


Figure 14 : Rôle des lymphocytes CD4 dans l'activation des lymphocytes CD8 (Kaech and Ahmed 2003)

#### δ) Génération de lymphocytes T CD8 mémoires

Les DC, par leur rôle central dans l'orientation du système immunitaire et la différenciation des lymphocytes, sont à la base d'une des caractéristiques fondamentales de

l'immunité adaptative : la mémoire immunitaire. Cette propriété permet à l'organisme de conserver une trace d'un pathogène et de pouvoir répondre de manière plus rapide et plus intense lors d'une nouvelle infection par ce même pathogène.

On peut ainsi distinguer la mémoire CD4, la mémoire LB et la mémoire CD8, cette dernière nous intéressant plus particulièrement dans le cadre de réponses anti-tumorales. Les lymphocytes T mémoires se distinguent des cellules effectrices par leur capacité à survivre à la phase de contraction qui suit l'activation et la prolifération clonale. Ils représentent 5 à 10 % des lymphocytes T spécifiques ayant proliféré.

On peut distinguer deux grands types de lymphocytes T CD8 mémoires : les centraux-mémoires (TCM) que l'on retrouve dans les ganglions et la rate et qui expriment le marqueur caractéristique de localisation centrale CCR7, et les effecteurs-mémoires (TEM) qui sont à un stade intermédiaire, circulent dans le sang et la lymphe et que l'on peut retrouver dans les tissus (Sallusto *et al.* 1999). Les TEM peuvent réagir de manière très rapide vis-à-vis de l'antigène alors que les TCM ont une action qui dure plus longtemps.

La difficulté réside dans leur identification précise parmi les autres populations lymphocytaires. Elle se fait par le biais de marqueurs dont l'expression fluctue au cours de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T (Figure 15).

C'est le cas par exemple de **CD45** ou LCA (leukocyte common antigen), une tyrosine phosphatase dont il existe différents isoformes. Les lymphocytes T naïfs expriment l'isoforme RA mais ont tendance à le perdre après activation pour laisser place à l'isoforme RO (Jacobsen *et al.* 2000). Ce dernier est caractéristique des lymphocytes T mémoires. Le RA a cependant tendance à être ré-exprimé, de manière intermédiaire, chez les lymphocytes T mémoires.

On observe une régulation similaire pour les deux récepteurs **CD27** et **CD28** (cf I.3.e.α et β), qui caractérise la « dédifférenciation » des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T mémoires, avec la réacquisition de caractéristiques de lymphocytes T naïfs. Ces cellules naïves sont initialement doublement positives, perdent le CD28 après stimulation du TCR, puis le CD27, mais ces deux molécules sont réexprimées lors de la différenciation en cellules mémoires.

On peut aussi caractériser les lymphocytes T mémoires, CD8 ou CD4, par leur expression de récepteurs aux chimiokines : **CCR7** étant caractéristique des lymphocytes T naïfs et centraux-

mémoires et de leur localisation ganglionnaire, alors que **CCR5** (ou **CXCR5** pour les **CD4**) marque les lymphocytes T activés (Campbell *et al.* 2001).

De la même manière, l'expression de **CD62L** (L-sélectine) suit d'assez près celle du **CCR7**, du fait de son rôle majeur dans l'adhésion des lymphocytes aux HEV et leur migration vers les ganglions lymphatiques.

Enfin, le niveau d'expression de molécules cytotoxiques telles que la **perforine** ou le granzyme B donne une idée du stade de développement des lymphocytes T et de leurs propriétés (au repos ou cytotoxiques). Les TEM possèdent généralement de nombreuses vésicules cytolytiques qui leur permettent d'être rapidement efficaces lors d'une re-présentation de l'antigène. Les TCM, par contre, n'en possèdent pas et nécessitent, tels les lymphocytes T naïfs, une activation de leur TCR et CD28 pour l'induction de granules cytotoxiques (Meng *et al.* 2006). L'avantage certain des lymphocytes T mémoires réside dans leur plus grande fréquence de précurseurs par rapport aux lymphocytes T naïfs.

Une dernière caractéristique qui permet d'identifier les lymphocytes T mémoires, notamment à long terme, est leur forte expression des récepteurs aux cytokines essentielles à leur survie comme **IL-7**, **IL1-5** (Schluns *et al.* 2002). Bien que l'IL-7 ne soit pas un facteur déterminant pour la génération des lymphocytes T mémoires (Sun *et al.* 2006), elle est importante pour leur homéostasie et leur survie (Kaech *et al.* 2003). Ainsi les lymphocytes T mémoires à long terme sont issus d'une population **CD127<sup>high</sup>** (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7) (Castellino and Germain 2007).

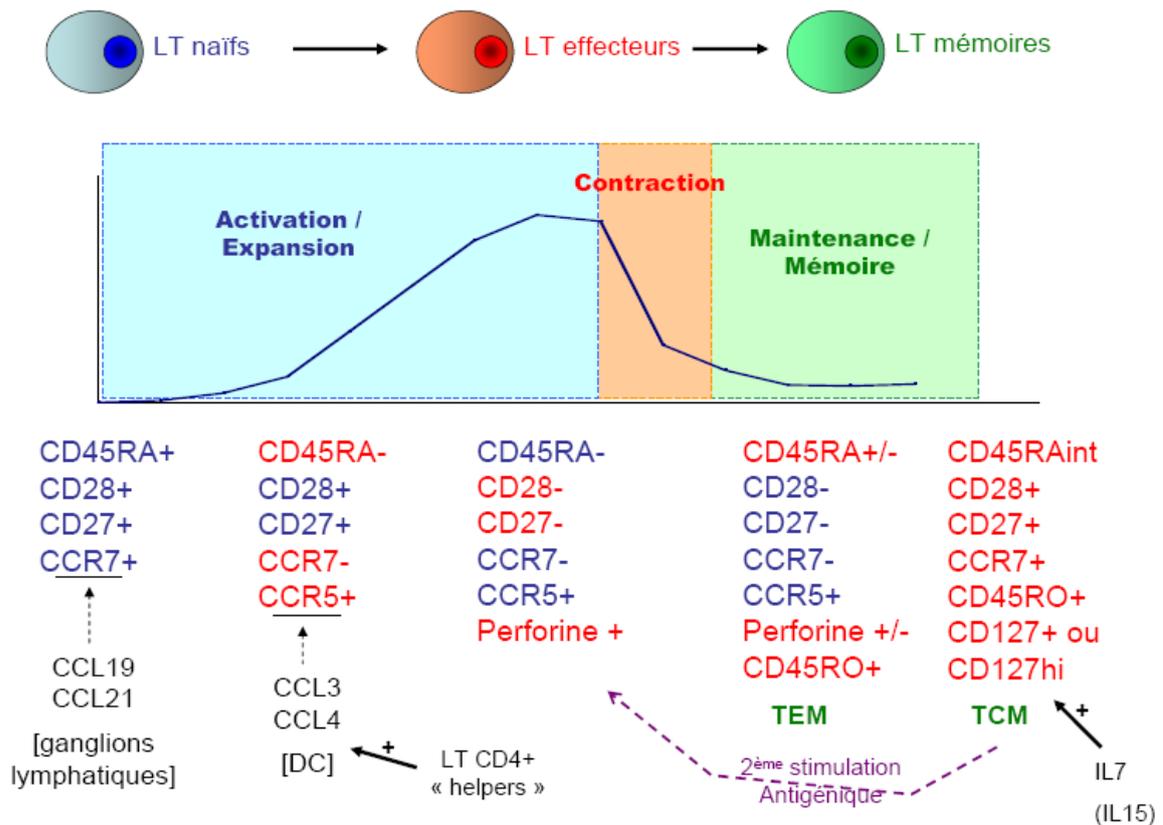


Figure 15 : Caractérisation des lymphocytes CD8 mémoires

La différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs puis en mémoires est un phénomène réversible puisque les TCM sont susceptibles de devenir des TEM puis de nouveau des effecteurs, lors d'une deuxième présentation antigénique (Tomiyama *et al.* 2002). Ces TEM semblent dans ce cas se subdiviser en deux groupes, une majorité donnant des lymphocytes T aux propriétés effectrices et une minorité gardant des propriétés de cellules mémoires (Schwendemann *et al.* 2005).

La caractérisation des lymphocytes T mémoires repose donc sur un ensemble de marqueurs. On peut considérer les lymphocytes CD8 mémoires à long terme (TCM), susceptibles de donner une réponse efficace lors d'un deuxième challenge avec l'antigène, comme étant des cellules CD45RO+, avec des niveaux intermédiaires de CD45RA, CD27+, CD28+, majoritairement CCR7+ et CD62L+, et exprimant des niveaux élevés de CD127.

Pour expliquer l'origine des lymphocytes T mémoires, l'équipe de Ahmed (Kaech and Ahmed 2001) a proposé un modèle où les lymphocytes T mémoires seraient issus du pool de lymphocytes T effecteurs qui auraient survécu à la phase de contraction de la réponse primaire à

l'antigène. Leurs résultats montrent que les lymphocytes T activés par l'antigène sont capables de mettre en place un programme de différenciation complet de l'état naïf vers l'état effecteur, puis l'état mémoire.

#### ε) Génération de lymphocytes T régulateurs

L'implication des DC immatures dans la tolérance périphérique aux antigènes du soi est maintenant bien établie (Steinman *et al.*, 2003). La présentation des antigènes par des DC immatures entraîne ainsi une prolifération abortive et une anergie des lymphocytes T (van Stipdonk *et al.*, 2003). Néanmoins, les DC matures peuvent aussi participer au processus de tolérance (Rutella *et al.*, 2006). L'exposition des DC à des molécules comme l'IL-10, le TGFβ, la vitamine D<sub>3</sub> ou bien les corticostéroïdes peut générer des DC tolérogènes (Lyakh *et al.*, 2005; Stock *et al.*, 2005).

Mais les DC peuvent surtout promouvoir la tolérance par l'induction des lymphocytes T régulateurs (Treg).

On peut distinguer les Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, qui sont impliqués dans la tolérance périphérique, c'est-à-dire un contrôle des réactions immunes vis-à-vis d'auto-antigènes (suppression des lymphocytes T auto-réactifs ayant échappé au contrôle thymique) ou au niveau de sites particulièrement exposés (voies aériennes) (Jonuleit *et al.* 2001b). Leur mode d'action, contact-dépendant, semble reposer sur l'inhibition de sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T effecteurs CD4 ou CD8 (Thornton and Shevach 1998). Ils expriment constitutivement CD25, CTLA4 et GITR et sont issus de la différenciation thymique.

Le deuxième type de Treg (les Th<sub>sup</sub>) est qualifié d'acquis ou d'induit (en périphérie) et concerne les Tr1 et les Th3. Ces derniers peuvent être induits par les Treg naturels à partir des populations CD4<sup>+</sup> (Dieckmann *et al.* 2002) ou sous certaines conditions (absence de signaux de costimulation, présence de cytokines comme IL-2 et le TGFβ ou de drogues inhibitrices) (Zheng *et al.* 2004). La grande différence entre ces deux types majeurs de Treg réside dans leur mode d'action, les Treg naturels étant contact-dépendants alors que les Tr1 et Th3 agissent via des cytokines (IL-10 pour les Tr1 et TGFβ pour les Th3). Les Th3 auraient plus tendance à réguler les réponses Th2 et font partie de la tolérance orale (Weiner 2001), alors que les Tr1 contrôlent

les réponses auto-immunes et sont spécifiques d'antigènes tumoraux, pathogènes ou allo-antigènes (Groux *et al.* 1997).

Les sous-populations de Treg CD4 peuvent aussi être distinguées par l'expression de l'intégrine  $\alpha E$  : les Treg naturels ou naïfs étant négatifs alors que les Treg induits, antigène-spécifiques et effecteurs-mémoires sont positifs (Huehn *et al.* 2004). Il a également été montré que les Treg, selon leur profil, avaient des capacités différentes de « homing » aux ganglions lymphatiques : les Treg  $\alpha E^+ CD25^+$  sont aussi  $CD62L^+$  et  $CCR7^+$ , alors que les Treg induits  $\alpha E^+$  qui expriment des taux variables de CD25 ont aussi une expression variable de CCR7 (Menning *et al.* 2007; Tosello *et al.* 2008).

Il existe également des lymphocytes T CD8 régulateurs, certains antigène-spécifiques et nécessitant un contact cellulaire, d'autres agissant plutôt par le biais de cytokines comme  $IFN\gamma$ , IL-6 ou encore IL-10. Ces Ts (lymphocytes T suppresseurs) ont une action ciblée vers les APC elles-mêmes en modulant leur profil de maturation (Liu *et al.* 1998; Chang *et al.* 2002), ou vers les populations lymphocytaires CD4 ou CD8 en inhibant leur prolifération et leur fonction cytotoxique, mais n'auraient pas d'action cytotoxique directe (Balashov *et al.* 1995).

Ce qui semble être un caractère uniforme, spécifique et essentiel à cette famille de Treg est l'expression du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3) (Fontenot and Rudensky 2005), indispensable à leur développement.

L'état de maturation des DC est un facteur déterminant dans leur capacité à réguler l'activation des Treg naturels  $CD4^+ CD25^+$  (Fehervari and Sakaguchi 2004) (Figure 16). En effet, des DC immatures, ayant phagocyté du matériel antigénique et acquis les capacités de migrer en dehors de tout contexte inflammatoire ou infectieux, n'expriment pas de molécules de costimulation ni d'autres marqueurs de maturation et sont capables d'induire la différenciation de cellules Tr1 (Jonuleit *et al.* 2000). D'autres études ont montré que des DC semi-matures, induites par du TNF $\alpha$  seul, seraient aussi à l'origine de Treg (Menges *et al.* 2002). Même des DC matures (via le LPS) sont capables d'induire des Treg (Verhasselt *et al.* 2004). La balance tolérance / immunité sera déterminée par les conditions de maturation des DC. Dans ce contexte, il a été envisagé que la présence de signaux helpers pendant la maturation des DC était la condition nécessaire pour faire pencher la balance vers l'immunité plutôt que la tolérance (Albert *et al.* 2001; Bourgeois *et al.* 2002).

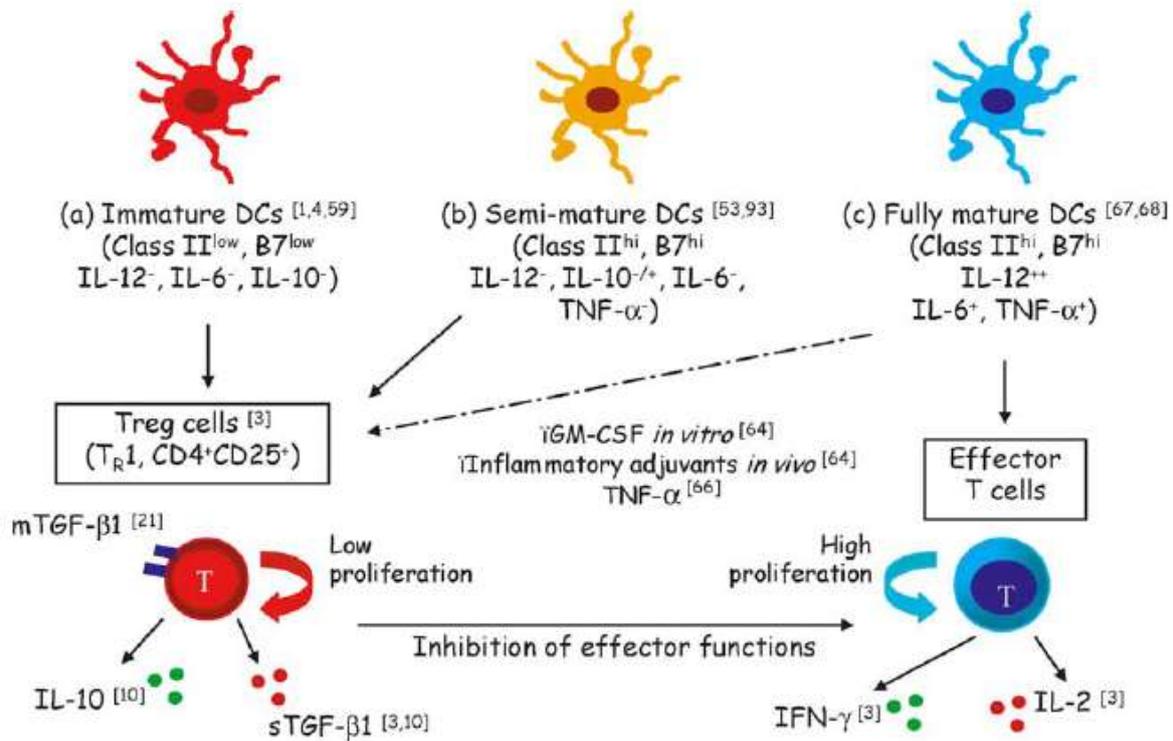


Figure 16 : Induction des Treg par les DC (Rutella and Lemoli 2004)

### 1.5.b) Interaction DC/cellules NK

Les cellules NK sont des lymphocytes du système inné, impliqués dans la réponse contre les cellules tumorales ou les micro-organismes. Ils reconnaissent leur cible grâce à un panel de récepteurs activateurs ou inhibiteurs. L'intégration de tous les signaux reçus détermine l'activation des NK. Les NK activés sécrètent diverses cytokines (GM-CSF, TNF $\alpha$ ) ou chimiokines (CCL3, CCL5, MIP1- $\alpha$ ) et présentent des capacités cytotoxiques.

Les DC matures peuvent activer les NK par la sécrétion d'IL-12, d'IL-18, d'IL-15 ou d'IFN de type I (Walzer *et al.*, 2005), ainsi que par contact cellulaire par l'interaction entre les molécules MICA/B (MHC class I-related Chain A/B) exprimées par les DC et le récepteur activateur NKG2D (Natural Killer Group protein 2 D) exprimé par les NK (Jinushi *et al.*, 2003). Réciproquement, les NK sont capables d'induire la maturation des DC selon des mécanismes dépendants de contacts cellulaires (intervention du récepteur NKp30 notamment) et de la sécrétion de cytokines (TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$ ) (Gerosa *et al.*, 2005; Piccioli *et al.*, 2002). La maturation des DC dépend alors du ratio DC/NK. En effet, en présence d'une forte proportion de

NK, l'interaction cellulaire conduit à la mort des DC (Ferlazzo *et al.*, 2002; Piccioli *et al.*, 2002). Les NK joueraient de cette manière un rôle dans la balance entre tolérance et immunité.

Par la sécrétion de cytokines, les NK peuvent orienter les lymphocytes vers un profil Th1 (Martin-Fontecha *et al.*, 2004). Dans le cas de tumeurs sans réaction inflammatoire, les NK seraient les premières cellules activées. Ils peuvent alors déclencher une réaction lymphocytaire T anti-tumorale par le biais des DC (Mocikat *et al.*, 2003) et même se substituer au lymphocytes T CD4 lors de l'activation des CTL (Adam *et al.*, 2005). Mais la régression tumorale relève aussi de l'activation des NK par les DC (Turner *et al.*, 2001; van den Broeke *et al.*, 2003). Les réponses anti-tumorales sont donc le produit de l'activation des DC par les NK ou de l'activation des NK par les DC.

### *1.5.c) Interaction DC/lymphocytes B*

L'activation des cellules B est induite par la reconnaissance de l'antigène par le BCR, qui induit d'une part une cascade de signalisations aboutissant à la prolifération et la différenciation de ces cellules en plasmocytes, et d'autre part la capture de l'antigène et son guidage vers les compartiments MIIC pour une présentation des peptides aux cellules T (Lanzavecchia 1985). Les LB sont sensibles aux antigènes solubles, qui peuvent aussi se retrouver liés à la membrane des DC sous forme d'immunocomplexes (molécules du complément ou anticorps). La présentation des antigènes aux LB par les DC nécessite la formation de synapses moléculaires constituées des complexes BCR - antigènes regroupés, entourés d'un anneau de LFA-1 – ICAM-1 (Carrasco *et al.* 2004), avec CD45 et CD43 exclus de la synapse (Delon *et al.* 2001).

L'activation des LB en plasmocytes s'accompagne d'une commutation isotypique des anticorps sécrétés, avec une spécificité déterminée par la nature de l'antigène. Les DC jouent un rôle important dans cette activation, non seulement par la présentation d'antigènes opsonisés, mais parce qu'elles sont à l'origine de la différenciation Th2 des lymphocytes T helpers qui apportent aux LB des signaux complémentaires (CD40L, IL-2, IL-10). Elles sont également à l'origine de l'activation CD40-indépendante des LB par la sécrétion de facteurs activateurs comme BAFF/BlyS, ou encore APRIL de la famille du TNF (Litinskiy *et al.* 2002), ou par des cytokines produites par les DC plasmacytoïdes préférentiellement (IL6, IFN $\alpha/\beta$ ) (Jego *et al.* 2003).

Les propriétés activatrices des DC sont donc intimement liées à leur état de maturation. Elles peuvent interagir avec les différentes populations leucocytaires et générer une réponse immune diversifiée (figure 17).

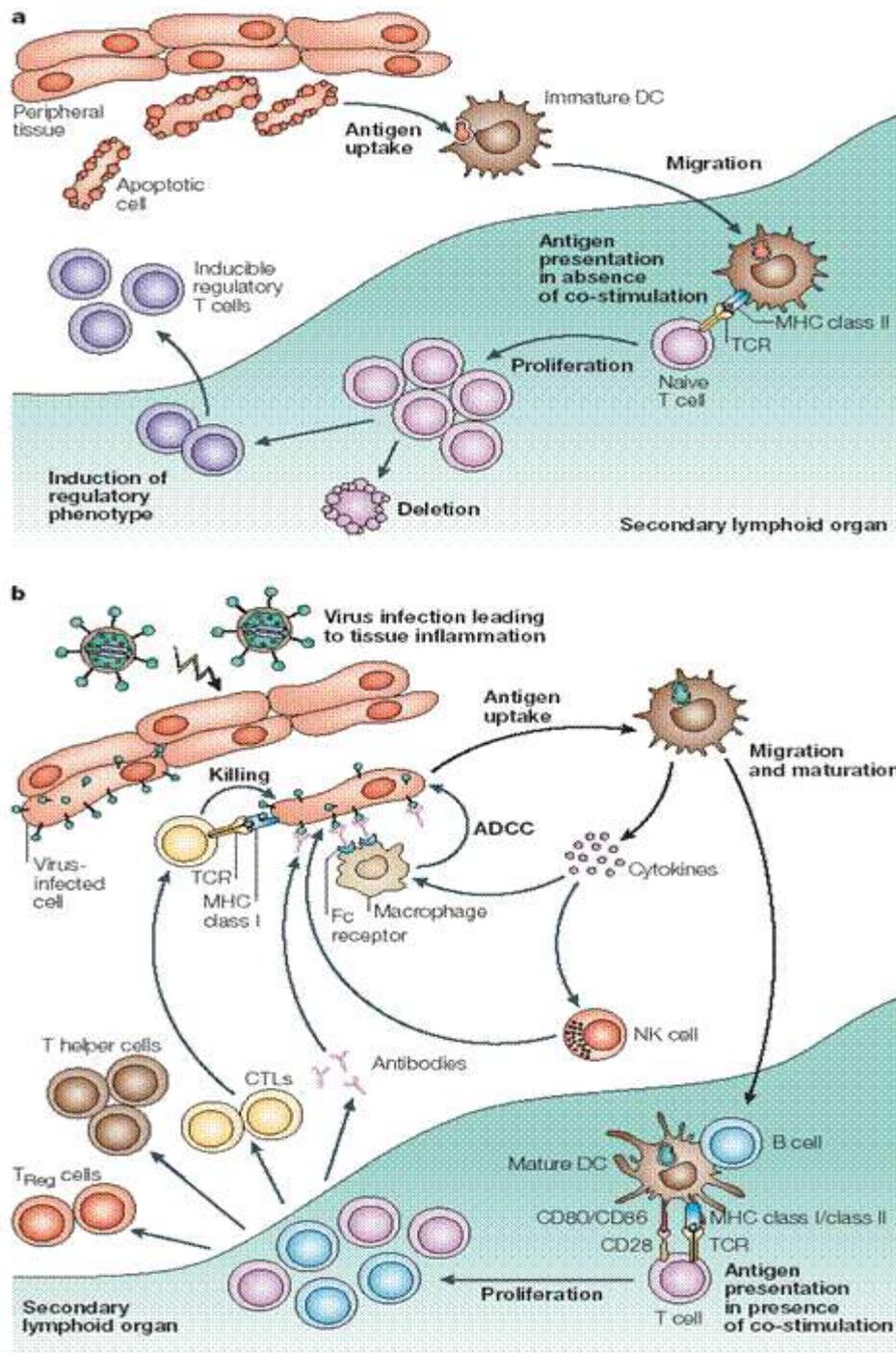


Figure 17 : Interaction des DC (a, immatures ; b, matures) avec les populations leucocytaires et induction de la tolérance ou de réponses immunes. (Bancherau J. et Palucka K., 2005).

## II) Les cellules dendritiques et l'immunothérapie anti-tumorale

Les traitements conventionnels du cancer sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. La chirurgie permet de réduire la masse tumorale, la radiothérapie et la chimiothérapie assurent l'élimination des cellules tumorales résiduelles à proximité de la tumeur ou dispersées dans l'organisme. Leur efficacité dépend bien sûr du type de cancer ainsi que du stade de la maladie. Mais, jusqu'à présent, eux seuls ont démontré un effet curatif. Toutefois, de nombreux cancers restent réfractaires à ces traitements qui sont par ailleurs généralement très lourds.

L'immunothérapie est une approche thérapeutique qui repose sur l'expression d'antigènes spécifiques à la surface des cellules cancéreuses et leur reconnaissance par le système immunitaire. Elle cible donc spécifiquement les cellules tumorales et peut générer une mémoire immunitaire, assurant une rémission à long terme. L'immunothérapie anti-tumorale peut être réalisée selon deux modalités : l'immunothérapie passive et l'immunothérapie active. L'immunothérapie passive ne vise pas à activer le système immunitaire de manière systématique *in situ*, mais fait appel à des effecteurs isolés et activés *in vitro* avant leur réinjection. L'immunothérapie active, ou vaccination, consiste à fournir l'antigène dans un contexte idéal de stimulation, afin de permettre le déclenchement d'une réponse immunitaire. Puisque les DC sont les cellules les plus efficaces pour induire une réponse immune, elles sont des candidates de choix pour une vaccination anti-tumorale. Jusqu'à présent, la majorité des essais cliniques ont été réalisés chez des patients atteints de mélanome. La fréquence de cette tumeur, son immunogénicité et sa disponibilité en font un modèle idéal pour l'immunothérapie.

### II.1) L'immunothérapie passive

#### II.1.a) Les anticorps monoclonaux

En 1975, Kohler et Milstein publient la méthode de production d'anticorps monoclonaux par des hybridomes, résultats de la fusion de lymphocytes B de souris avec des cellules de myélome (Kohler et Milstein, 1975). Les anticorps monoclonaux exploitent des mécanismes immunitaires comme l'ADCC (Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity) ou le CDC (Complement Dependant Cytotoxicity). Ils peuvent aussi induire le processus d'apoptose ou altérer des voies de transduction impliquées dans la prolifération cellulaire (O'Mahony et Bishop, 2006). Aujourd'hui, les anticorps monoclonaux sont indiqués dans plusieurs types de cancer. Les

anticorps anti-HER2 sont utilisés dans le traitement du cancer du sein (Baselga *et al.*, 1996) ou du cancer du poumon à petites cellules (Johnson et Janne, 2006) ; les anticorps anti-CD20 dans celui du lymphome non hodgkinien (Colombat *et al.*, 2001). Une nouvelle approche consiste par ailleurs à "armer" les anticorps en les couplant à des molécules radioactives ou à des drogues anticancéreuses, afin de diriger ces substances au niveau de l'environnement tumoral (Wu et Senter, 2005).

### *II.1.b) Les macrophages*

Des macrophages sont présents au sein de l'infiltrat de la plupart des tumeurs. Leur contribution dans le rejet ou la progression de la tumeur reste ambiguë. Néanmoins, ils peuvent être manipulés *ex vivo* pour lyser les cellules tumorales. La production à grande échelle de macrophages, à partir de monocytes circulants, a permis la réalisation d'essais d'immunothérapie, démontrant l'innocuité de cette approche (Andreesen *et al.*, 1998; Faradji *et al.*, 1994; Hennemann *et al.*, 1997). L'efficacité thérapeutique reste cependant très limitée. Elle pourrait toutefois être améliorée par l'administration conjointe d'anticorps, permettant l'opsonisation des cellules cibles.

### *II.1.c) Les lymphocytes*

Les années 80 et 90 ont vu le développement de l'immunothérapie adoptive, basée sur l'injection de lymphocytes. Les premiers essais concernent les LAK (Lymphokine-Activated Killer), des NK activés *in vitro* par de fortes doses d'IL-2, qui développent des activités cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales. Des résultats positifs ont été rapportés chez quelques patients, mais la complexité de la production des LAK, ainsi que les effets secondaires importants, dus à l'injection concomitante d'IL-2, limitent l'intérêt de cette approche (Rosenberg *et al.*, 1987; Rosenberg *et al.*, 1985). D'autres stratégies sont alors envisagées telles que l'utilisation de TIL (Tumor-Infiltrating Lymphocyte) (Dudley et Rosenberg, 2003; Rosenberg *et al.*, 1994). Ces lymphocytes ont une spécificité accrue pour leur cible. Ils peuvent être isolés à partir de biopsies tumorales et amplifiés *in vitro* avec de faibles doses d'IL-2. Si leur efficacité reste limitée surtout aux mélanomes, les TIL représentent une des approches d'immunothérapie les plus intéressantes (Benlalam *et al.*, 2006). Dernièrement, des lymphocytes

spécifiques de tumeurs, générés *in vitro* à partir de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de patients ont pu être utilisés (Vignard *et al.*, 2005).

## **II.2) L'immunothérapie active**

L'immunothérapie active consiste à fournir l'antigène dans un contexte idéal de stimulation, de manière à générer chez le receveur une réponse T anti-tumorale. Cette stratégie est fondée sur la capacité du système immunitaire du receveur à répondre à la vaccination. Par conséquent, les patients inscrits dans ces essais doivent être immunocompétents. Les vaccins anti-tumoraux sont basés généralement sur l'utilisation d'antigènes de tumeurs, de cellules tumorales autologues ou allogéniques ou bien de DC exprimant des antigènes de tumeurs.

### *II.2.a) Vaccination par injection d'antigènes de tumeur*

Cette stratégie vaccinale dépend naturellement de la connaissance préalable des antigènes de tumeurs exprimés par les cellules du patient. Les antigènes sont injectés en solution ou dans des liposomes (Gregoriadis, 1999; Jerome *et al.*, 2006), sous forme de protéines entières, de peptides, d'ARN ou d'ADN "nu" ou codé dans des vecteurs d'expression (Lonchay *et al.*, 2004; Moingeon, 2001; Yannelli et Wroblewski, 2004). L'utilisation d'IFN $\gamma$  et la combinaison de plusieurs antigènes de tumeur permettent de maintenir l'expression des molécules du CMH par les cellules tumorales et de limiter les phénomènes d'évasions de variants antigéniques (Baumgaertner *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2006; Yannelli et Wroblewski, 2004).

### *II.2.b) Vaccination par injection de cellules tumorales*

Dans l'idéal, cette vaccination est réalisée avec des cellules tumorales autologues, le patient étant alors immunisé contre tous les antigènes exprimés par sa propre tumeur. Cette méthode est toutefois limitée par la quantité de cellules tumorales disponible. Ainsi, les patients dont la tumeur est inaccessible ou ayant de petites lésions ne sont pas éligibles pour une telle thérapie. L'alternative peut être l'établissement d'une lignée tumorale autologue mais encore une fois, cela n'est pas applicable à tous les patients. Dans une étude concernant 695 patients atteints de différents types de cancers métastatiques, les auteurs ont pu établir des lignées cellulaires à court terme chez seulement 43% des patients (Dillman *et al.*, 2002).

Devant ces difficultés, de nombreux cliniciens s'orientent vers l'utilisation de lignées tumorales allogéniques partageant des antigènes de tumeurs avec les cellules du patient (Morton *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 2002). Ces lignées présentent l'avantage d'être parfaitement disponibles.

Enfin, les cellules tumorales autologues ou allogéniques peuvent être modifiées génétiquement pour exprimer des molécules capables de promouvoir la réponse immunitaire. Il peut s'agir de molécules de costimulation comme CD80 (Raez *et al.*, 2004) ou des cytokines comme l'IL-7, l'IL-2 ou le GM-CSF (Maio *et al.*, 2002; Nemunaitis *et al.*, 2006).

### *II.2.c) Vaccination par injection de cellules dendritiques*

Depuis le premier essai clinique réalisé en 1996 (Hsu *et al.*, 1996), cette dernière approche s'est considérablement développée et aujourd'hui, plus de 200 essais sont rapportés. Ces essais sont recensés sur le site <http://www.clinicaltrials.gov/ct>. Si la majorité des essais sont réalisés à partir de DC dérivées de monocytes, il existe *in vitro* de nombreux systèmes de production, de chargement ou de maturation. La vaccination par DC rassemble donc des produits cellulaires assez hétérogènes, qui sont de surcroît injectés selon des modalités et à des doses différentes (Figdor *et al.*, 2004) (Figure 18).

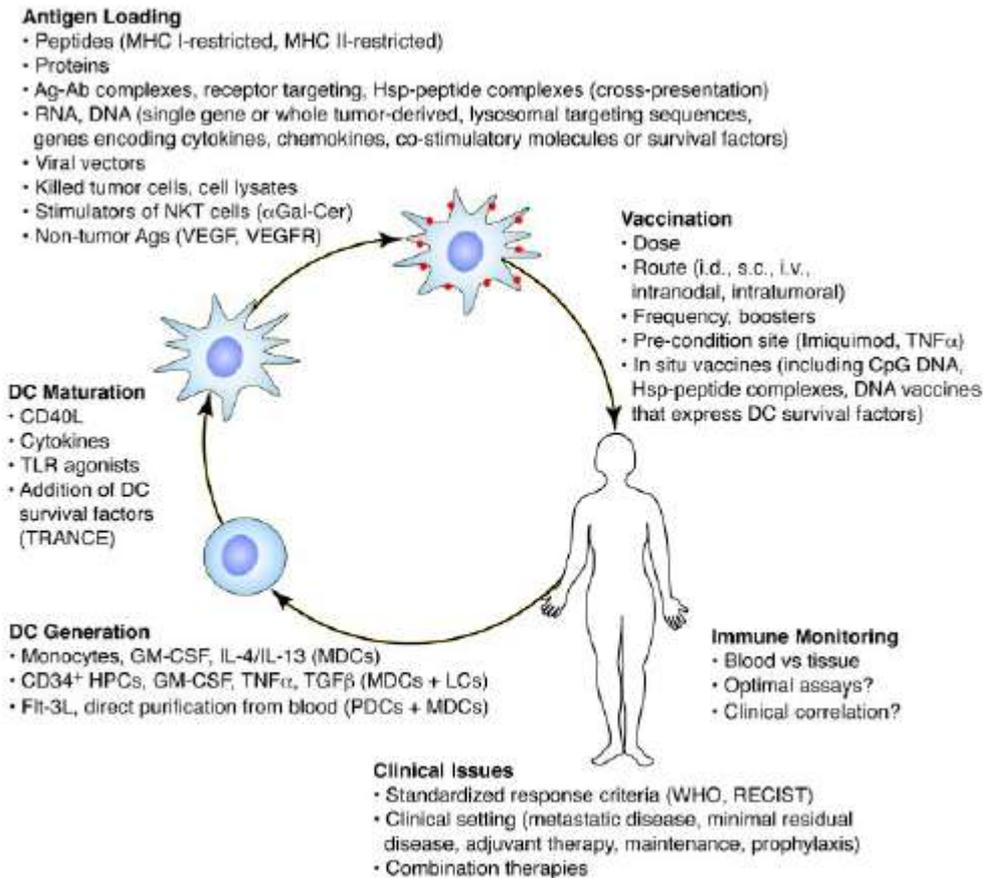


Figure 18: Les DC et la vaccination anti-tumorale. (D'après O'Neill D. et al. 2004).

### II.3) Les DC et la vaccination anti-tumorale

L'innocuité de la vaccination par DC est clairement démontrée. Les effets indésirables observés peuvent être fièvre, réactions cutanées locales, vitiligo et se limitent le plus souvent à une toxicité de grade I-II sur l'échelle NCI (National Cancer Institute).

Du point de vue de la réponse anti-tumorale, les premiers essais rapportent des résultats tout à fait intéressants, avec des réponses cliniques même dans des stades avancés de la maladie. Le groupe de Schuler décrit par exemple des régressions de métastases chez 6 patients sur 11 atteints de mélanome métastatique de phase IV (Turner *et al.*, 1999). Dans le cadre du lymphome B, des réponses objectives sont observées chez 5 patients sur 16 traités (Nestle *et al.*, 1998).

Cependant, une étude met en évidence en 2003 les disparités entre les critères utilisés pour évaluer la réponse anti-tumorale chez les patients (Rosenberg et al., 2004). Ces auteurs montrent en effet que les réponses cliniques rapportées correspondent par exemple à "un arrêt de croissance de métastases", une "disparition des symptômes" ou "une réponse mesurable dans une lésion quelconque", des phénomènes qui peuvent se produire au cours de la progression tumorale. Ils analysent alors, selon des critères conventionnels (diminution de 50% de la somme des diamètres de toutes les lésions mesurables) 35 essais de vaccination par injection de peptides, de cellules tumorales ou de DC, portant sur 765 patients atteints de cancers métastatiques. Le taux de réponse globale obtenu est faible (3,8%), il atteint 7,1% après vaccination par DC.

Dernièrement, deux essais de phase III randomisés ont été rapportés. Le groupe de Schuler a comparé chez des patients atteints de mélanome de phase IV, le traitement par chimiothérapie (dacarbazine) et par DC dérivées de monocytes et chargées en antigènes de tumeur (Schadendorf *et al.*, 2006). Cette étude qui devait initialement démontrer dans cette application la supériorité du traitement par DC, a été arrêtée avant son terme, en raison d'une absence de bénéfice de la vaccination (3,8% de réponses objectives après traitement par DC contre 5,5% après chimiothérapie, chez respectivement 53 et 55 patients).

Une autre équipe a réalisé une comparaison DC *versus* placebo chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique réfractaire aux hormones (Small *et al.*, 2006). Les DC utilisées sont purifiées à partir de prélèvements sanguins et sont chargées avec l'antigène PAP (Prostatic Antigen Phosphatase) couplé au GM-CSF. Quarante-deux patients sont traités avec les DC et 45 reçoivent un placebo. Les auteurs n'observent aucune différence significative dans la progression tumorale. Par contre, la vaccination semble apporter un bénéfice sur la survie des patients (à 36 mois, la survie dans le bras DC est de 34% contre 11% dans le bras placebo).

Malgré des premiers résultats cliniques très encourageants, le bilan de ces années de vaccination par DC reste décevant. Aujourd'hui, l'efficacité clinique de la vaccination par DC et son indication dans le traitement du cancer ne sont donc pas encore formellement démontrées. Néanmoins, des réponses immunologiques de type CD4 ou CD8, ainsi que des phénomènes de "determinant spreading", i.e. l'émergence de nouvelles populations lymphocytaires, sont fréquemment observés (Banchereau *et al.*, 2005; Bedrosian *et al.*, 2003; Butterfield *et al.*, 2003a; Hersey *et al.*, 2004; Ribas *et al.*, 2004; Schuler-Thurner *et al.*, 2000; Wiernecky *et al.*, 2006). Ils témoignent de la mise en place et du maintien d'une réaction immunitaire. La vaccination par

DC génère donc bien une réponse immune. Cette dernière n'est toutefois pas suffisante pour provoquer le rejet de la tumeur.

Sans remettre en cause tout ce qui a été réalisé, une critique des protocoles d'immunothérapie est donc nécessaire. Le mode de préparation des DC, les méthodes de chargement en antigènes de tumeur, les conditions de maturation et les voies d'injection peuvent ainsi être discutées par rapport aux connaissances actuelles. En outre, il est clair que l'environnement tumoral présente d'importantes propriétés immunosuppressives qui doivent être prises en compte aujourd'hui lors de la vaccination par DC.

## II.4) Préparation des cellules dendritiques

La production de DC pour un usage clinique nécessite naturellement l'utilisation de réactifs de grade clinique ou GMP (Good Manufacturing Practice). Les protocoles de production doivent être standardisés et reproductibles. Comme ils sont généralement établis chez des donneurs sains, ils doivent être pensés pour être facilement transposables chez des patients. Dans leur grande majorité, les protocoles prévoient des injections de DC autologues, mais des vaccinations par DC allogéniques sont toutefois décrites (Trefzer *et al.*, 2005).

### II.4.a) Sous-populations de DC utilisées

Comme décrit en figure 19, 4 types de DC ont majoritairement été utilisés en immunothérapie anti-tumorale: les DC myéloïdes circulantes, les DC dérivées des précurseurs CD34+, de monocytes ou de cellules tumorales.

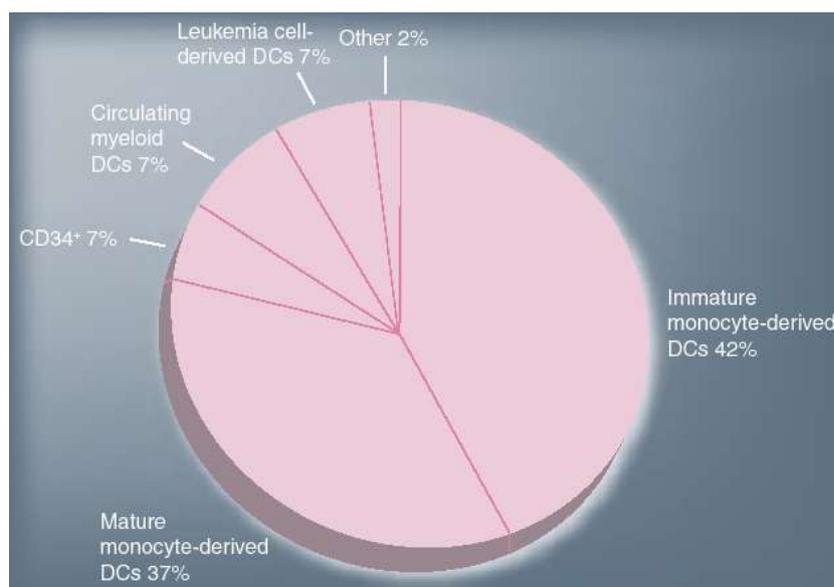


Figure 19 : Types de DC utilisés dans les essais cliniques (Simon et al ., 2009)

### α) DC circulantes isolées *in vivo*

En 1996, dans le premier essai d'immunothérapie avec DC, Hsu et collaborateurs isolent les cellules des patients par une série de centrifugations sur gradient de densité (Hsu *et al.*, 1996). Cette stratégie a permis d'obtenir des DC à l'heure où leur production *in vitro* n'était pas encore maîtrisée. Son désavantage est le faible nombre de DC obtenu ( $4,6 \cdot 10^6$  DC pour une cytophérèse de 2 volumes sanguins) même s'il peut être largement amplifié ( $271,2 \cdot 10^6$  DC) par l'utilisation de FLT3 ligand (Fong *et al.*, 2001a). Une étape de culture *in vitro* est de plus nécessaire pour la maturation de ces cellules. Malgré son utilisation par quelques équipes (Fong *et al.*, 2001a; Reichardt *et al.*, 1999; Small *et al.*, 2006), cette méthode reste aujourd'hui très marginale.

### β) DC dérivées des précurseurs CD34+

Les cellules CD34+ peuvent aussi être utilisées *in vitro* dans les protocoles cliniques (Banchereau *et al.*, 2005; Mackensen *et al.*, 2000). Ces précurseurs sont prélevés dans le sang des patients généralement après mobilisation avec du G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor). Ils sont alors cultivés pendant 2 semaines environ, en présence de GM-CSF et de TNF $\alpha$ ; et génèrent deux populations cellulaires différentes mais aux propriétés allostimulatrices équivalentes : une apparentée aux cellules de Langherans (avec expression de la langérine, de l'antigène Lag et des granules de Birbeck) et une apparentée aux DC interstitielles (Caux *et al.*, 1996). D'autres cytokines comme le FLT3 ligand ou le TGF $\beta$  peuvent être utilisées pour favoriser la prolifération des précurseurs ou orienter leur différenciation en cellules de Langherans (Strobl *et al.*, 1997).

### γ) DC dérivées des monocytes

Actuellement, c'est le mode de production de DC le plus répandu. C'est une stratégie relativement facile à mettre en œuvre et qui permet d'obtenir un grand nombre de cellules. Les monocytes représentent 5 à 15 % des cellules mononuclées du sang et peuvent être facilement purifiés par adhérence au plastique (Turner *et al.*, 1999), par élutriation (centrifugation à contre-courant) (Faradji *et al.*, 1994) ou par des systèmes de billes magnétiques (Babatz *et al.*, 2003).

L'adhérence au plastique est la technique la plus simple mais correspond en fait plus à un enrichissement cellulaire, avec des contaminations par des lymphocytes et un rendement relativement faible. Elle pose aussi des problèmes de standardisation, puisque le taux de pureté varie d'un donneur à l'autre. L'élutriation permet quant à elle d'obtenir de manière reproductible une population monocyttaire pure à 80% au moins, avec des rendements de 80% environ. Elle peut se faire en système clos (Berger *et al.*, 2005). Les DC obtenues à partir de monocytes purifiés par adhérence ou par élutriation présentent des capacités de maturation et des propriétés allostimulatrices équivalentes (Berger *et al.*, 2005). C'est donc sur des critères de pureté cellulaire, de rendement et de standardisation que se différencient ces deux techniques. Enfin, le tri magnétique peut être limité par des problèmes de rendements ou de pureté (Felzmann *et al.*, 2003). De plus, après purification positive, la présence de billes résiduelles à la surface des DC peut altérer leur comportement. Une inhibition de la sécrétion d'IL-12p70, en réponse au LPS, a notamment été rapportée (Elkord *et al.*, 2005).

Les monocytes purifiés sont ensuite cultivés 5 à 7 jours en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Sallusto et Lanzavecchia, 1994) (la combinaison la plus couramment utilisée), de GM-CSF et d'IL-13 (Goxe *et al.*, 1998) ou de GM-CSF et d'IL-15 (Mohamadzadeh *et al.*, 2001). Ils se différencient alors en DC de phénotype immature, avec une faible expression des molécules de costimulation et d'importantes capacités d'internalisation des antigènes. La culture des monocytes avec la combinaison IL-3 et IFN $\beta$  génère des DC matures avec expression de CD83 et sécrétion d'IL-12p70 et d'IFN $\alpha$  (Trakatelli *et al.*, 2006)

#### δ) DC dérivées de cellules tumorales

Dans le cadre de certaines hémopathies, ce sont les cellules tumorales elles-mêmes qui peuvent être à l'origine des DC. C'est le cas notamment pour la leucémie aiguë myéloblastique, pour laquelle les blastes tumoraux peuvent être différenciés en cellules de type dendritique en présence de GM-CSF et de TNF $\alpha$  (Claxton *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2001; Mohty *et al.*, 2002). Ces cellules ont la morphologie, les caractéristiques phénotypiques et d'activation des lymphocytes T similaires aux DC. Au cours de cette différenciation, l'expression des antigènes est maintenue. Il n'est donc pas nécessaire de réaliser un chargement en antigènes de tumeur.

Ces différentes sources cellulaires peuvent générer des lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux. Elles ont été testées chez des patients et des réponses cliniques ont pu être observées pour chacune d'elles. Il n'existe néanmoins pas de comparaison directe de leur efficacité.

#### *II.4.b) Maturation des DC dérivées de monocytes*

Les premiers essais cliniques ont été réalisés préférentiellement avec des DC immatures. Il faut attendre les années 2000 pour que soit établie la supériorité des DC matures pour l'induction d'une réponse anti-tumorale. Une première comparaison *in vitro* montre que l'activation et la polarisation des lymphocytes T CD4 dépend de l'état de maturation des DC (Jonuleit *et al.*, 2000). Une étude est ensuite menée chez des patients atteints de mélanome. Chaque patient est vacciné avec les deux types de DC (immatures et matures) mais chargées par différents antigènes. Les auteurs observent alors la supériorité des DC matures pour générer des réponses T CD4 et CD8 (Jonuleit *et al.*, 2001). D'autres travaux viennent confirmer ces résultats (de Vries *et al.*, 2003b; Dhodapkar *et al.*, 2001; Dhodapkar *et al.*, 1999), puis une analyse, compilant 10 essais cliniques, montre que les réponses associées à la vaccination sont corrélées à l'injection de DC matures (McIlroy et Gregoire, 2003).

Beaucoup de molécules sont capables d'activer des DC, mais toutes ne sont pas disponibles en grade clinique. L'un des premiers agents de maturation décrit est le MCM (Monocyte-Conditioned Medium), obtenu par culture de monocytes sur des immunoglobulines immobilisées (Reddy *et al.*, 1997). Il a été utilisé dans le cadre de vaccination contre le mélanome (Turner *et al.*, 1999), mais pose clairement des problèmes de standardisation. En outre, la maturation observée pourrait dépendre de la présence de LPS dans le milieu de culture utilisé pour générer le MCM (Nersting *et al.*, 2003). Un cocktail de maturation, composé de cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) et de PGE2, a donc été développé à partir du MCM (Jonuleit *et al.*, 1997). Il assure une maturation irréversible des DC et leur confère, grâce au PGE2, des propriétés migratoires ainsi qu'une résistance à l'apoptose. Ce cocktail ne permet pas la sécrétion d'IL-12p70, mais assure quand même une réponse de type Th1 (Lee *et al.*, 2002a; Schuler-Turner *et al.*, 2002). Cependant, il a été montré récemment que la molécule PGE2 pouvait induire l'expression de la molécule tolérogène IDO. Un second signal comme le TNF $\alpha$  peut

ensuite activer fonctionnellement cette enzyme (Braun *et al.*, 2005). Cet élément doit donc être considéré dans les protocoles d'immunothérapie.

D'autres agents de maturation sont disponibles pour un usage clinique, notamment le CD40L (Schlienger *et al.*, 2003), qui favoriserait la présentation croisée (Delamarre *et al.*, 2003), ou des ligands des TLR (Figure 20). La stimulation des DC par des ligands des TLR induit une maturation phénotypique et s'accompagne d'une sécrétion de cytokines dont l'IL-12p70. Des combinaisons de ligands de TLR et de cytokines sont aussi disponibles. C'est le cas par exemple pour la combinaison IFN $\gamma$ +ribomunyl (ligand du TLR4 composé de fractions membranaires et ribosomales de différentes souches bactériennes) (Boccaccio *et al.*, 2002), qui favorise la sécrétion d'IL-12p70 *via* l'IFN $\gamma$ , ou la combinaison TNF $\alpha$ +poly IC (un ARN double brin synthétique se fixant sur le TLR3) (Spisek *et al.*, 2001). Néanmoins, les ligands des TLR restent actuellement encore peu utilisés dans les protocoles cliniques.

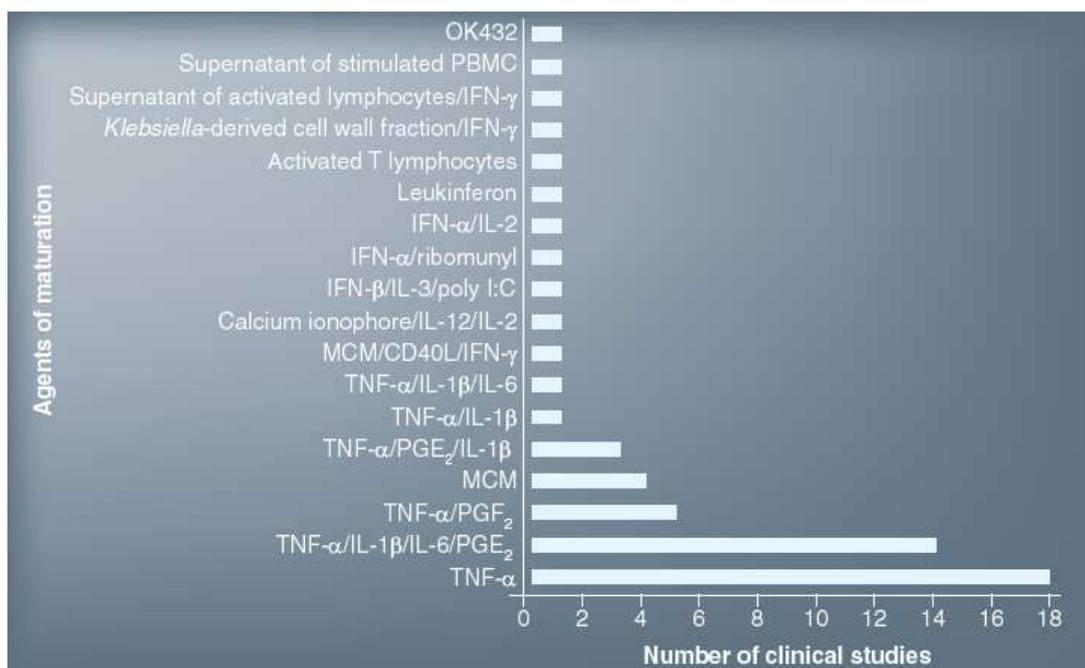


Figure 20 : **Agents utilisés pour la maturation des DC dérivées de monocytes en essais cliniques** (Simon et al., 2009)

La production de cytokines peut être transitoire et limitée aux premières heures de la maturation (Langenkamp *et al.*, 2002). En particulier, la sécrétion d'IL-12p70 s'arrête après 18h. A ce stade tardif de la maturation, les DC sont qualifiées d'"exhausted", puisqu'elles ne sont plus capables de sécréter de cytokines. Elles favorisent des réponses Th2 ou non polarisées. Il est démontré qu'une exposition très brève (jusqu'à 15 minutes) suffit à engager le processus de

maturation. Celui-ci se poursuit alors après que les stimuli de maturation aient été retirés (Spisek *et al.*, 2003). Les DC obtenues présentent donc un phénotype caractéristique de cellules matures. Cependant, elles restent capables de répondre à un deuxième signal de type T (CD40L et IFN $\gamma$ ), par une sécrétion d'IL-12p70 d'autant plus forte que la première exposition aux agents de maturation a été courte.

En extrapolant ces résultats à la vaccination, l'injection de DC après un temps court de maturation devrait donc être favorable. En effet, ces cellules pourraient poursuivre leur maturation *in vivo*, migrer vers les ganglions lymphatiques et sécréter de l'IL-12p70 au contact des lymphocytes T, générant ainsi une réponse de type Th1. Des travaux chez la souris démontrent d'ailleurs la supériorité des DC stimulées pendant un temps court (3h à 8h) dans le rejet tumoral (Camporeale *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2003). Dans les protocoles de production pour un usage clinique, les DC sont classiquement exposées 24h au moins aux agents de maturation. Il semble favorable aujourd'hui de diminuer la durée de cette exposition.

#### *II.4.c) Chargement des DC*

Le chargement des DC peut se faire de manière physiologique, en exploitant par exemple les capacités d'internalisation des DC, ou artificiellement par des techniques d'électroporation ou de fusion. Dans l'idéal, le chargement des cellules doit permettre la présentation des antigènes par les molécules du CMH-I et II, sans perturber le processus de maturation.

##### $\alpha$ ) Peptides

Ce mode de chargement est largement utilisé dans les essais cliniques, avec principalement des peptides restreints au CMH de classe I (Banchereau *et al.*, 2001; Butterfield *et al.*, 2006; Mackensen *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 1996; Nestle *et al.*, 1998; Schuler-Thurner *et al.*, 2000). Les peptides utilisés dérivent d'antigènes et comptent 9 à 11 acides aminés. Cette stratégie est relativement simple à mettre en place et à évaluer. Elle a permis de démontrer le "proof of concept" de l'immunothérapie à base de DC. Cependant elle présente des limitations évidentes. Elle nécessite l'identification et la caractérisation préalable des épitopes tumoraux. De plus, la restriction antigénique fait qu'elle ne s'applique qu'aux patients d'un haplotype HLA donné. La stabilité du complexe CMH-peptide après chargement est aussi problématique. Les peptides synthétiques, même issus d'épitopes immunodominants, peuvent avoir une faible

affinité pour les molécules du CMH, réduisant ainsi leur immunogénicité. Une modification au niveau des résidus d'ancrage permet d'améliorer cette affinité et favorise l'amplification des lymphocytes T (Slansky *et al.*, 2000). Toutefois, il est possible que, parmi les lymphocytes ainsi générés, une forte proportion manifeste peu ou pas d'activité cytotoxique envers les cellules tumorales (Stuge *et al.*, 2004).

Les protocoles cliniques s'orientent actuellement vers le chargement des DC avec plusieurs peptides. Cela permet en effet de limiter l'échappement tumoral face à une réponse lymphocytaire dirigée contre un unique antigène. L'équipe de Banchereau a publié un essai de vaccination avec des DC chargées par 4 peptides (issus des antigènes MelanA/MART-1, tyrosinase, MAGE-3, et gp100) chez des patients atteints de mélanome. Parmi 7 patients avec une réponse contre 2 antigènes au plus, 6 avaient une progression tumorale. Concernant les patients avec une réponse dirigée contre au moins 2 antigènes, seul 1 sur 10 présentait une progression tumorale (Banchereau *et al.*, 2001).

Jusqu'à présent, les protocoles cliniques utilisent généralement la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanine) pour stimuler la voie "helper". Des épitopes restreints au CMH de classe II sont aujourd'hui caractérisés. Des peptides sont ainsi disponibles pour le chargement des DC. Ils sont de longueur variable (10 à 20 acides aminés environ) et peuvent être pris en charge par différents haplotypes, ce qui a pour avantage d'augmenter la proportion de patients éligibles pour l'immunothérapie (Schultz *et al.*, 2004).

Il est par conséquent pertinent d'utiliser une combinaison de plusieurs peptides, capables d'être chargés par les deux classes de molécules du CMH, afin de générer à la fois des réponses T CD4 et CD8 après vaccination. Dans cette perspective, l'utilisation de peptides élués à partir des cellules tumorales est une option intéressante (Delluc *et al.*, 2005; Liau *et al.*, 2005; Ritchie *et al.*, 2006).

## β) Cellules mortes

Cette stratégie repose sur les propriétés physiologiques d'internalisation des DC. L'utilisation de cellules tumorales mortes (apoptotiques ou nécrotiques) présente plusieurs avantages. Il n'est pas nécessaire d'identifier et de caractériser les antigènes exprimés par la tumeur. Grâce à la phagocytose, les peptides antigéniques ont accès aux voies de présentation du CMH de classe I (par présentation croisée) et du CMH de classe II, permettant le développement

d'une réponse immune diversifiée, impliquant à la fois des lymphocytes T CD4 et CD8 et favorisant une réaction contre les tumeurs faiblement immunogènes.

La pertinence de cette approche a été largement démontrée dans des expériences *in vitro* (Berard *et al.*, 2000; Jenne *et al.*, 2000; Schnurr *et al.*, 2001; Spisek *et al.*, 2002) ou chez l'animal (Fields *et al.*, 1998; Goldszmid *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 1999; Masse *et al.*, 2002), avant d'être investiguée dans des essais cliniques concernant diverses tumeurs comme le mélanome (Maier *et al.*, 2003; Nestle *et al.*, 1998; Salcedo *et al.*, 2006), le carcinome rénal (Gitlitz *et al.*, 2003; Holtl *et al.*, 2002), le carcinome hépatocellulaire (Lee *et al.*, 2005) ou le gliome (Yu *et al.*, 2004).

### γ) Protéines

Les DC sont capables d'internaliser des protéines solubles puis de présenter les épitopes générés sur les deux classes des molécules du CMH. Dans la pratique, ce mode de chargement s'avère cependant peu efficace. La présentation des antigènes peut être améliorée avec l'utilisation d'adjuvants comme ISCOMATRIX (Maraskovsky *et al.*, 2004). Les protéines peuvent aussi être ciblées *via* la formation de complexes immuns reconnus par les récepteurs Fc des DC (Nagata *et al.*, 2002; Regnault *et al.*, 1999), ou *via* des récepteurs d'endocytose comme DEC-205 (Bonifaz *et al.*, 2002), DC-SIGN (Engering *et al.*, 2002), Lox-1 (Delneste *et al.*, 2002) ou MMR (Ramakrishna *et al.*, 2004).

### δ) ADN-ARN

L'utilisation d'ADN permet le chargement des DC et la présentation des antigènes tumoraux sur les molécules du CMH de classe I ou II, sans avoir à connaître l'haplotype du patient. De plus, les réponses générées peuvent être soutenues par la co-transfection des antigènes tumoraux avec des gènes codant pour des molécules de costimulation ou des cytokines (Agadjanyan *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1997; Tuting *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2003).

L'utilisation de vecteurs viraux assure la transfection des DC avec une bonne efficacité (supérieure à 90%) (Jenne *et al.*, 2001). Deux essais cliniques utilisent cette stratégie, avec induction de réponses immunes (Di Nicola *et al.*, 2004; Morse *et al.*, 2005). Elle peut néanmoins être limitée par d'éventuelles perturbations de la physiologie des DC après l'infection et par le déclenchement de réponses dirigées contre les antigènes viraux. D'autres stratégies de

transfection non virale sont disponibles, comme la lipofection, l'électroporation, la précipitation au calcium, le système "gene gun" ou l'utilisation de microparticules phagocytibles, mais avec une efficacité généralement moindre (Jenne *et al.*, 2001; Jilek *et al.*, 2005; Larregina *et al.*, 2004).

La transfection des DC avec de l'ARN présente différents avantages. L'ARN codant pour une séquence donnée est facile à produire. Il peut aussi être isolé à partir d'un petit fragment tumoral, puis amplifié grâce aux techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction). La quantité de matériel disponible est ainsi potentiellement infinie. De plus, il n'y a pas d'intégration possible du transgène dans le génome des cellules transfectées. La transfection passive des DC (par simple incubation avec l'ARN) est possible (Gilboa et Vieweg, 2004). Elle a d'ailleurs été utilisée en phase clinique (Heiser *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2003). Mais des techniques de lipofection et d'électroporation ont par la suite été développées pour améliorer l'efficacité de transfection (Gilboa et Vieweg, 2004).

#### ε) Fusion

Cette technique consiste à fusionner les DC avec les cellules tumorales par traitements électrique, chimique avec du Poly-Ethylène Glycol (Lindner et Schirmacher, 2002), ou après transfection des cellules tumorales avec le gène codant pour la protéine virale FMG (Fusogenic Membran Glycoprotein) (Phan *et al.*, 2003). Les cellules obtenues possèdent alors les capacités de présentation et d'activation des DC et l'expression des antigènes tumoraux. Depuis l'essai controversé de Kugler dans le carcinome rénal (Kugler *et al.*, 2000), cette stratégie a été reprise dans plusieurs protocoles cliniques (Avigan *et al.*, 2004; Trefzer *et al.*, 2004), avec induction de réponses immunologiques et cliniques. Toutefois, cette approche semble encore limitée par sa complexité, la difficulté pour distinguer les fusions vraies des agrégations et par l'efficacité même de la fusion. Par exemple, dans un essai mené chez des patients atteints de cancer du rein ou du sein, le pourcentage moyen de cellules présentant à la fois les marqueurs tumoraux et de DC n'est que de 45% (Avigan *et al.*, 2004).

#### II.4.d) Posologie et site d'injection

Les essais de vaccination mettent en évidence une très grande hétérogénéité concernant la quantité de DC à injecter, ainsi que la fréquence et le nombre d'injections (Figdor *et al.*, 2004).

Dans la vaccination contre les agents infectieux, le priming des lymphocytes T est généralement suivi d'un rappel après 4 à 6 semaines (Zinkernagel, 2003), mais ces règles ne sont pas forcément applicables à une pathologie chronique comme le cancer. Dans l'immunothérapie du cancer, les vaccinations, entre 3 et 6 généralement, sont hebdomadaires, bihebdomadaires ou mensuelles. L'objectif étant de rapprocher les vaccinations pour favoriser l'expansion des lymphocytes T, tout en évitant la lyse des DC par les lymphocytes générés, si les vaccinations sont trop fréquentes (Schuler *et al.*, 2003). Le nombre de DC injectées varie énormément selon les sites d'injection et selon les essais (de  $10^5$  à  $200.10^6$  cellules). Les adjuvants fréquemment utilisés sont la KLH ou la toxine tétanique. Ils permettent de contrôler l'immunogénicité des DC préparées et procurent un effet "helper" pour l'induction de lymphocytes T cytotoxiques. Ils peuvent cependant créer une compétition antigénique avec les antigènes spécifiques de tumeurs.

Les DC peuvent être injectées selon différentes voies : intraveineuse, cutanée, ou lymphatique. La voie intraveineuse est intéressante, du fait de son accessibilité et de la possibilité d'injecter un grand nombre de DC, mais peut donner lieu à des réponses non polarisées (Fong *et al.*, 2001b). L'injection cutanée (intradermique ou sous-cutanée) est largement utilisée dans les protocoles cliniques. Son inconvénient majeur réside dans la faible proportion de DC migrant jusqu'aux ganglions lymphatiques. En effet, moins de 5% des DC, pourtant activées en présence de PGE2 et exprimant la molécule CCR7, atteignent les ganglions (De Vries *et al.*, 2003a). Des expériences menées chez la souris montrent que l'induction de réponses T est corrélée à la quantité de DC atteignant les ganglions (MartIn-Fontecha *et al.*, 2003). La migration des DC injectée selon cette voie est donc vraisemblablement un facteur limitant de la vaccination. Le prétraitement des sites d'injection avec du TNF $\alpha$  favorise l'expression du ligand CCL21 et permet d'améliorer la migration des DC (MartIn-Fontecha *et al.*, 2003). Cette stratégie n'a pas encore été investiguée chez l'homme.

Une approche alternative est l'injection des cellules au sein même des ganglions. Les DC sont alors immédiatement en contact avec les lymphocytes T. Cette voie est donc particulièrement intéressante dans le cas de vaccination par DC chargées avec peptides. Les DC peuvent ensuite migrer vers un ganglion voisin *via* les vaisseaux lymphatiques. Mais les difficultés de cette technique sont importantes. En effet, des analyses d'imagerie par résonance magnétique révèlent une injection intra-ganglionnaire dans 50% des cas seulement (de Vries *et al.*, 2005). Il est possible aussi que l'injection désorganise l'architecture ganglionnaire. Un accès

plus physiologique dans le ganglion *via* un vaisseau lymphatique afférent peut être envisagé, mais reste aussi très complexe à mettre en place.

Même si la voie intraveineuse peut se révéler moins efficace que les voies cutanée ou lymphatique pour l'induction de réponses T (Bedrosian *et al.*, 2003; Butterfield *et al.*, 2003a), il n'existe pas actuellement de réel consensus sur le meilleur site d'administration. En fait, celui-ci peut sans doute être choisi en fonction de la localisation de la tumeur. Un travail réalisé dans un modèle murin montre en effet que la distribution des DC détermine la localisation des réponses lymphocytaires, ainsi que le rejet des tumeurs. Une vaccination par voie intraveineuse assure le rejet de tumeurs pulmonaires, mais n'offre aucune protection contre des lésions sous-cutanées (Mullins *et al.*, 2003). Les voies d'injection pourraient donc être déterminées en fonction des sites tumoraux du patient, afin d'induire une réponse globale, capable d'éliminer l'ensemble des cellules tumorales quelle que soit leur localisation

L'ensemble de ces données montre la très grande diversité dans les protocoles de vaccination anti-tumorale par DC. Si certains paramètres font l'objet de consensus (utilisation de DC matures par exemple), il reste difficile de privilégier une méthode de production à une autre. L'expérience des premiers essais montre néanmoins la nécessité d'améliorer la standardisation et le contrôle qualité des vaccins (Figdor *et al.*, 2004). Des critères de qualité peuvent alors être proposés (figure 21), l'objectif étant d'atteindre ces critères avec le mode de production choisi.

<b>Release criteria:</b>	
<b>Microbiological controls</b>	Negative for bacterial and fungal contamination
<b>Purity:</b>	>80% as determined by flow cytometry, light scatter or staining with non-DC lineage markers.
<b>Morphology:</b>	Immature: loosely adherent, floating, roundish cells with some extensions Mature: loosely attached, veiled and clustered cells
<b>Phenotype:</b>	Monocyte-derived: Immature: CD14 <sup>-lo</sup> CD83 <sup>-</sup> CD80 <sup>-lo</sup> CD86 <sup>lo</sup> MHC class I <sup>+</sup> MHC class II <sup>+</sup> CCR5 <sup>+</sup> Mature: CD83 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> MHC class I <sup>+</sup> MHC class II <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> cell-derived: Interstitial: CD14 <sup>+</sup> CD1a <sup>+/-</sup> CD83 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> MHC class I <sup>+</sup> MHC class II <sup>+</sup> Langerhans cells: CD14 <sup>-</sup> CD1a <sup>+</sup> CD83 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> MHC class I <sup>+</sup> MHC class II <sup>+</sup>
<b>Viability:</b>	>70% as determined by Trypan blue exclusion
<b>Optional validation criteria:</b>	
<b>Stability of DC phenotype</b>	Determined after one and two days of subsequent culture in medium either without or with cytokines 'Washout test': DCs must remain viable and maintain their characteristic morphology and phenotype over two days in medium without cytokines (characteristic of fully mature and stable DCs)
<b>Induction of immune response:</b>	Mixed lymphocyte reaction: T-cell proliferation at DC/PBMC (peripheral blood mononuclear cell) ratio of 1:20 in at least one donor Recognition of loaded antigen by T cells, as determined by cytotoxicity assay or cytokine production (especially important when antigen is loaded before freezing)
<b>Antigen-loaded state</b>	(Only possible when DCs are loaded with well-defined antigens, such as peptides, proteins or RNA) Antigen-specific stimulation assay: tests ability of antigen-loaded DCs to stimulate antigen-specific T cells (from T-cell lines or reporter cell lines transfected with T-cell receptor and reporter constructs)

Figure 21: Critères de qualité des vaccins à base de DC (Figdor C.G. et al. 2004).

# ***RESULTATS***

# RESULTATS

## I) Production de DC pour un usage clinique

### I.1) Introduction

La production de larges quantités de DC à partir de monocytes ou de cellule CD34+ a rendu possible leur utilisation en immunothérapie du cancer. Les différents paramètres impliqués dans la production de ces cellules comme le mode de culture (flasque ou poche), les cytokines et agents de maturation utilisés ou le processus de chargement sont largement décrits. En revanche, l'impact du milieu de culture sur la génération et la maturation des DC reste peu étudié. Si les premiers essais de vaccination sont réalisés indifféremment avec des DC immatures ou matures, il est maintenant clairement établi que l'état de maturation des DC détermine l'issue de la vaccination. Le choix du milieu est donc un paramètre important de la production des DC pour un usage clinique.

De nombreux milieux existent pour la culture des cellules hématopoïétiques ou celle des DC. Nous les avons testés et évalués, en fonction de leur capacité à générer des DC et à permettre leur maturation phénotypique et fonctionnelle. Nos résultats montrent que la production des DC est possible quel que soit le milieu utilisé, avec des rendements de culture comparables. Cependant, d'importantes différences, concernant la maturation des DC, peuvent être observées selon le milieu, ou entre différents lots d'un même milieu. Nous avons donc investigué l'influence de la supplémentation (sérum de veau, sérum humain, plasma autologue et albumine humaine) sur la culture des DC. Nous montrons que la production de DC est possible en milieu RPMI supplémenté par de l'albumine humaine. Cette combinaison assure le meilleur compromis entre efficacité de maturation et impératifs de standardisation et de sécurité sanitaire.

### I.2) Article

# Culture Medium and Protein Supplementation in the Generation and Maturation of Dendritic Cells

P.-J. Royer, S. Tanguy-Royer, F. Ebstein, C. Sapede, T. Simon, I. Barbieux, R. Oger & M. Gregoire

INSERM U601, Institut de Biologie, Nantes, France

Received 10 August 2005; Accepted in revised form 9 March 2006

Correspondence to: Dr M. Gregoire, INSERM U601, Institut de Biologie, 44093 Nantes Cedex 01, France. E-mail: marcgregoire@nantes.inserm.fr

## Abstract

Dendritic cells (DC) are powerful antigen-presenting cells that have drawn many attentions due to the recent development of anti-cancer vaccines. Clinical grade production of monocyte-derived DC (Mo-DC) is extensively studied, and many efforts are made to develop and improve clinical standard operating procedures. Most of the parameters involved, such as the cytokines and maturation agents, have been widely assessed. However, very few are investigated about how culture medium and additional protein components affect DC yield, viability and maturation. Thus, our study aimed to compare the impact of standard culture medium on Mo-DC differentiation and maturation. Commercially available media for hematopoietic cell culture as well as different protein supplementations, that is foetal calf serum (FCS), autologous plasma (AP), human serum (HS) and human serum albumin (HSA) were tested. Culture yields, cell viability and DC maturation were investigated. Differentiation yields were similar between the conditions used. However, we evidenced significant differences in terms of cytotoxicity and DC maturation (phenotypic and functional). This underscores the importance of defining culture medium composition in clinical standard operating procedures to insure quality control, and also when preparing DC for experimental uses.

## Introduction

Active immunotherapy with dendritic cells [1] can be used to induce antitumour immunological responses and as such, offers an attractive alternative to conventional cancer treatments [2]. The recent development of methods for large-scale *ex vivo* production of dendritic cells (DC) from peripheral blood monocytes [3, 4] has widely contributed to their growing use in cancer vaccination trials. However, although objective clinical responses have been observed [5], so far treatment results have proved to be somewhat disappointing compared with those obtained *in vitro* and in animal models. Yet, these relative failures must be re-interpreted in light of current data and particularly those concerning DC maturation status. Indeed, first clinical trials used either immature or mature DC (iDC, mDC) while nowadays, mDC injection is favoured for cancer immunotherapy. Besides, clinical DC were commonly prepared in medium from different origin with variable Annex Therapeutic Products [6]. Thus, detailed analyses must be carried out to improve the production procedures for DC in clinical trials [6–8]. Moreover, it is admitted that efforts have to be made to standardize DC production protocols. Thus, precursor cells [9–11], cytokines,

maturation-inducing agents [3, 12, 13] or antigen-loading processes (peptides, lysates, apoptotic cells) [14–17] used to generate DC for immunotherapy have been extensively studied and tested prior to their use in clinical protocols. Contrastingly, very few comparative studies have been published regarding the impact of culture medium and components on DC culture. RPMI supplemented with foetal calf serum (FCS) is largely used in experimental applications, but other culture media were developed and validated for DC production. Recently, the generation of DC with different serum-free culture media was also reported. However, there were no comparative analyses concerning the impact of these commercially available media and their protein supplements on DC generation, maturation and functional activities. Our study aims to determine the involvement of these culture media and different protein supplementations on the feasibility of generating functional monocyte-derived DC (Mo-DC).

Monocytes from healthy donors were cultured in different culture media for 6 days with GM-CSF and IL-4. The iDC generated were phenotypically analysed and functionally compared for phagocytosis properties. Then, DC were treated with TNF and polyinosinic-polycytidylic acid

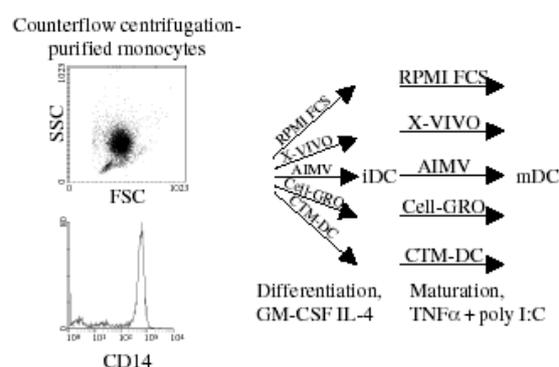
(poly I:C) to induce maturation. Yield, cell viability, maturation and the functional capacities of these mDC to activate T-cell populations were compared. Our results indicate that only depending on the culture medium or the protein adjuvant, DC have distinct viabilities, phenotypes and immune capacities. In our hands, optimal DC production in terms of maturation (phenotypic and functional), and quality control requirements were obtained with a protein-free culture medium (i.e. RPMI-1640) supplemented with HSA that must be tested before use. Thus, the present study highlights, for the first time, that the composition of the culture medium and particularly their protein supplementations are as important as other therapeutic products, such as cytokines and maturation agents and therefore must be taken into account, when establishing standard operating procedures for the generation of DC.

## Materials and methods

**Culture media.** The following culture media were tested: AIMV (Gibco BRL, Paisley, UK), CTM-DC (Mabio, Tourcoing, France), Cell-GRO DC medium (CellGenix, Freiburg, Germany), X-VIVO 15 (Biowhitaker, Walkersville, MD, USA) and RPMI (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). All media were supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine (all purchased from Life Technologies). FCS was purchased from Eurobio (Les Ulis, France) and HSA from Laboratoire Français de Fractionnement et de Biotechnologies (Les Ulis, France). Autologous plasma (AP) and human serum (HS) were produced locally in our laboratory. FCS, HS and AP were heat inactivated for 30 min at 56 °C.

**DC preparation.** Immature Mo-DC were generated from leukapheresis products of HLA-A\*0201 healthy donors. These products were collected from donors at Etablissement Français du Sang. After obtaining informed consent, peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll-Paque density gradient centrifugation (Amersham, Uppsala, Sweden). Monocytes were then enriched by elutriation (counterflow centrifugation) using a Beckman Avanti J20 centrifuge equipped with a JE5.0 rotor and a 5-ml elutriation chamber. Cells were centrifuged at 602 g with an increasing flow rate (20, 25 and 35 ml/min, respectively) to separate the different cell populations. Three 200-ml fractions were thus collected, the last of which was enriched in monocytes. Routinely, purity of elutriated monocytes was  $\geq 80\%$ , as assessed by flow cytometry based on the detection of the CD14 marker. Monocytes were washed in culture medium (Fig. 1) before they were seeded in 6-well plates at  $2 \times 10^6$  cells/ml with 500 IU/ml GM-CSF and 200 IU/ml IL-4 (AbCys SA, Paris, France). Cells were then allowed to differentiate for 6 days.

**Phagocytosis of apoptotic tumour cells.** Human melanoma BEU cells (kindly provided by Professor J.F. Doré, Lyon, France) were labelled with PKH-67 membrane dye



**Figure 1** Dendritic cells (DC) generation. Monocytes purification was analysed by flow cytometry, based on morphological properties and CD14 expression. Then, monocytes were cultured with GM-CSF and IL-4 in different media for DC generation. After 6 days, immature DC were activated with TNF $\alpha$  and poly I:C for 48 h.

(Sigma, St Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer protocol. Apoptosis of tumour cells was induced by 1-min exposure to UVB irradiations. After 48 h, cell death was assessed using FITC-labelled annexin V and staining with propidium iodide (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Apoptotic cells were harvested and cultured with iDC at 2:1 ratio. After 24 h, DC were labelled with PE-conjugated anti-CD86 monoclonal antibody (Immunotech, Villepinte, France), and phagocytosis was assessed by flow cytometry as the percentage of double-positive cells.

**DC maturation.** After 6 days, iDC were harvested and plated in 24-well plates in fresh medium supplemented with GM-CSF (500 IU/ml) and IL-4 (200 IU/ml) at  $10^6$  cells/ml. Plates were coated with poly(2-hydroxyethylmetacrylate) (Sigma) to prevent cell adhesion. Maturation was induced by an additional 48-h treatment with 20 ng/ml TNF $\alpha$  (AbCys SA) and 50  $\mu$ g/ml poly I:C (Sigma) as previously described [13].

**Flow cytometry.** FITC or PE-conjugated monoclonal antibodies directed against the following antigens were used for phenotypic analysis: CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC (Immunotech) and HLA-DR (Caltag, Burlingame, CA, USA). Isotype-matched antibodies were used as controls (Immunotech). Labelling was carried out at 4 °C for 30 min in RPMI with 10% FCS. Cells were washed twice in PBS and analysed on a FACScalibur cytometre using the CELL QUEST PRO software application. The DC population was gated based on its forward-scatter and side-scatter profile. Dead cells were stained with 1  $\mu$ M TO-PRO-3 iodide (Molecular Probes, Montluçon, France) and excluded from the analysis. Results are expressed as median fluorescence intensity (MFI).

**Cytokine detection.** Supernatants from 48-h DC cultures were collected and stored at  $-20$  °C until they were used for cytokine quantification. IL-12p70 and IL-10 productions were assessed by ELISA (BD Biosciences) according

to the manufacturer's instructions. All measures were performed in duplicate.

**Mixed leucocyte reaction.** Increasing amounts of iDC or mDC were cocultured with  $1 \times 10^5$  allogeneic CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, purified by RosetteSep<sup>TM</sup> (StemCell Technologies, Grenoble, France) according to manufacturer protocol. All cocultures were carried out in triplicate in U-bottomed 96-well plates, in a final volume of 200  $\mu$ l of AIMV medium. Proliferation of allogeneic T lymphocytes was determined 4 days later based on <sup>3</sup>H-thymidine uptake (1  $\mu$ Ci/well) during the last 18 h.

**Th1/Th2 polarization.** Allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells, purified by RosetteSep<sup>TM</sup>, were cultured for seven days with DC at 10:1 ratio. Then, T cells were stimulated with 15 ng/ml of phorbol 12-myristate acetate and 1  $\mu$ g/ml of calcium ionomycin (Sigma) for 6 h. The last 4 h, brefeldin A (10  $\mu$ g/ml, Sigma) was added, and the production of IL-4 and IFN $\gamma$  was detected by intracellular staining using anti-IL-4 PE and anti-IFN $\gamma$  FITC monodonal antibodies (BD Biosciences).

**Statistical analysis.** For statistical analysis, experiments were repeated with at least five donors, and statistical significance was assessed by the nonparametric Friedman test.

## Results

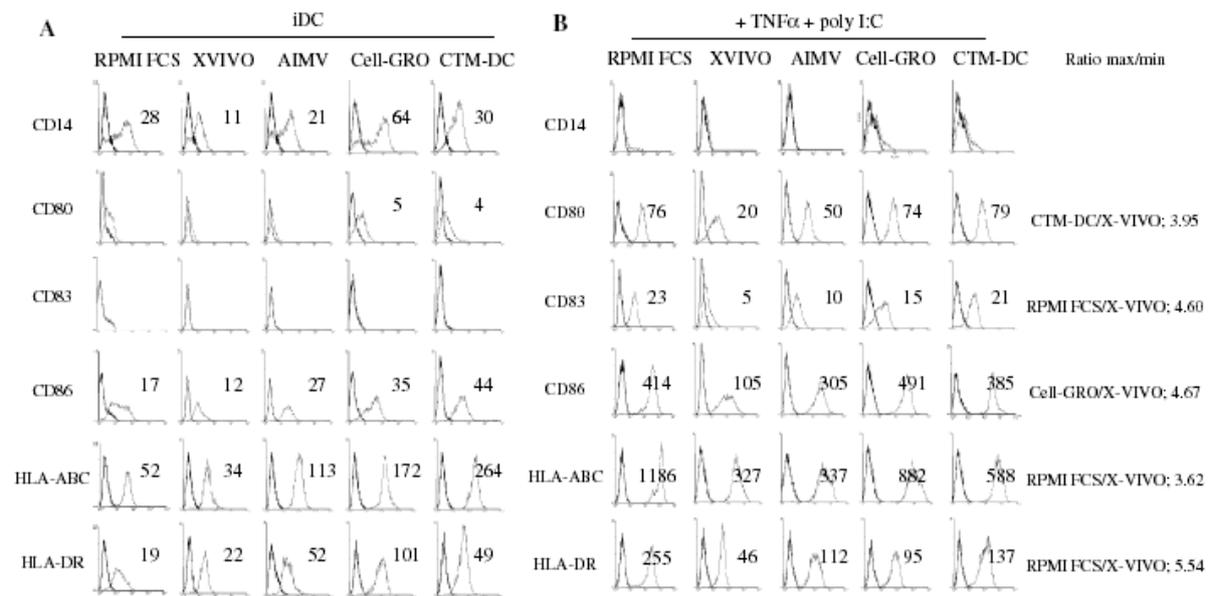
### Comparative effect of media on DC generation

For DC generation and maturation, four serum-free media developed for hematopoietic or DC culture, namely

X-VIVO 15, AIM-V, Cell-GRO CTM-DC and classical RPMI were compared (experimental procedure described in Fig. 1). After culture 6 days in the media with GM-CSF and IL-4, no significant differences between differentiation yields could be detected (not shown). Cell viability was quite homogeneous ( $\geq 75\%$ ), and the differentiation of monocytes into iDC was efficient as shown by the strong downregulation of CD14 expression (Fig. 2A). As expected, expression of CD83 was not detected on membrane surface of the iDC, whereas the costimulatory molecules CD80 and CD86 were weakly expressed (Fig. 2A). Yet, phenotypic differences were noted for iDC as shown for instance by the HLA-ABC expression after X-VIVO 15 (MFI = 34) or CTM-DC culture (MFI = 264) (ratio 7.8).

Phagocytotic process is an important tumour antigen-loading strategy available for clinical applications. As a specific parameter for the monitoring of *ex vivo* iDC, we noted that phagocytosis capacities were effective and similar, whatever the conditions and the culture medium used (data not shown), as assessed by apoptotic-labelled cell capture [13].

iDC were then treated, with the different media, by the TNF $\alpha$  and poly I:C combination for 48 h [13], and maturation was assessed by flow cytometry. As expected, we noticed the upregulation of CD80, CD83, CD86, CMH-I and CMH-II molecules which was accompanied by the loss of CD14 expression (Fig. 2A,B). Yield of mDC and cytotoxicity were equivalent according to the medium (not shown). However, flow cytometry analysis revealed that



**Figure 2** Comparative phenotypic analysis of immature dendritic cells (iDC) (A) and mature DC (mDC) (B) generated in different culture media. The phenotypic markers, CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC and HLA-DR were analysed by flow cytometry. DC were gated according to their morphological properties and viability (based on TO-PRO-3 iodide staining). Only viable cells were included in the final analysis. Thin lines represent specific expression of investigated molecules, and thick lines, isotype control staining. Median fluorescence intensity values are provided. One representative experiment of four is shown.

DC maturation was highly affected by the medium origin. For instance, membrane-specific markers, such as CD83, CD86 or HLA-DR, were four times higher for FCS-RPMI or Cell-GRO media, when compared with X-VIVO 15.

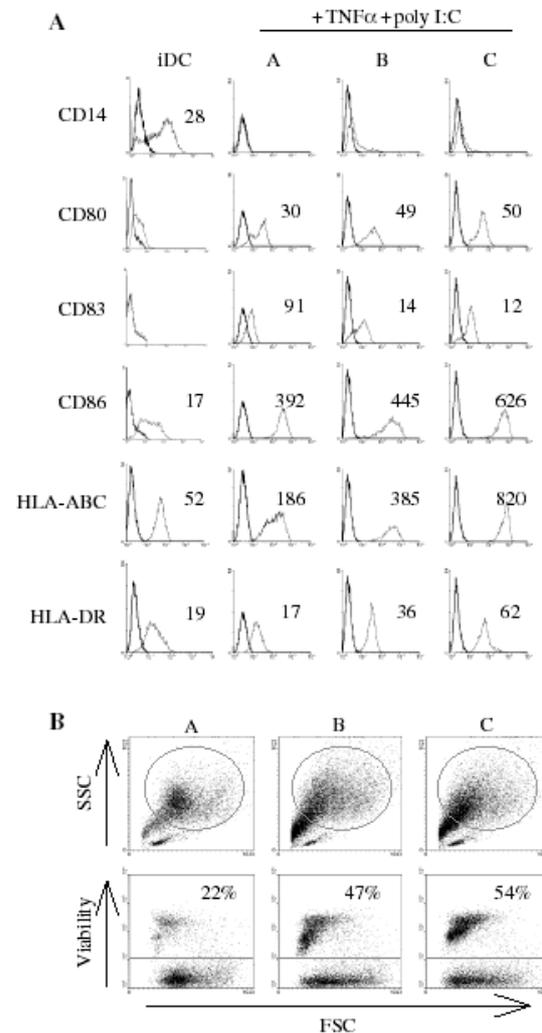
#### DC and batches of medium

Because DC maturation highly differed with the serum-free medium used, we made the assumption that protein component variations in these serum-free media could be responsible for the differences observed. Thus, we analysed DC production, according to medium batch and supplementation used. Culture media specifically designed for DC production contain a defined list of constituents (e.g. minerals, vitamins and amino acids). In addition, these media, which have been developed for use in serum-free culture conditions, contain protein constituents, that are subject to biological variability. Thus, we compared DC production and maturation with different batches of AIMV (labelled A, B and C). According to the manufacturer, composition of these medium batches differs due to HSA bulk. After 6 days of culture, iDC yields were quite similar, regardless of the batch of medium used (data not shown). As previously observed, CD14 expression was low in all tested cultures (Fig. 3A). Contrastingly, differences in the expression level of maturation markers, as costimulatory molecules (CD80, CD86), were observed between the batches tested. Moreover, expression levels of HLA-ABC and HLA-DR with batch C were, respectively, 4.4 and 3.6 times higher than that obtained with batch A. Surprisingly, the cell cytotoxicity drastically varied as a function of the batch used (Fig. 3B). For instance, with the same Mo-DC population (from the same donor) cytotoxicity concerned 22% cells when cultured in batch A medium, and 54% with batch C. These data highlight the impact of protein components in culture media as a major parameter for DC production and maturation.

#### Protein supplementation and DC maturation

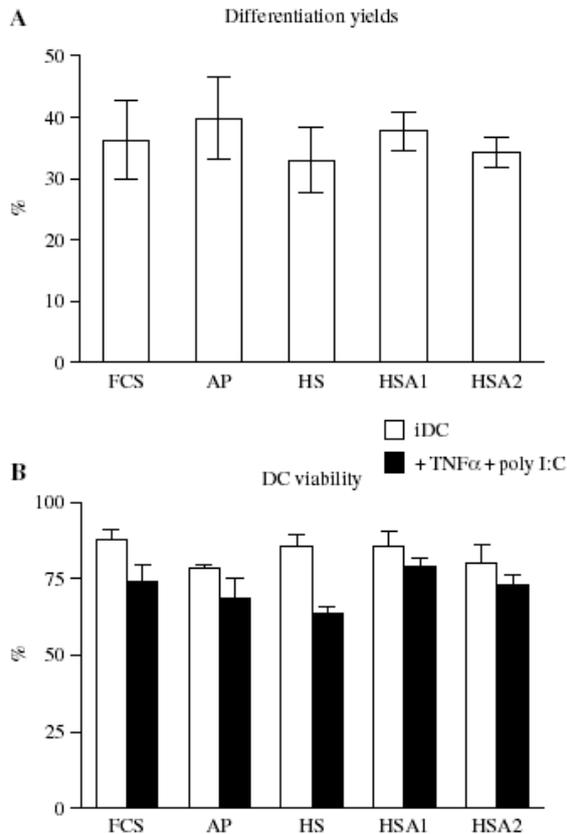
Except RPMI-1640, all the tested media are provided with protein components. Thus, we decided to carry on our investigations with RPMI medium to test several other sources of protein supplements to analyse supplementation influence and to replace advantageously FCS. The protein supplements tested included two HSA batches (HSA1 and HSA2), AP, HS and FCS, a component largely applied in clinical and experimental investigations. As shown in Fig. 4, differentiation yields as well as cell viability were quite homogeneous between the protein supplementations used. Phagocytosis, analysed in the immature state, was also effective, despite slight differences, whatever the protein supplementation employed (data not shown).

Then, we analysed the effect of these protein supplements on DC maturation. Phenotypic maturation of DC



**Figure 3** Analysis of mature dendritic cells (mDC) cultured in different batches of AIMV. DC cultured in three distinct batches of AIMV (batches A, B and C) were exposed to TNF $\alpha$  and poly I:C for 48 h and analysed for phenotypic properties and viability. (A) DC were gated according to morphological properties and only viable cells (based on TO-PRO-3 iodide staining) were included in the final analysis. Thin lines represent specific expression of the investigated molecules, and thick lines, isotype control staining. Profile of iDC is used as control. Median fluorescence intensity values are provided. (B) DC were gated according to their morphological properties, and viability (based on TO-PRO-3 iodide staining) was assessed.

was monitored by flow cytometry for the detection of the following cell surface markers; CD80, CD83, CD86, HLA-ABC and HLA-DR (Fig. 5). We noticed a significant difference in CD80 expression, between HSA1-supplemented RPMI (MFI =  $95.2 \pm 30.5$ ) and HS- and AP-supplemented RPMI (MFI =  $13.5 \pm 2.95$  and  $17.5 \pm 3.2$ , respectively). CD83 expression was also higher with HSA1 (MFI =  $15.3 \pm 3.0$ ) and FCS (MFI =  $18.2 \pm 4.1$ ) than with HS-supplemented RPMI (MFI =  $4.3 \pm 0.6$ ).



**Figure 4** Protein supplementation and dendritic cells (DC) generation. (A) Differentiation yields depending on the protein supplement used. Monocytes were cultured in RPMI supplemented with foetal calf serum (FCS), human serum (HS), autologous plasma (AP) or human serum albumin (HSA) (two batches were tested). Live immature DC (iDC), based on morphology and trypan blue exclusion, were numbered on day 6. Yields were calculated in relation to the number of cells seeded ( $n = 5$ ). (B) Immature and mature DC viability depending on the protein supplementation used. Viability was assessed by flow cytometry. Cells were gated according to their morphological properties, and TO-PRO-3 iodide staining was used to detect live cells ( $n = 5$ ).

Finally, HLA-ABC expression was stronger using FCS (MFI =  $750.4 \pm 315.9$ ) and HSA1- and HSA2-supplemented RPMI (MFI =  $619.4 \pm 145.5$  and MFI =  $603.4 \pm 147.2$ ) than with HS-supplemented RPMI (MFI =  $289.0 \pm 55.3$ ). Although not statistically different, CD86 and HLA-DR expressions were higher with FCS and HSA than with HS-supplemented RPMI. Thus, in terms of cell surface phenotype, DC maturation is affected by protein supplementation. In particular, HS supplementation appears to impede DC maturation.

#### Cytokine production

DC maturation is known to result in cytokine secretion, particularly IL-12p70 and IL-10, involved in T-cell

orientation towards Th1 or Th2 response. Cytokine secretion was investigated by ELISA quantification of IL-12p70 and IL-10. As expected, iDC produced very low levels of both cytokines ( $\leq 10$  pg/ml). In mDC, IL-12p70 secretion was significantly higher with FCS ( $401.9 \pm 108.2$  pg/ml) than with HS-supplemented RPMI ( $36.35 \pm 13.02$  pg/ml) (Fig. 6). Even not statistically significant, IL-12p70 secretion with HSA was constantly higher than with HS RPMI. IL-10 secretion was higher in FCS-RPMI (not statistically significant) and was homogeneous between the other media.

#### Functional capacities of the generated DC

We finally assessed the T-cell stimulatory capacities of produced DC by a mixed leucocyte reaction. DC prepared in RPMI with various protein supplements were incubated with allogeneic CD3<sup>+</sup> T lymphocytes for 4 days (Fig. 7). In correlation with phenotypic analysis, mDC produced in HS-supplemented RPMI appeared to be less potent stimulators of allogeneic T cells. Simultaneously, we analysed the culture conditions on the type of Th response generated. Purified CD4<sup>+</sup> T cells were cultured with DC, and Th1 or Th2 polarization was investigated by measuring IFN $\gamma$  or IL-4 production. All preparations preferentially induced a Th1 response, as evidenced by IFN $\gamma$  production (not shown).

#### Discussion

Early clinical trials have demonstrated that DC vaccines represent a promising approach to cancer treatments. Although it is assumed that DC can induce immune responses in some cancer patients, clinical results remain controversial [5]. As pointed out by Figdor and Colleagues [6], the use of DC-based vaccines in immunotherapy trials requires standardized production protocols and defined characterization of these standards. The clinical DC can be derived from multiple sources and distributed as various subsets or maturation stages, depending on the *ex vivo* protocols. Since about 10 years of these *in vitro* DC productions, most of the parameters for culture conditions were well studied and characterized. The impact of culture medium on DC generation has been tackled in some works. In 1998, Anton et al. [18] compared DC production in FCS or HS-supplemented medium, but without evaluating serum-free media. Also, Sorg et al. [19] have developed a closed system for DC production with a single medium, AP-supplemented X-VIVO 15. Recently, two works reported the comparison of cell media [20, 21]. Tkachenko et al. [20] analysed DC production with different protein supplements, then, Peng et al. [21] assessed the culture media and supplementation effect, but mainly on iDC generation. However, there is no global investigation about how culture medium and also additional

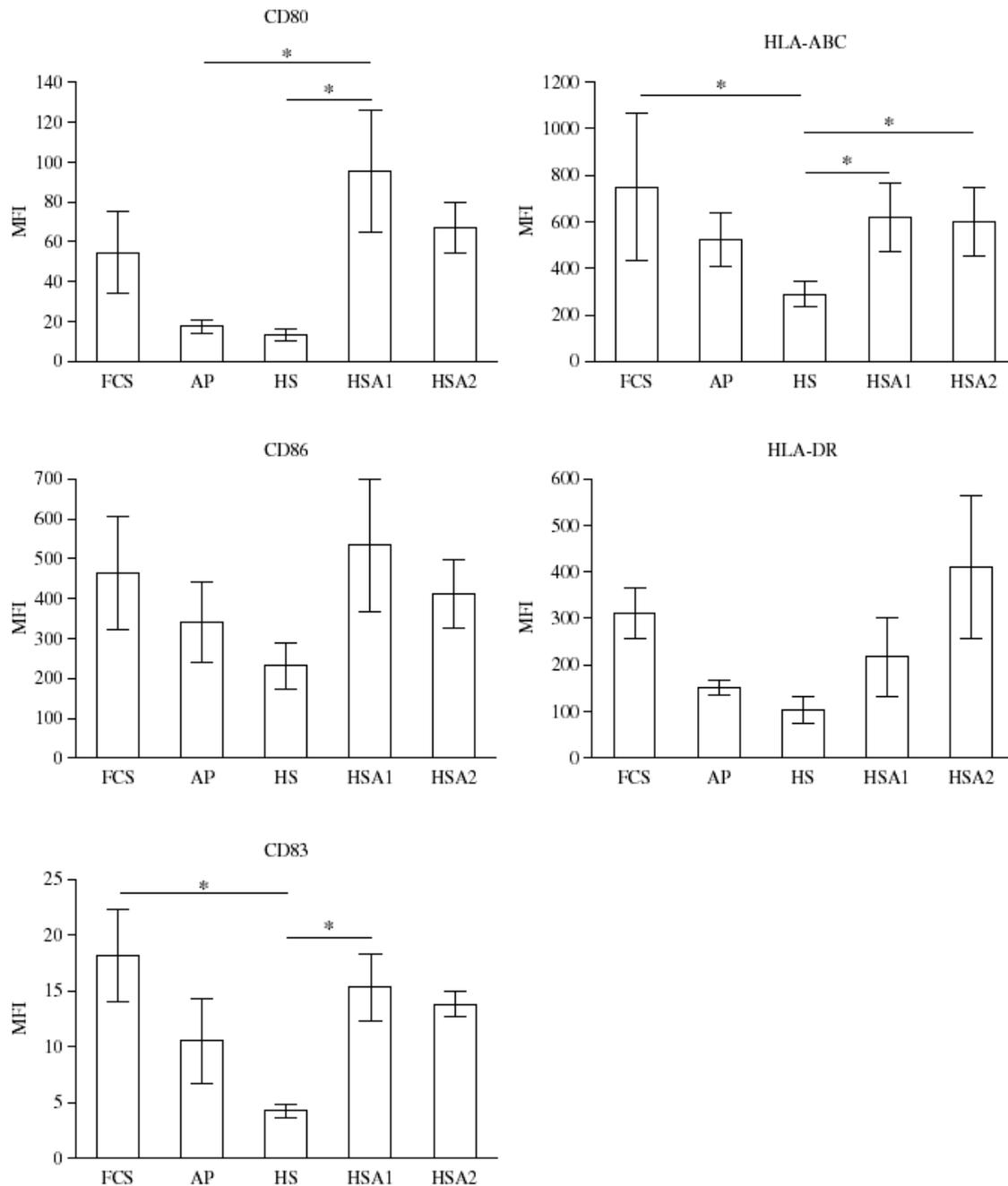
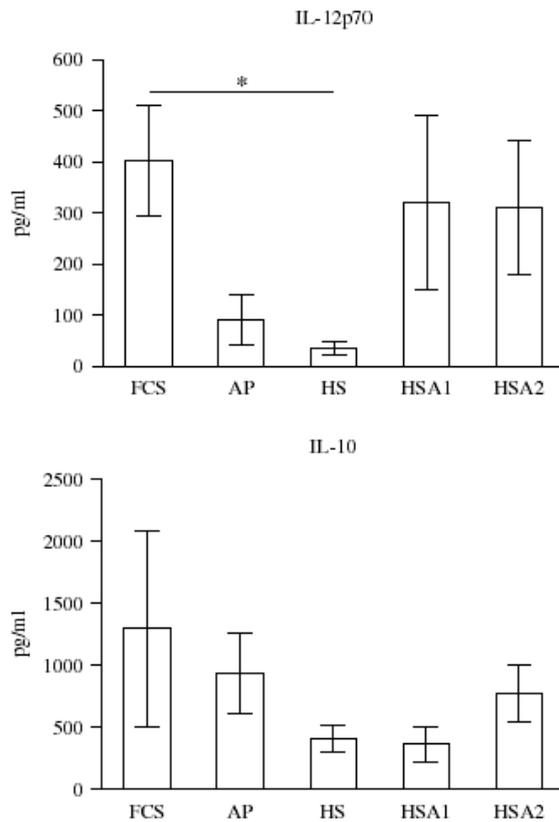


Figure 5 Phenotypic analysis of mature dendritic cells (mDC) cultured in RPMI with different protein supplementation. CD80, CD83, CD86, HLA-ABC and HLA-DR molecules were analysed. Results are expressed as median fluorescence intensity (MFI) ( $n = 5$ ). \* represents significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

protein components could affect DC yield, viability, maturation and functional properties. In the present work, we compared the effect of five different culture media and their protein supplements on DC production and maturation. We demonstrated that the nature and the various protein batch supplementations significantly

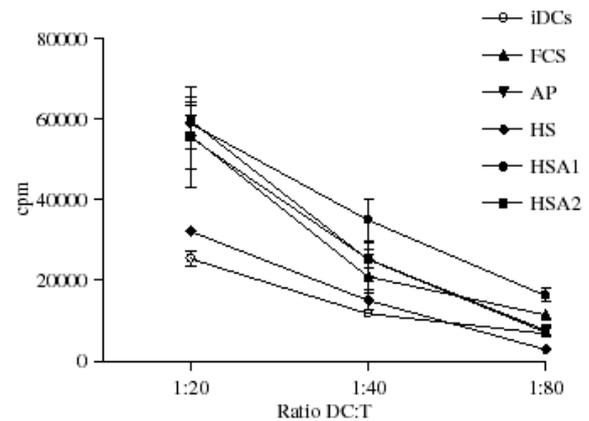
altered maturation of DC generated *in vitro*, bringing new insights into the standardization process for DC production in cancer vaccine strategies.

First, we analysed and compared four serum-free media with the largely used FCS-supplemented RPMI medium. Differentiation yields, as well as cell viability, were



**Figure 6** Concentration of IL-12p70 and IL-10. Immature dendritic cells seeded in RPMI supplemented with foetal calf serum (FCS), human serum (HS), autologous plasma (AP) or human serum albumin (HSA) were stimulated with TNF $\alpha$  and poly I:C. Forty-eight hours later, supernatants were removed. IL-12p70 and IL-10 concentrations were determined by ELISA ( $n=5$ ). \* represents significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

equivalent between the media. Yields were relatively low (less than 50%), in agreement with other published studies [22, 23]. As suggested by Bender et al. [12], such low percentages may be due to the fact that only a fraction of the initial monocyte population had the potential to differentiate into iDC, and that the other fraction underwent programmed cell death [24]. However, we observed important maturation differences, depending on the serum-free medium used. Indeed, media developed as serum-free culture conditions always contain constituents such as HSA, which are subject to biological variabilities. We assumed that these variabilities could explain the maturation differences demonstrated by the results observed with the AIM V batches, which differ only by their HSA batches components. Thus, when using a culture medium that contains human or animal protein supplements, a pre-evaluation of the medium batch must be recommended, particularly when DC are produced for clinical use.



**Figure 7** Mixed leucocyte reaction. The capacity of dendritic cells (DC) generated in RPMI in the presence of different serum supplements to stimulate a T-cell response was analysed. Increasing numbers of DC treated with TNF $\alpha$  and poly I:C for 48 h were used to stimulate allogeneic T lymphocytes. Proliferation of allogeneic T lymphocytes was determined after 4 days by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation over a period of 18 h. One representative experiment of three is shown.

Because of the batch medium variability and to retain more control of cell culture, we decided to devise our own cell media from serum and protein-free RPMI by testing different types of protein supplements. The tested supplements included two HSA batches, AP, HS and FCS, a source of protein supplement largely used in experimental procedures and clinical trials. While differentiation yields and cell viability were comparable with all supplements tested, significant differences in the expression of cell surface markers were noted as a function of the added proteins. In particular, CD80, CD83 and HLA-ABC were heterogeneously expressed between FCS, HSA and HS supplementation. However, due to the safety requirements and the possible induction of an immune response against xenogenic proteins [25–27], FCS should be avoided in clinical protocols and preclinical investigations. Consequently, AP and HS have already been tested to replace FCS supplementation [18, 22, 28, 29], with different results, probably due to serum or plasma batch variability. In our hands, HS or AP appeared to be less efficient for DC maturation than FCS or HSA batches as shown by phenotypic analysis, cytokine secretion and T-cell stimulatory capacities. Also, cancer cells from various tumour types are known to secrete inhibitory molecules, that may affect DC, if generated in AP-supplemented medium [30], rendering unsatisfactory standard production protocols and operating procedures for clinical applications.

Supplementing culture medium with HSA seems to be the best choice for standard DC production. On the basis of the detection of phenotypic markers, it allows properly DC maturation after TNF $\alpha$  and poly I:C treatment. Furthermore, as HSA can conveniently be collected

under GMP conditions, the culture protocol can be easily standardized. Besides, large amount of IL-12p70 were produced with HSA-supplemented RPMI. However, we noted that the Th1 activation was induced whatever the culture medium used, because of poly I:C, a strong Th1 inducer [31, 32]. Finally, DC functional properties were assessed by T-cell stimulatory capacities. Consistent with phenotypic analysis, T-cell proliferation was higher with FCS, AP and HSA than with HS-supplemented RPMI. Thus, DC generated in HSA medium are endowed with complete functional properties.

In conclusion, our study provides new insights into DC standard production for clinical use. It highlights the medium influence on DC generation and maturation and shows the need to evaluate and validate the medium but also the protein constituent. According to our results, DC generation in a tested HSA batch-supplemented RPMI offers the best compromise between maturation efficiency and meeting safety requirements for operating procedures in clinical applications.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM, La Ligue Regionale Contre le Cancer (Vendée, Morbihan, Pays de Loire), and Association pour la Recherche Contre le Cancer. P.-J. Royer is the recipient of a fellowship from La Ligue Départementale Contre le Cancer (Loire Atlantique Committee).

### References

- Cerundolo V, Hemans IF, Salio M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol* 2004;5:7–10.
- Steinman RM & Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer* 2001;94:459–73.
- Thurner B, Roder C, Dieckmann D *et al.* Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999;223:1–15.
- Berger TG, Feuerstein B, Strasser E *et al.* Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. *J Immunol Methods* 2002;268:131–40.
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004;10:909–15.
- Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004;10:475–80.
- Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2003;15:138–47.
- Nestle FO, Banchereau J, Hart D. Dendritic cells: on the move from bench to bedside. *Nat Med* 2001;7:761–5.
- Meierhoff G, Krause SW, Andreessen R. Comparative analysis of dendritic cells derived from blood monocytes or CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Immunobiology* 1998;198:501–13.
- Schuler G, Brang D, Romani N. Production and properties of large numbers of dendritic cells from human blood. *Adv Exp Med Biol* 1995;378:43–52.
- Romani N, Reider D, Heuer M *et al.* Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996;196:137–51.
- Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from non-proliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996;196:121–35.
- Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:417–27.
- Feuerstein B, Berger TG, Maczek C *et al.* A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use. *J Immunol Methods* 2000;245:15–29.
- Zhou Y, Bosch ML, Salgaller ML. Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity. *J Immunother* 2002;25:289–303.
- Thumann P, Moc I, Humrich J *et al.* Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *J Immunol Methods* 2003;277:1–16.
- Strome SE, Voss S, Wilcox R *et al.* Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res* 2002;62:1884–9.
- Anton D, Dabadghao S, Palucka K, Holm G, Yi Q. Generation of dendritic cells from peripheral blood adherent cells in medium with human serum. *Scand J Immunol* 1998;47:116–21.
- Sorg RV, Ozcan Z, Brefort T *et al.* Clinical-scale generation of dendritic cells in a closed system. *J Immunother* 2003;26:374–83.
- Tkachenko N, Wojas K, Tabarkiewicz J, Rolinski J. Generation of dendritic cells from human peripheral blood monocytes – comparison of different culture media. *Folia Histochem Cytobiol* 2005;43:25–30.
- Peng JC, Thomas R, Nielsen LK. Generation and maturation of dendritic cells for clinical application under serum-free conditions. *J Immunother* 2005;28:599–609.
- Duperrier K, Eljaafari A, Dezutter-Dambuyant C *et al.* Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated *in vivo* from monocytes, in the presence of different serum supplements. *J Immunol Methods* 2000;238:119–31.
- Tuyaerts S, Noppe SM, Corthals J *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells in a closed system using Cell Factories. *J Immunol Methods* 2002;264:135–51.
- Bohnenkamp HR, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J, Noll T. Apoptosis of monocytes and the influence on yield of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Methods* 2004;294:67–80.
- Haase C, Ejrnaes M, Judefors AE *et al.* Immunomodulatory dendritic cells require autologous serum to circumvent nonspecific immunosuppressive activity *in vivo*. *Blood* 2005;106:4225–33.
- Mackensen A, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:152–6.
- Toldbod HE, Agger R, Bolund L, Hokland M. Potent influence of bovine serum proteins in experimental dendritic cell-based vaccination protocols. *Scand J Immunol* 2003;58:43–50.
- Tarte K, Fiol G, Rossi JF, Klein B. Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation *in vivo*. *Leukemia* 2000;14:2182–92.
- Pietschmann P, Stockl J, Draxler S, Majdic O, Knapp W. Functional and phenotypic characteristics of dendritic cells generated in human plasma supplemented medium. *Scand J Immunol* 2000;51:377–83.

- 30 Vicari AP, Caux C, Trinchieri G. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol* 2002;12:33–42.
- 31 Spisek R, Bougras G, Ebstein F *et al*. Transient exposure of dendritic cells to maturation stimuli is sufficient to induce complete phenotypic maturation while preserving their capacity to respond to subsequent restimulation. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:445–54.
- 32 McIlroy D, Tanguy-Royer S, Le Meur N *et al*. Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays. *J Leukoc Biol* 2005;78:794–803.

## **II) Maturation séquentielle des DC et signaux helpers**

### **II.1) Introduction**

Les conditions de culture et de maturation des DC sont fondamentales pour l'induction de réponses lymphocytaires (Royer *et al.* 2006). L'association du TNF $\alpha$  et du polyIC permet une bonne maturation des DC (Spisek *et al.* 2001).

In vivo, les DC sont sensibles à l'inflammation du tissu envahi, aux pathogènes qui l'entourent et à toutes les molécules de danger délivrées in situ. En réponse à ces signaux de périphérie, elles rentrent dans un processus de maturation qui leur permet de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles peuvent rencontrer les lymphocytes. Ces derniers, après activation, peuvent à leur tour délivrer des signaux qui peuvent moduler le profil des DC. Ces signaux, comme le CD40L ou l'IFN $\gamma$ , sont connus pour induire la maturation des DC, ils sont importants pour la sécrétion d'IL12p70 entre autres, et jouent un rôle dans la réponse lymphocytaire cytotoxique (Cella *et al.* 1996; Mackey *et al.* 1998). Nous avons alors étudié les réponses lymphocytaires induites par des DC maturées séquentiellement, avec un deuxième signal issu de lymphocytes CD4 helpers. En mimant in vitro les séquences d'activation des DC ayant lieu in vivo, nous avons mis en évidence l'importance de la rencontre DC-lymphocytes T CD4 pour l'induction d'une réponse immune à long terme. Ces résultats sont d'autant plus importants dans l'utilisation des DC à des fins thérapeutiques anti-tumorales (Sato *et al.* 2004).

### **II.2) Article**

**Human dendritic cells sequentially matured with CD4+ T cells as a secondary signal favor Th1, CTL and long-term memory T cell responses**

Thomas Simon\*, Séverine Tanguy-Royer\*, Pierre-Joseph Royer, Nicolas Boisgerault, Jean-François Fonteneau and Marc Grégoire.

INSERM, U892, Nantes, France ; CHU de Nantes, Nantes, France.

Corresponding author: Dr. Marc Gregoire, INSERM U892, Institut de Recherche Thérapeutique de l'université de Nantes, 8 quai Moncoussu BP70721, 44007 Nantes Cedex 1, France.

Phone: +33-228-080-237; Fax: +33-240-084-082 ; E-mail: [marc.gregoire@nantes.inserm.fr](mailto:marc.gregoire@nantes.inserm.fr)

\*T. Simon and S. Tanguy-Royer contributed equally to this work.

Keywords: dendritic cells, sequential maturation, Th1/Th2 cells, cytotoxic T lymphocytes, memory.

Running title : sequential maturation of human dendritic cells

## Abstract

Dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells involved in the control and initiation of immune responses. In vivo, DC exposed at the periphery to maturation stimuli migrate to lymph nodes where they receive secondary signals from CD4<sup>+</sup> helper T cell. These DC become able to initiate CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. However, *in vitro* investigations concerning human monocyte-derived DC never focused on their functional properties after such sequential maturation. Here, we studied human DC phenotypes and functions according to this sequential exposure to maturation stimuli. As first signals, we used TNF- $\alpha$ /polyI:C mimicking inflammatory and pathogen stimuli and, as second signals, we compared activated CD4<sup>+</sup> helper T cells to a combination of CD40-L/IFN- $\gamma$ . Our results show that a sequential activation with activated CD4<sup>+</sup> T cells, dramatically increased the maturation of DC in terms of their phenotype and cytokine secretion, compared to DC activated with maturation stimuli delivered simultaneously. Interestingly, the interaction of mature DC with activated CD4<sup>+</sup> T cells widely favored Th1 polarization and CTL activation, while limiting the expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. Furthermore, this sequential maturation led to the induction of CTL with a long-term effector and central memory phenotypes. Thus, sequential delivery of maturation stimuli which include CD4<sup>+</sup> T cells should be considered in the future to improve the induction of long-term memory CTL in DC-based immunotherapy.

## Introduction

The importance of DC in adaptive immune responses has been extensively demonstrated during the last decades. DC reside in skin, mucosa and peripheral tissues where they are exposed to foreign antigens. Through their capacity to sample their environment, to migrate to lymph nodes and to activate lymphocyte populations, these sentinel cells are at the origin of antigen-adapted immune responses, making a link between natural, innate and specific adaptive immunity [1]. In this context, DC are at the heart of the immune surveillance mechanism, capturing and presenting antigens to specific T lymphocytes that can participate to response against pathogens or tumors.

Many studies in murin models have underlined the importance of CD4<sup>+</sup> T cells in the induction of CD8<sup>+</sup> T cell responses by DC, and more recently in the establishment of a CD8<sup>+</sup> T cell memory pool [2]. It is now well established in these animal models, that DC must first be exposed to preliminary maturation signals in the periphery to induce their activation and migration to secondary lymphoid organs where they can interact and received additional signals from CD4<sup>+</sup> helper T cells. CD4<sup>+</sup> T cell help is mediated by several factors such as CD40-L. CD40-L expressed by activated CD4<sup>+</sup> T cells is known to induce an increase in the expression of costimulatory molecules by DC and in the secretion of bioactive IL-12p70, a cytokine required for Th1 differentiation and CTL activation [3-6]. However, CD40-L independent signals such as IFN- $\gamma$ , can also act on DC to increase their capacities to initiate CTL responses [7, 8]. In addition, it was recently demonstrated in a murin model that these CD4<sup>+</sup> T cell-derived signals induce secretion of the chemokines CCL3 and CCL4 by DC. These chemokines are reported to attract naïve CD8<sup>+</sup> T cells, thus increasing the probability that an antigen-specific CD8<sup>+</sup> precursor comes into contact with a mature, antigen-presenting DC [2, 9]. Furthermore, these chemokines favored the differentiation of a long term memory CD8<sup>+</sup> T cell pool [10]

Thus, these murin models suggest that DC maturation require a two-step process in order to enable the efficient activation of CD8<sup>+</sup> T cell responses and the generation of a memory T cell pool. Surprisingly, while numerous differences exist between murin and human DC, no *in vitro* investigations concerning human DC maturation take into account this two-step maturation process. Indeed, they focused on maturation stimuli used alone or in combination, but delivered simultaneously and not with CD4<sup>+</sup> T lymphocytes as second signal. Thus, in the present study, we characterized the phenotype and function of human DC sequentially matured with activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal in comparison with DC activated with simultaneous delivery of maturation stimuli. We set up a DC maturation

protocol composed of TNF- $\alpha$ /polyI:C as a first combined signal that mimics the peripheral stimuli, followed by exposure to either allogenic CD4<sup>+</sup> T cells activated with CD3 and CD28 specific mAb. We investigated the effect of this sequential maturation on the phenotype of DC and their ability to secrete cytokines and chemokines. We also compared their capacity to induce differentiation of autologous CD4<sup>+</sup> T cells, as well as their ability to prime antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. We found that sequential maturation of human DC, especially with activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal, led to a stronger Th1 polarization of the autologous CD4<sup>+</sup> T cell responses, with a limited expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells and a better differentiation of anti-tumor CD8<sup>+</sup> T cells with a long-term memory phenotype. Our work therefore reports a new approach using sequential maturation to optimize in vitro DC maturation and T cell activation for the development of DC based immunotherapy.

## Material and Methods

### *Cell culture*

Human PBMC were obtained at the Etablissement Français du Sang in Nantes from healthy donors (convention ATS 2000-12). After Ficoll-Paque density gradient centrifugation (Amersham, Uppsala, Sweden), monocytes were purified from PBMC by elutriation using a Beckman Avanti J20 centrifuge equipped with a JE5.0 rotor and a 40 ml elutriation chamber. Monocyte purity was assessed by flow cytometry using scatter gating to define monocyte and lymphocyte populations and was around 90-95%.

Monocytes were cultured in flasks at  $2 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1% penicillin–streptomycin–glutamin supplemented with 2% human albumin (Laboratoire Français de Fractionnement et de Biotechnologies, Les Ulis, France), 500 U/ml recombinant human GM-CSF and 40 ng/ml recombinant human IL-4 (both from CellGenix, Paris, France). Immature DC were harvested at day 5 and cultured in fresh medium with cytokines at  $1 \times 10^6$  cells/ml, in 24-well plates coated with poly(2-hydroxyethylmetacrylate) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) to prevent cell adhesion. DC maturation was induced by addition of TP: 20 ng/ml TNF- $\alpha$  (AbCys, Paris, France) and 50  $\mu$ g/ml poly I:C (Sigma, St Quentin Fallavier, France), or CI: 0.5  $\mu$ g/ml soluble CD40-L trimer (AbCys) and 1000 U/ml IFN- $\gamma$  (AbCys), or T4+: activated CD4+ T cells at a DC/T4+ ratio of 1/2. In some conditions, T4+ or CI were added to DC matured 10 hrs with TP. In order to activate CD4+ T cells (T4+), allogeneic CD4+ T lymphocytes were incubated for 6 hours in 24-well plates coated with 0.5  $\mu$ g/ml of anti-CD3 mAb (Orthoclone OKT3, Janssen-Cilag, France) and 0.5  $\mu$ g/ml of anti-CD28 mAb (CD28.2, BD Biosciences, Paris, France), then washed and gamma-irradiated at 35 Gy to prevent proliferation.

### *Immunofluorescence and flow cytometry*

The surface phenotype of DC was determined using the following PE-conjugated monoclonal antibodies (mAb): anti-CD80 (MAB104, Beckman-Coulter, Paris, France), anti-CD86 (HA5.2B7, Beckman-Coulter), anti-CD83 (HB15a Beckman-Coulter), anti-CD40 (MAB89, Beckman-Coulter), anti-HLA-DR (Immu-357, Beckman-Coulter), and FITC-conjugated anti-HLA-ABC mAb (B9.12.1, Beckman-Coulter). The CD4 T cell cytokine profile was determined using FITC-conjugated anti-IFN- $\gamma$  mAb (25723.11, BD Biosciences) and PE-conjugated anti-IL-4 mAb (3010.211, BD Biosciences). The fraction of responding CD8+ T cells was measured using APC-conjugated anti-CD8 mAb (RPA-T8, BD

Biosciences) and PE-conjugated anti-IFN- $\gamma$  mAb (4S.B3, BD Biosciences). The memory phenotype of CD8<sup>+</sup> T cells was determined using PE-Cy5-conjugated anti-CD45RA mAb (HI100, BD Biosciences), PE-conjugated anti-CCR7 mAb(150503, RD system), FITC-conjugated anti-CD27 mAb (M-T271, BD Biosciences), APC-conjugated anti-CD28 mAb (CD28.2, BD Biosciences), FITC- or PE-conjugated anti-CD45RO mAb (UCHL1, BD Biosciences) and FITC-conjugated anti-CD127 mAb (hIL-7R-M21, BD Biosciences). The fraction of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells was measured using FITC-conjugated anti-CD4 mAb (RPA-T4, BD Biosciences), PE-conjugated anti-CD25 mAb (2A3, BD Biosciences) and APC-conjugated anti-FoxP3 mAb (PCH101, eBiosciences, Paris, France).

For cell surface staining, cells were incubated with mAb diluted in PBS containing 10% fetal calf serum (FCS, Sigma) for 30 min at 4°C in the dark, washed with PBS and then analyzed using a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickinson) and CellQuest Pro software. For intracellular staining, cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science) for 10 min at room temperature, washed, permeabilized and stained with mAb in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma) and 0.1% saponin (Sigma) at room temperature. Cells were washed and analyzed by flow cytometry. The percentage of positive cells was determined by comparison to the staining observed with isotype controls (FITC- or PE-conjugated mouse immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2b, BD Biosciences).

#### *Cytokine production measurement*

DC were plated at  $1 \times 10^6$  cells/ml in RPMI +2% human albumin, supplemented with maturation stimuli. Supernatants were harvested after 48hrs of maturation. Cytokine production was determined using a CBA kit (BD Biosciences) in accordance with the manufacturer's protocol. The kit enables the simultaneous measurement of IL-10, IL-12p70, IL-6, CCL3 (Mip1- $\alpha$ ) and CCL4 (Mip1- $\beta$ ) concentration by flow cytometry.

#### *CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> stimulation by matured DC*

CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were negatively selected using Rosette Sep, according to the manufacturer's instructions (Stem Cell). Cells were then washed and cultured in RPMI supplemented with 8% pooled human serum (pHS) prepared locally.

For CD4<sup>+</sup> T cell stimulation, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were cultured with autologous matured DC loaded with 500  $\mu$ g/ml ovalbumin (Albumin from chicken egg white, grade V, Sigma) 24 hrs prior to maturation induction, in U-bottom 96-well plates at a DC/T ratio of

1/10. 20 U/ml of IL-2 (AbCys) was added at day 7. At day 14, The CD4+ T cell cytokine profile was determined by intracellular IL-4 and IFN- $\gamma$  co-staining, after a 6 hrs re-stimulation with 15 ng/ml of phorbol myristate acetate (PMA, Sigma) and 1  $\mu$ g/ml of calcium ionophore (Sigma). 10  $\mu$ g/ml of brefeldin A (Sigma) was added for the last 4 hrs to prevent cytokine release. We also determined at day 14 the fraction of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cultures by intracellular FoxP3 staining and surface CD4, CD25 staining.

For the induction of Melan-A-specific CTL, HLA-A\*0201+ CD8+ T lymphocytes were cultured with autologous matured DC loaded for 2 hrs at 4°C with 10  $\mu$ g/ml of Melan-A<sub>(26-35)</sub> A27L peptide (ELAGIGILTV, Eurogenetec), in U-bottom 96-well plates at a DC/T cell ratio of 1/10. 20 U/ml of IL-2 (AbCys) and 5ng/ml of IL-7 (AbCys) were added 5 and 7 days later respectively. At day 6, the fraction of Melan-A-specific CTL was measured by CD8/IFN- $\gamma$  co-staining after a 6 hrs re-stimulation with T2 cells loaded with 10  $\mu$ g/ml of Melan-A<sub>(26-35)</sub> A27L peptide in the presence of brefeldin A. The cytotoxic activity of Melan-A specific CTL was determined by <sup>51</sup>Cr-release assay. At day 14, the profile of the memory CD8+ T cells was determined by immunofluorescence and flow cytometry.

#### *<sup>51</sup>Cr-release assay*

Target cells (T2 cells) were pulsed for 1 hr with Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (NEN life science, Paris, France) and then washed. CD8+ T cells were co-cultured with Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>-pulsed T2 cells loaded with Melan-A<sub>(26-35)</sub> A27L peptide at several effector/target cell ratios. After 4 hrs of culture at 37°C, 25 $\mu$ L of supernatant were harvested and added to 100  $\mu$ L scintillation cocktail (optiphase supermix, Wallac, UK) before liquid scintillation counting. The percentage of specific lysis was calculated as follows: (sample release - spontaneous release/maximum release - spontaneous release) x 100. The spontaneous release was calculated from targets incubated with culture medium, and the maximum release from targets incubated with 1% Triton X-100 (Sigma).

#### *Statistical analysis*

Statistical significance was assessed using Kruskal-Wallis test and the Dunn's multiple comparison post-hoc test with GraphPad Prism 4 software.

## Results

### *Optimal DC maturation is induced by sequential exposure to maturation signals*

In a first set of experiments, we measured the expression of DC maturation markers induced by the delivery of activated CD4<sup>+</sup> T cells (T4<sup>+</sup>) after an initial exposure to TNF- $\alpha$  and poly I:C (TP) and we determined the optimal sequence of addition of these signals (fig. 1). Immature DC (iDC) exposed for 48 hrs to TP, to allogeneic T4<sup>+</sup> or to both maturation stimuli delivered simultaneously, acquired a mature phenotype with an increased expression of surface CD80, CD86, CD83 and HLA class I molecules (fig. 1A). Interestingly, the maturation level of these DC was strongly improved when T4<sup>+</sup> were added 10 hrs after the initial exposure to TP. The DC maturation level then decreased when the delay between exposure to TP and T4<sup>+</sup> was extended to 24 hrs and 48 hrs. These results suggest that matured DC are more sensitive to T4<sup>+</sup>-derived signals 10 hrs following initial exposure to TP and that this sensitivity then decreased because of their exhausted nature [11].

In addition to surface markers, we also measured cytokine productions by DC in culture supernatants (fig. 1B). High levels of IL-6, IL-10 and IL-12 were observed in the culture of DC matured by the simultaneous addition of TP and T4<sup>+</sup> (TP/T4<sup>+</sup> sim). In comparison, high level of IL-6 and IL-12 productions were also measured for DC matured sequentially by TP and, 10hrs later, activated CD4<sup>+</sup> T cells, but the IL-10 production dropped dramatically. Addition of activated CD4<sup>+</sup> T cells 24hrs or 48hrs after TP, did not result in high production of the three cytokines, confirming observation done on figure 1A, that DC are less sensitive to CD4<sup>+</sup> T cell signals 24 hrs after the exposition to TP. Therefore, for all subsequent experiments, exposure to second signals was performed ten hours after exposure to TP and is referred as TP+T4<sup>+</sup>.

### *Activated CD4<sup>+</sup> T cells as second signals dramatically increases DC maturation*

In a previous study, we reported that a combination of Poly I:C and TNF- $\alpha$  induces DC maturation and that IL-12p70 production by mature DC can be increased by addition, several hours later, of activated CD4<sup>+</sup> T cell signals such as IFN- $\gamma$  and CD40-L [12]. In the present study, we used as first signals, TNF- $\alpha$ /polyI:C (TP) mimicking inflammatory and pathogen stimuli, and as second signals, we compared a combination of CD40-L/IFN- $\gamma$  (TP+CI) to activated CD4<sup>+</sup> T cells (TP+T4<sup>+</sup>). We then analyzed the expression of a large panel of surface maturation markers: CD80, CD86, CD83, CD40, HLA class I and class II

(Fig. 2). The strongest expression of these phenotypic markers was observed on DC exposed first to TP and then, ten hours later, to T4+ as a second signal, with significant differences for CD86, CD83, CD40 and HLA ABC ( $P < 0.05$ ). However, the expression of the HLA-DR molecule was not amplified by the sequential delivery of T4+. Comparatively, when we tried to mimic the effects of the activated CD4+ T cells by providing DC with a combination of soluble CD40-L plus IFN- $\gamma$  as a second signal (TP+CI), we also observed an increased maturation level, but not to the same extent as that observed when DC were exposed to TP plus T4+. Our results suggest that the signal provided by activated CD4+ T cells to DC cannot be mimicked by the simple addition of CD40-L and IFN- $\gamma$  and that additional stimuli are required.

To further define the effects of sequential exposure to TP and T4+ on DC maturation level, we measured the secretion of major cytokines [IL-6, IL-10 and IL-12p70] and chemokines [CCL3 (Mip-1 $\alpha$ ) and CCL4 (Mip-1 $\beta$ )] by DC. Supernatants of the different DC cultures were analyzed by cytometric bead array (Fig. 3). We observed that secretion of IL-6, IL-10 and IL-12p70 by DC was induced by the mixture of TNF- $\alpha$  and Poly I:C as we previously reported [12]. These secretions were significantly increased ( $P < 0.05$ ) by the sequential addition of activated CD4+ T cells, which, alone, did not produce any of these cytokines (data not shown).

In comparison, the addition of soluble CD40-L and IFN- $\gamma$  (TP+CI) after the first signal, did not affect the production of IL-6, IL-10 and IL-12p70. Our results suggest that additional unknown signals delivered by activated CD4+ T cells participate with IFN- $\gamma$  and CD40-L to increase IL-12p70 secretion. In addition, we observed that secretion of CCL3 and CCL4 chemokines, which are implicated in the attraction of naïve T cells [9], is also greatly increased by the sequential addition of T4+ ten hours after the exposure of DC to TP. Thus, the sequential combination of TNF- $\alpha$  / Poly I:C and activated CD4+ T cells conditions the DC to produce the maximum levels of the cytokines IL-6 and IL-12p70 and the chemokines CCL3 and CCL4, associated with a highly mature surface phenotype. The large amount of IL-12p70 induced by the sequential maturation of DC by TP plus T4+ would probably provide a microenvironment favorable to the initiation and development of Th1 and CTL responses. In counterpart, the amount of IL-10 production by TP plus T4+-matured DC would have a negative effect on these T cell responses [13]. Thus, we next examined how such sequential DC maturation would affect the profile of the CD4+ T cell responses generated.

*DC matured sequentially with activated CD4+ T cells as a second signal favor Th1 responses*

Since we observed a strong maturation profile and a high production of IL-12p70 by DC sequentially matured by TP and T4+ (Fig. 2 and 3), we hypothesized that this sequential maturation would favor Th1 CD4+ T cell responses. Thus, in order to characterize the nature of the CD4+ T cell response induced by sequentially matured DC, autologous CD4+ T cells were stimulated by iDC or differentially matured DC previously pulsed with ovalbumin (OVA). The stimulated CD4+ T cells were analyzed for their production of IFN- $\gamma$  and IL-4 fourteen days later (Fig. 4A and 4B). The sequential DC maturation by TP plus T4+ induced with significant differences ( $P < 0.05$ ), the strongest CD4+ Th1 profile with a high fraction of CD4+ T cells producing IFN- $\gamma$  and only a few of them producing IL-4. The other maturation stimuli also polarized the CD4+ T cell profile towards Th1, but not as strongly as DC sequentially matured with TP and T4+.

*DC matured sequentially with activated CD4+ T cells as a second signal reduce CD4+CD25+FoxP3+ T cell responses*

We then investigated the percentage of regulatory T cells in these cultures to determine how the differentially matured DC affect this subpopulation. Fourteen days after the stimulation, the percentage of CD4+CD25+FoxP3+ cells was measured by flow cytometry. iDC generated the highest regulatory T cell proportion (Fig. 5A and 5B). The percentage of CD4+CD25+FoxP3+ T cells was lower in the T cell cultures stimulated with mature DC and was minimal when DC were previously sequentially activated with CD4+ T cells. Even though it was not statistically significant ( $P > 0.05$ ) due to high variation in the frequency of CD4+CD25+FoxP3+ T cells from one donor to another, this effect was observed for the five donors tested (Fig. 5B). This result raises the question of whether the loss of CD4+CD25+FoxP3+ population was due to a more active expansion of Th1 cells by sequentially matured DC or a direct negative effect of sequentially matured DC on the T regulatory cell population. As assessed by proliferation tests (data not shown), stimulated autologous CD4+T cells proliferated more when DC had previously been matured, especially by the sequential addition of TP plus T4+. Therefore, the decrease in CD4+CD25+FoxP3+ T cells in CD4+ T cell cultures stimulated with matured DC may reflect a dilution of this population by the proliferating Th1 CD4+ T cells. However, we cannot exclude that T4+ licensed-DC may prevent expansion of regulatory T cells or inhibit their regulatory function, thereby promoting the expansion of other CD4+ T cells.

*DC matured sequentially with CD4+ T cells as a second signal induce anti-tumor cytotoxic CD8+ T cell responses*

Since we observed that DC matured sequentially with CD4+ T cells as a second signal induced Th1 CD4+ responses and did not amplify CD4+CD25+FoxP3+ T cells, we speculated that these DC should exhibit a good capacity to induce CTL responses. Thus, we investigated the ability of sequentially matured DC to induce CTL specific for a tumor-associated antigen. Thus, autologous HLA-A\*0201+ CD8+ T lymphocytes were stimulated once with iDC or differentially matured DC pulsed with the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide derived from the melanocytic differentiation antigen Melan-A/MART1 (Fig. 6). After six days of culture, part of the T cell population was stimulated by peptide-pulsed T2 cells in the presence of brefeldin A. The proportion of Melan-A-specific CTL was assessed by measurement of intracellular IFN- $\gamma$  and surface CD8 staining by flow cytometry (Fig. 6A and 6B). The greatest expansion of Melan-A-specific CTL was observed in the culture where CD8+ T cells were stimulated by DC that had been sequentially matured by TP and T4+. Indeed, we observed two-fold more CD8+ T cells able to produce IFN- $\gamma$  in response to the Melan-A peptide in cultures stimulated with peptide-pulsed DC sequentially matured by TP and T4+ compared to TP-matured DC. This difference was significant ( $P < 0.01$ ). The addition of CD40-L and IFN- $\gamma$  to DC matured with TP did not allow to reach the amplification level of Melan-A-specific CTL obtained with DC matured with TP plus T4+. These results suggest that other signals than CD40-L and IFN- $\gamma$  are probably involved in the induction of Melan-A-specific CTL response.

The cytotoxic activity of the expanded Melan-A-specific CTL was also analyzed six days after the stimulation with DC, using Melan-A-pulsed T2 cells (Fig. 6C). The cytotoxic activities were well correlated to the Melan-A-specific CTL frequency determined by IFN- $\gamma$ /CD8 staining. The highest Melan-A/MART-1 specific lysis was observed in the culture where CD8+ T cells were stimulated by DC matured with TP plus T4+, suggesting that sequentially matured DC prime functional cytotoxic T lymphocytes .

*Anti-tumor cytotoxic CD8+ T cells primed by sequentially matured DC with CD4+ T cells as a second signal exhibit a long-term memory phenotype*

It has been established in mouse models that CD4+ help plays a role in the differentiation of long-term memory CD8+ T cell responses [2]. Thus, we characterized, fourteen days after the stimulation, the effector/memory phenotype of T cells surviving after

the contraction phase in Melan-A-specific CTL cultures with markers currently used in the literature: CD27, CD28, CD45RO, CD45RA, CD127 and CCR7 [14]. Cells were stained with an anti-CD45RO+ mAb to identify memory CD8+ T cells, and their expression of CD27, CD28 and CD45RA was analyzed (Fig. 7). Indeed, these three markers are expressed on naïve T cells, but tend to disappear upon the acquisition of effector function and are re-expressed strongly (CD27 and CD28) or moderately (CD45RA) when T cells acquire the memory phenotype. We found that a population of CD45RO+ CD27+ CD28+ CD45RA intermediate cells among the CD8+ T cells, persisted in the culture and were more frequent in the condition where DC had received secondary signals from activated helper cells (TP+T4+). The combination of CD40-L plus IFN- $\gamma$  as a second signal (TP+CI) had a weaker effect. We then studied CD127 (IL-7R $\alpha$ ) expression on this population. Indeed, it is now acknowledged that selective expression of CD127 identifies memory cells [15]. We observed that CD45RO+CD28+CD45RAint cells expressed CD127, with a much higher intensity in the “TP+T4+” condition (MFI=107 compare to MFI<65 for all other conditions). These cells identified as CD45RO+ CD45RAint CD27+CD28+CD127hi display a phenotype typical of long-lived memory T cells.

To complete the characterization of these memory T cells, we analyzed their expression of CCR7. Indeed, two main populations of memory CD8+ T cells have been described depending on their expression of CCR7: CCR7- effector memory T cells (Tem) and CCR7+ central memory T cells (Tcm) [16]. We observed that the memory T cells obtained from stimulation with DC sequentially matured with T4+ as second signals, exhibit both memory profiles, Tem (37.6%) and Tcm (55.7%), whereas the majority of memory T cells obtained from other mature DC were mainly CCR7- Tem. Furthermore, CCR7 expression was stronger on the Tcm obtained from sequentially matured DC compared to the Tem obtained from other conditions (MFI=21 compare to MFI<10 for all other conditions). Thus, our results demonstrate that sequential maturation of DC in the presence of helper cells contributes to the generation of a long-term T cell pool composed of both Tem and Tcm memory components.

## Discussion

Description of DC maturation in mouse model showed that this process is a multi-step phenomenon, with a first maturation signal received in the periphery (inflammatory and/or pathogenic signals), which at least induces DC activation and their migration to lymph nodes where they receive additional maturation signals from CD4<sup>+</sup> T cells [1]. In our *in vitro* study, we characterized, for the first time, this sequential maturation of human DC with activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal. We show that maturation of DC requires second signals delivered by activated CD4<sup>+</sup> T cells, a few hours after exposure to peripheral maturation stimuli, to fully initiate CD8<sup>+</sup> T cell responses. DC activated by this sequential procedure exhibit a more profound mature phenotype, which improves their ability to skew the CD4<sup>+</sup> T cell response towards the Th1 phenotype, limits the presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells and leads to the differentiation of tumor antigen-specific CTL with a long-term memory phenotype.

It was previously demonstrated in murin models that in secondary lymphoid organs, activation of CD4<sup>+</sup> helper T cells by mature DC results in stimulation and conditioning of DC by CD4<sup>+</sup> T cells that “license” DC to induce CTL responses. It has been well established that CD40-L is one of the main activated CD4<sup>+</sup> T cell signals provided to DC and that CD40-L/CD40 interactions initiate differentiation of naïve CD8<sup>+</sup> T cells to effector CTL by DC [5, 6, 17]. In our study, we show that allogenic activated CD4<sup>+</sup> T cells used as a second signal are more efficient at maturing monocyte-derived human DC than the combination of CD40-L and IFN- $\gamma$ , suggesting a more complex exchange of signals between these two types of cells. In addition to CD40-L and IFN- $\gamma$ , CD4<sup>+</sup> T cells produce other factors such as molecules of the TNF family (TNF- $\alpha$ ; TRANCE...) and cytokines such as IL-2, which may explain the difference observed on DC between the CD40-L/IFN- $\gamma$  combination and activated CD4<sup>+</sup> T cells used as second signals.

Furthermore, these CD4<sup>+</sup> T cell/DC interactions not only affect the maturation phenotype of DC, but also induce the secretion of chemokines by DC, such as CCL3 and CCL4 (Mip1- $\alpha$  and - $\beta$ ). These chemokines are reported in murin models to have a chemotactic effect on naïve CD8<sup>+</sup> T cells [9] and favor the encounter of rare antigen-specific naïve CD8<sup>+</sup> precursors with mature DC. In our study, we show that DC exposed to activated CD4<sup>+</sup> T cells secrete high quantities of these two chemokines which, in human, may have the same chemotactic effect on naïve CD8<sup>+</sup> T cells as observed in mice. Furthermore, it has been shown that CCL3 and CCL4 produced by T helper-conditioned DC play a role in the

generation of pre-memory CD8<sup>+</sup> T cells characterized by a high expression of IL-6Ra and IL-7Ra [10]. Survival of these pre-memory CD8<sup>+</sup> T cells is dependent on IL-6, even in the presence of IL-7 (used in our experimental conditions). In addition, it has been shown that IL-6 produced upon TLR signaling can block CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell-mediated suppression [18]. These effects of IL-6, CCL3 and CCL4 on the immune response fit well with our present observations. Indeed, activated CD4<sup>+</sup> T cells exposed to mature DC, which produced the highest amount of IL-6, CCL3 and CCL4, induced Melan-A-specific CTL, which exhibited the strongest long-term memory phenotype (CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CD45RA<sup>int</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) [14]. In addition, the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> was greatly reduced in cultures where T cells were stimulated with sequentially matured DC.

We also observed a dramatic effect of activated CD4<sup>+</sup> T cells on cytokines production, notably IL-12, by mature DC. The IL-12 secretion by DC skews the immune response towards a Th1 profile [19, 20], whereas IL-10 inhibits it [13]. In our study, activated CD4<sup>+</sup> T cell-exposed mature DC, which produced high amounts of IL-12, were the most efficient to direct the immune response towards a Th1 profile. Furthermore, these cells acquired the highest capacity to induce a CTL response against a tumor-associated antigen such as Melan-A from HLA-A\*0201<sup>+</sup> healthy donor blood. Therefore, the balance of effect between IL-10 and IL-12 is in favor of IL-12, skewing the immune response towards a Th1 profile.

Several anti-tumor immunotherapeutic strategies have been set up during the last decade, such as injection of anti-tumor-specific T cells or tumor antigen-loaded DC, notably to treat melanoma patients. Despite induction of anti-tumor T cell responses and encouraging clinical results, one common problem encountered during these protocols is the failure to induce a long-lasting anti-tumor T cell response [21, 22]. Indeed, in adoptive immunotherapy clinical trials, anti-tumor-specific T cells are detected for only a few days following injection in the patients [23, 24]. In DC-based clinical trials, progression of the disease after a period of stabilization was described when the anti-tumor-specific CTL response ceases [25], and a re-stimulation of anti-tumor-specific T cells is required for these cells to be detected several weeks after the DC injection [26]. Interestingly, Rosenberg's group designed a modified clinical trial based on immunotherapy to increase the survival of tumor-antigen-specific CTL injected to patients [27]. They treated the patients with a lymphodepleting chemotherapeutic regimen prior to the injection of T cells to limit the negative effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and to disrupt homeostatic T cell regulation. The authors succeeded in inducing a long-lasting anti-tumor-specific CTL response that was still detectable in the blood of responding patients two months after the injection. They were also able to define the

phenotype of these tumor-reactive cells as effector memory T cells (Tem) characterized by a CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>int</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> phenotype [14]. However, in a mouse model, transfer of anti-tumor central memory T cells (Tcm) was shown to be more efficient at inducing tumor regression than transfer of anti-tumor Tem [28]. This suggests that both memory subsets play a complementary role in T cell memory responses. In the periphery, Tem are able to quickly lyse cells harboring the antigen. This cytotoxic response is reinforced by a new pool of effector T cells differentiated from Tcm exposed to the antigen in secondary lymphoid organs. Thus, it is likely that the presence of both subsets is required for optimal memory T cell responses. In our study, we demonstrate that DC sequentially matured with poly I:C plus TNF- $\alpha$  followed by activated CD4<sup>+</sup> T cells, allow the priming of tumor-associated antigen-specific CTL, which differentiate *in vitro* into both Tem and Tcm memory subsets. The Tem exhibited a CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>int</sup>CD127<sup>+</sup> phenotype similar to the persistent anti-tumor T cells described by Powell et al [14].

Altogether, the results of our study suggest that a sequential maturation procedure, which improves DC ability to direct the CD4<sup>+</sup> T cell response towards the Th1 phenotype and limits the presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, may represent an useful approach to induce a long-lasting anti-tumor memory T cell pool containing both effector and central components. Thus, our work demonstrates, for the first time, that sequential maturation of human DC using activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal greatly increases the capacity of DC to prime a complete CTL response with establishment of a long-term memory phenotypes. This work has important implications for the development of DC-based immunotherapy and highlights the requirement of T helper-derived signals in the DC maturation process.

**Acknowledgements**

We thank Delphine Coulais from the «*Plateforme de Développement et Transfert à la Clinique*» for her technical help and the Platform to provide purified monocytes..

This work was supported by grants from the INSERM, the « Association pour la Recherche contre le Cancer » and « La Région Pays de Loire »

## References

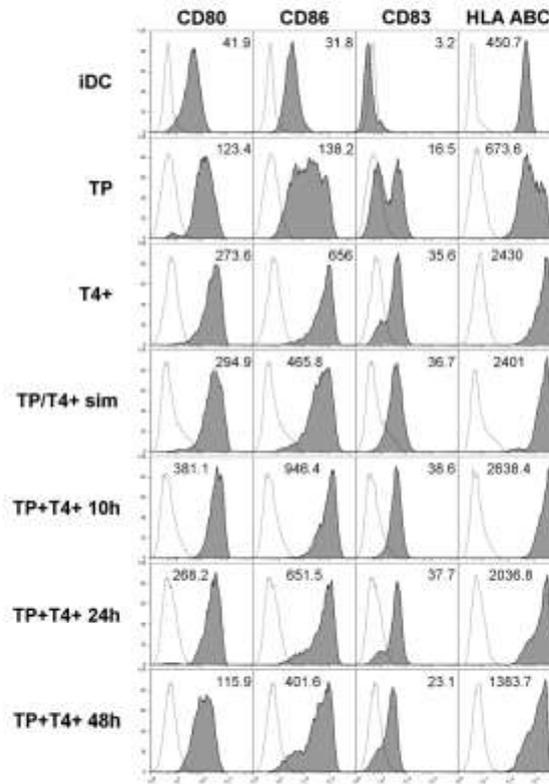
1. Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-52.
2. Castellino, F., Germain, R.N. (2006) Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol* **24**, 519-40.
3. Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Miller, J.F., 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.
4. Mackey, M.F., Gunn, J.R., Maliszewsky, C., Kikutani, H., Noelle, R.J., Barth, R.J., Jr. (1998) Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol* **161**, 2094-8.
5. Ridge, J.P., Di Rosa, F., Matzinger, P. (1998) A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474-8.
6. Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., Melief, C.J. (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480-3.
7. Lu, Z., Yuan, L., Zhou, X., Sotomayor, E., Levitsky, H.I., Pardoll, D.M. (2000) CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **191**, 541-50.
8. Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**, 163-89.
9. Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., Germain, R.N. (2006) Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890-5.
10. Castellino, F., Germain, R.N. (2007) Chemokine-guided CD4+ T cell help enhances generation of IL-6RalphahighIL-7Ralphahigh prememory CD8+ T cells. *J Immunol* **178**, 778-87.
11. Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* **1**, 311-6.
12. Spisek, R., Bougras, G., Ebstein, F., Masse, D., Meflah, K., McIlroy, D., Gregoire, M. (2003) Transient exposure of dendritic cells to maturation stimuli is sufficient to

- induce complete phenotypic maturation while preserving their capacity to respond to subsequent restimulation. *Cancer Immunol Immunother* **52**, 445-54.
13. O'Garra, A., Vieira, P. (2007) T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* **7**, 425-8.
  14. Powell, D.J., Jr., Dudley, M.E., Robbins, P.F., Rosenberg, S.A. (2005) Transition of late-stage effector T cells to CD27+ CD28+ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy. *Blood* **105**, 241-50.
  15. Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., Ahmed, R. (2003) Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**, 1191-8.
  16. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-12.
  17. Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., Heath, W.R. (1998) Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**, 478-80.
  18. Pasare, C., Medzhitov, R. (2003) Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**, 1033-6.
  19. Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* **154**, 5071-9.
  20. Hilkens, C.M., Kalinski, P., de Boer, M., Kapsenberg, M.L. (1997) Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* **90**, 1920-6.
  21. Dudley, M.E., Rosenberg, S.A. (2007) Adoptive cell transfer therapy. *Semin Oncol* **34**, 524-31.
  22. Palucka, A.K., Ueno, H., Fay, J.W., Banchereau, J. (2007) Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev* **220**, 129-50.
  23. 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., Leitman, S.F., Rosenberg, S.A. (2001) Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* **24**, 363-73.

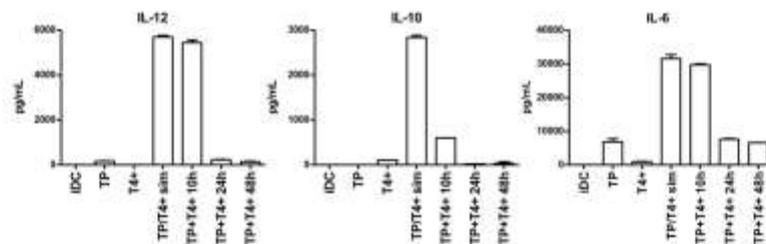
24. Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E., Greenberg, P.D. (2002) Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 16168-73.
25. Andersen, M.H., Keikavoussi, P., Brocker, E.B., Schuler-Thurner, B., Jonassen, M., Sondergaard, I., Straten, P.T., Becker, J.C., Kampgen, E. (2001) Induction of systemic CTL responses in melanoma patients by dendritic cell vaccination: cessation of CTL responses is associated with disease progression. *Int J Cancer* **94**, 820-4.
26. Palucka, A.K., Dhodapkar, M.V., Pacesny, S., Ueno, H., Fay, J., Banchereau, J. (2005) Boosting vaccinations with peptide-pulsed CD34+ progenitor-derived dendritic cells can expand long-lived melanoma peptide-specific CD8+ T cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* **28**, 158-68.
27. 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., Robinson, M.R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C.A., Rogers-Freezer, L., Morton, K.E., Mavroukakis, S.A., White, D.E., Rosenberg, S.A. (2002) Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* **298**, 850-4.
28. Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., Torabi-Parizi, P., Kerstann, K., Cardones, A.R., Finkelstein, S.E., Palmer, D.C., Antony, P.A., Hwang, S.T., Rosenberg, S.A., Waldmann, T.A., Restifo, N.P. (2005) Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9571-6.

## Figures

A

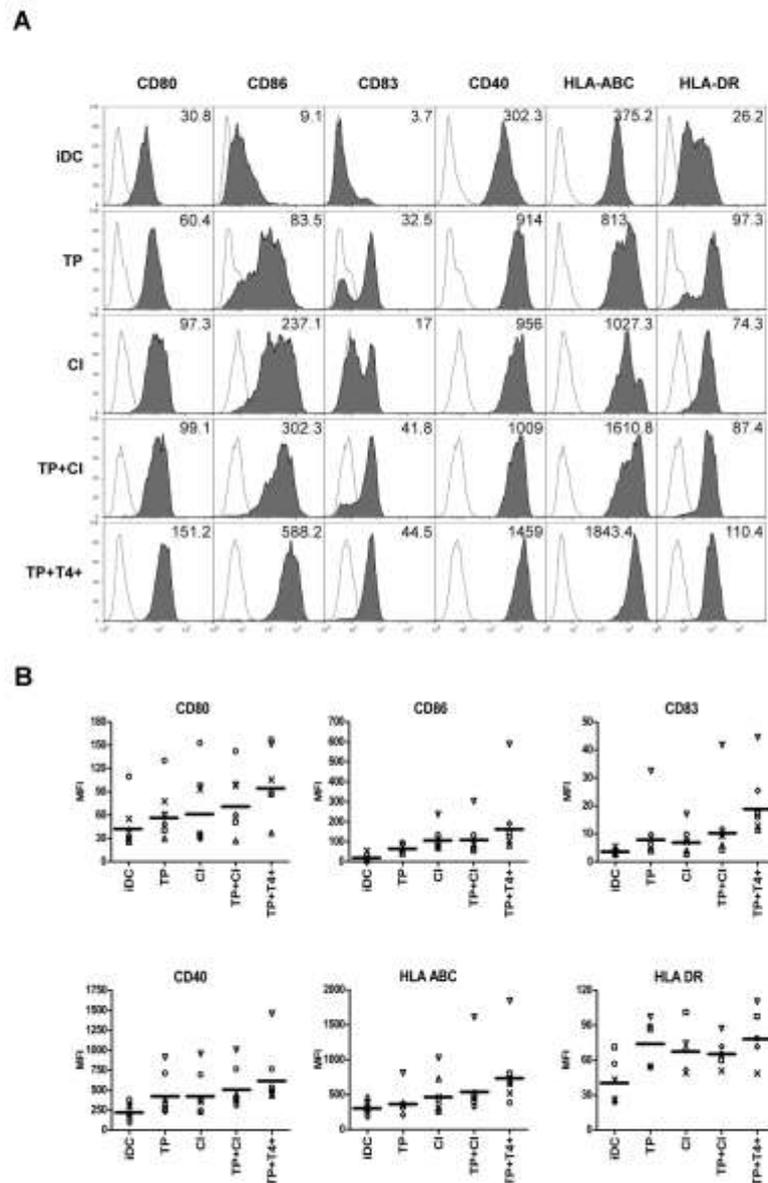


B



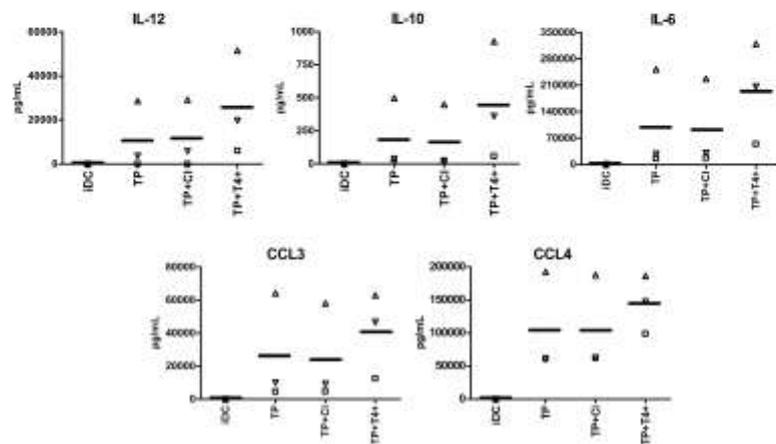
**Fig. 1** Optimal DC maturation is induced by addition of activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal, ten hours after the first maturation signal. (A) phenotypic analysis of immature dendritic cells (iDC) and mature DC exposed for 48 hrs to different maturation stimuli: TNF- $\alpha$  and poly I:C (TP), irradiated activated CD4<sup>+</sup> T cells (T4<sup>+</sup>), both stimuli added simultaneously (TP/T4<sup>+</sup> sim) or TP followed by T4<sup>+</sup>, 10 hrs, 24 hrs or 48 hrs later (TP+T4<sup>+</sup> 10h, TP+T4<sup>+</sup> 24h or TP+T4<sup>+</sup> 48h). Median fluorescence intensity (MFI) is indicated on the

corresponding histogram plot. (B) Analysis of IL-6, IL-10 and IL-12 production in the supernatant of DC culture exposed 48hrs to the different maturation stimuli. Measurement of cytokine production was performed by commercially available BD Cytometric Bead Array kits, according to the manufacturer's protocol.

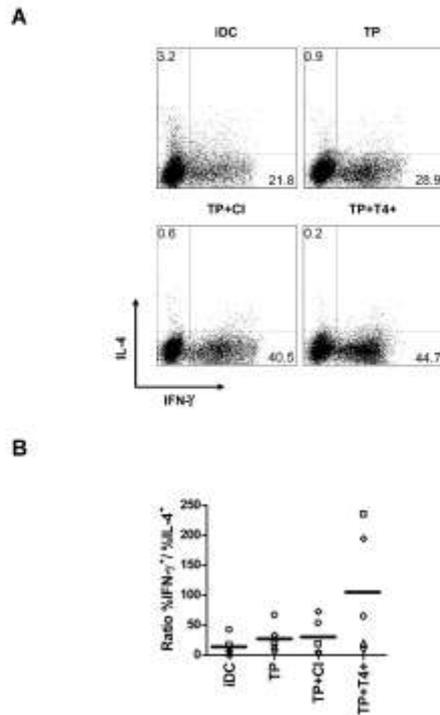


**Fig. 2** DC treated with activated CD4<sup>+</sup> T cells as a secondary maturation signal exhibit a more mature phenotype. (A) Comparative phenotypic analysis of iDC and mature DC

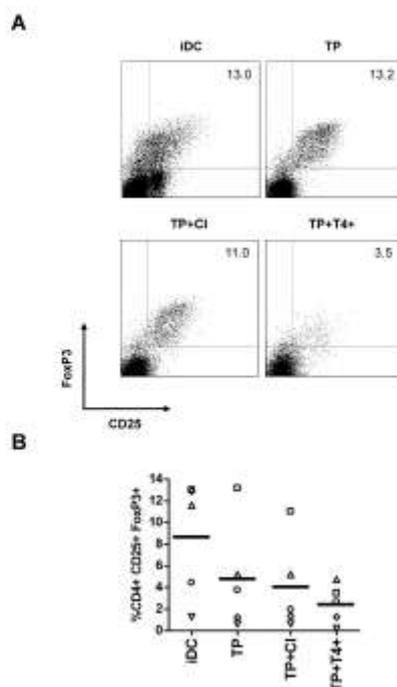
exposed for 48 hrs to different maturation stimuli: TNF- $\alpha$  and poly I:C (TP), CD40-L and IFN- $\gamma$  (CI), TP followed 10 hrs later by CI (TP+CI) and TP followed 10 hrs later by T4+ (TP+T4+). (B) Analysis from six healthy donors of iDC and mature DC phenotype, exposed for 48 hrs to different maturation stimuli. Results are expressed as MFI and each symbol represents one donor.



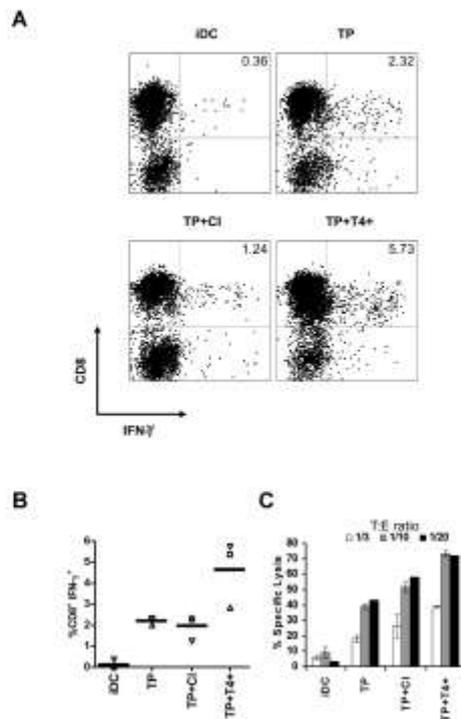
**Fig. 3** DC matured sequentially with CD4+ T cells as a secondary signal produce high levels of inflammatory cytokines and chemokines. Supernatants were collected from iDC and mature DC exposed for 48 hrs to different maturation stimuli: TNF- $\alpha$  and poly I:C (TP), TP followed 10 hrs later by CD40-L and IFN- $\gamma$  (TP+CI) or T4+ (TP+T4+). Cytokines (IL-10, IL-12p70, IL-6) and chemokines (CCL3, CCL4,) were measured in supernatants using commercially available BD Cytometric Bead Array kits, according to the manufacturer's protocol. Each symbol represents one donor.



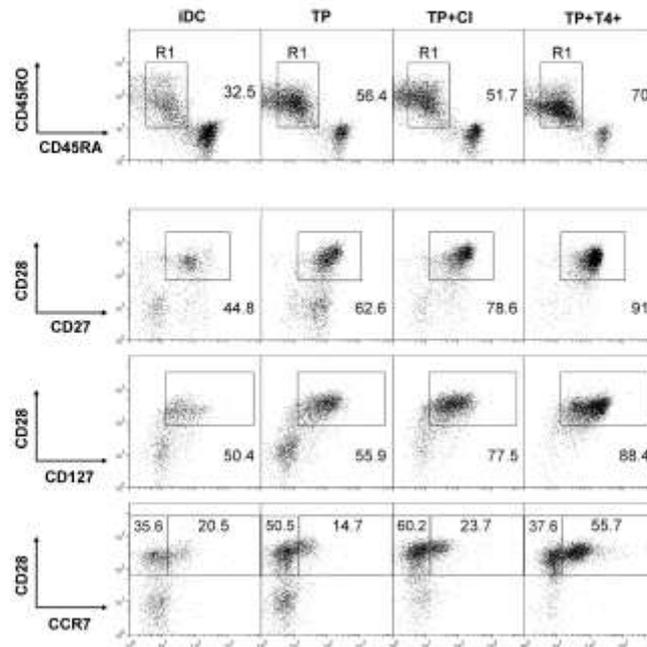
**Fig. 4** DC matured sequentially with CD4<sup>+</sup> T cells as a secondary signal favor Th1 responses. DC were loaded with ovalbumin, activated by the indicated maturation agents and used to stimulate autologous CD4<sup>+</sup> T lymphocytes at a 1:10 DC/T cell ratio. (A) After 14 days, T cells were re-stimulated with PMA/calcium ionomycin for 6 hrs and the production of IL-4 and IFN- $\gamma$  was measured by intracellular staining and flow cytometry. The percentages of cells in the corresponding quadrants are indicated on the dot plot. A representative experiment for one donor out of five is shown. (B) The ratio of cells producing exclusively IFN- $\gamma$  or IL-4 was determined from five independent experiments. Each symbol represents one donor.



**Fig. 5** DC matured sequentially with CD4+ T cells as a secondary signal reduce CD4+CD25+FoxP3+ T cell responses. DC loaded with ovalbumin were activated by the indicated maturation agents and used to stimulate autologous CD4+ T lymphocytes at a 1:10 DC/T cell ratio. (A) After 14 days, the percentage of regulatory T cells was determined by intracellular staining of FoxP3 and surface staining of CD25 on CD4+ cells by flow cytometry. (B) The percentage of regulatory T cells was determined from five independent experiments by staining of FoxP3 and CD25 on CD4+ cells. Each symbol represents one donor.



**Fig. 6** DC matured sequentially with CD4+ T cells as a secondary signal, generate cytotoxic T cells. DC activated by the indicated maturation agents were loaded with Melan-A<sub>(26-35)</sub> A27L peptide, and used to stimulate autologous CD8+ T lymphocytes at a 1:10 DC/T cell ratio. (A) After 6 days, T cells were re-stimulated with unloaded or Melan-A peptide-loaded T2 cells for 6 hrs and the production of IFN- $\gamma$  by CD8+ T cells was measured by intracellular staining and flow cytometry. The percentages of IFN- $\gamma$ + CD8+ T cells are indicated on the dot plot. A representative experiment for one donor out of three is shown. (B) The percentage of IFN- $\gamma$ + CD8+ T cells responding to Melan-A peptide was determined from three independent experiments. Each symbol represents one donor. (C) CD8+ T cells were incubated for 4 hrs with Melan-A peptide and <sup>51</sup>Cr loaded T2 cells at Effector:Target ratios of 3:1 (white), 10:1 (grey), 20:1 (black). The percentage of lysis was then measured by Cr51 release compared to spontaneous and maximal release. A representative experiment for one donor out of three is shown.



**Fig. 7** DC matured sequentially with CD4<sup>+</sup> T cells as a secondary signal favor the generation of CD8<sup>+</sup> T cells exhibiting a memory phenotype. DC were activated by the indicated maturation agents, loaded with Melan-A<sub>(26-35)</sub> A27L peptide, and used to stimulate autologous CD8<sup>+</sup> T lymphocytes at a DC/T cell ratio of 1:10. After 15 days, the CD8<sup>+</sup> T cell memory profile was determined by immunofluorescence and flow cytometry. T cells were gated according to their morphological properties and CD28, CD27, CD127 and CCR7 expression was studied on the CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>int</sup> T cell population (R1 gate). The percentage of gated cells is indicated on the dot plot. A representative experiment for one donor out of three is shown.

## II.3) Résultats supplémentaires

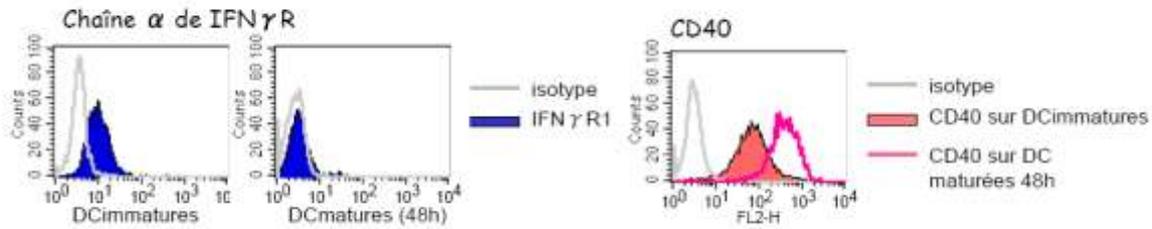


Figure A: Marquage en cytométrie en flux de CD119 (IFN $\gamma$ R1) et CD40 sur des DC immatures et matures (TNF $\alpha$  + polyIC). Le CD119 diminue avec la maturation alors que le CD40 augmente. A 10-12h de maturation, les DC sont à un stade intermédiaire où elles expriment les deux récepteurs.

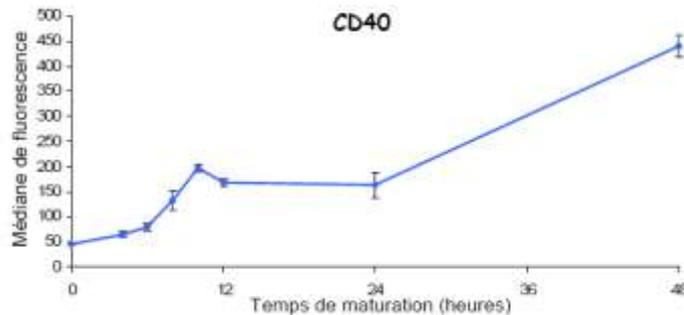


Figure B : Cinétique de marquage en cytométrie en flux de CD40 sur des DC maturées par un signal court (10 heures de TNF $\alpha$  + polyIC). Le CD40 augmente pendant toute la durée de stimulation par TNF + polyIC, stagne ensuite quelques heures, puis ré-augmente. En stimulation continue par les agents maturants, il augmente de manière constante.

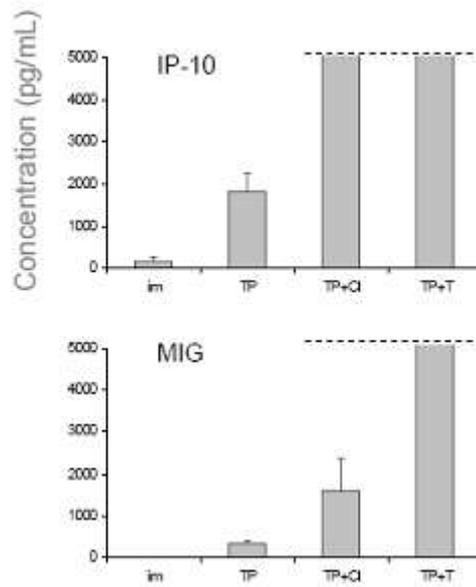


Figure C: Sécrétions de Mig et IP-10 dans des surnageants de DC maturées (48h) selon différentes conditions (mesurées par le kit Flex CBA, BD Biosciences).

im : immature ; TP :  $TNF\alpha$ +polyIC ; TP+CI :  $TNF\alpha$ +polyIC suivi 10 heures plus tard de CD40L+ $IFN\gamma$  ; TP+T :  $TNF\alpha$ +polyIC suivi 10 heures plus tard de lymphocytes T CD4 allogéniques activés ; On remarque que Mig et IP-10 sont fortement induites par une maturation séquentielle, notamment avec des lymphocytes T activés.

***DISCUSSION***  
***PERSPECTIVES***

## DISCUSSION - PERSPECTIVES

De nombreux cancers restent réfractaires aux traitements conventionnels, ce qui rend nécessaire le développement de nouvelles approches thérapeutiques. La pertinence de l'immunothérapie par DC a été largement démontrée *in vitro* et dans différents modèles animaux. Dès lors, la vaccination anti-tumorale par DC a été testée chez l'homme. Plusieurs auteurs dressent un premier bilan de ces vaccinations (Ridgway 2003; Schuler, Schuler-Thurner et al. 2003; Figdor, de Vries et al. 2004; Banchereau and Palucka 2005; Nestle, Farkas et al. 2005)(cf annexes). Les approches utilisées pour la vaccination anti-tumorale par DC sont très diverses et il est à l'heure actuelle difficile de favoriser une méthode plutôt qu'une autre.

Toutefois, il semble nécessaire d'améliorer la méthodologie d'obtention *ex vivo* des DC à des fins de vaccination. En particulier, la standardisation des protocoles de production se présente aujourd'hui comme une priorité. Les modes de préparation des DC, très différents d'un laboratoire à l'autre, compliquent la comparaison des résultats. Certains paramètres sont difficilement standardisables puisqu'ils sont inhérents à la stratégie choisie par chaque équipe. C'est le cas par exemple pour le choix des précurseurs, des méthodes de chargement ou des agents de maturation. Par contre, la variabilité peut aussi provenir de l'utilisation de réactifs ou de produits thérapeutiques annexes, qui peuvent quant à eux faire l'objet de standardisation. Dans un premier temps, nous avons donc établi des conditions de culture standardisées, favorables à l'obtention de DC pour une utilisation clinique (Royer, Tanguy-Royer et al. 2006). Ce mode de production est à la base de deux essais cliniques concernant la LAM (Leucémie Aigue Myéloblastique) et le CHC (Carcinome Hépatocellulaire)..

Malgré la détection d'une réponse immunologique pour la majorité des patients traités par DC, l'efficacité clinique de ce type de vaccination reste décevante. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Premièrement, une grande majorité de ces essais cliniques ont été réalisés chez des patients présentant un cancer en stade terminal, avec souvent une résistance à la chimiothérapie et la radiothérapie et une invasion tumorale importante. Deuxièmement, la chimiothérapie et la radiothérapie peuvent, dans certains cas, avoir un effet délétère sur le système immunitaire et son activation. Dans ces conditions, la réponse immune induite par les

DC injectées n'est sans doute pas suffisante. De plus, les cellules tumorales développent différentes stratégies qui leur permettent d'échapper à la reconnaissance et à la destruction par le système immunitaire, tel qu'un défaut de présentation d'antigènes (Campoli, Chang et al. 2002; Miller and Pisa 2005), la production d'un environnement immunosuppresseur (sécrétion de TGF $\beta$  et d'IL10 (Beissert, Hosoi et al. 1995; De Smedt, Van Mechelen et al. 1997; Steinbrink, Wolfl et al. 1997; Castellino and Germain 2006)) et une résistance à l'apoptose (Malmberg et Ljunggren, 2006). L'équipe du Pr. Nestle a montré, chez des patients atteints de lymphome T cutané, que la réponse clinique était associée à l'étendue de la tumeur, les régressions étant préférentiellement observées chez les patients avec une faible masse tumorale lors de la vaccination (Maier, Tun-Kyi et al. 2003). Le traitement de patients présentant une pathologie avancée paraît donc aujourd'hui illusoire et l'immunothérapie par DC s'oriente plutôt vers la vaccination de patients à des stades précoces de la maladie ou après un traitement conventionnel lorsque leur masse tumorale est minime.

A ce titre, associer l'immunothérapie avec la chimiothérapie ou la radiothérapie présente plusieurs intérêts. La chimiothérapie et la radiothérapie réduisent en effet l'importance de la masse tumorale. En outre, elles peuvent permettre la libération d'antigènes tumoraux dans un contexte immunogénique (Hallahan, Spriggs et al. 1989; Sherman, Datta et al. 1991; Obeid, Tesniere et al. 2007). Par ailleurs, beaucoup d'antigènes tumoraux sont impliqués dans les phénomènes de résistances aux drogues. Il est donc vraisemblable que l'immunothérapie par DC, en ciblant ces antigènes, puisse sensibiliser les cellules tumorales à la chimiothérapie (Liu, Black et al. 2006).

L'avenir de la vaccination est donc sans doute dans sa combinaison avec d'autres approches thérapeutiques. De nombreuses possibilités sont alors disponibles. Le conditionnement du site d'injection par l'administration de TNF $\alpha$  permet d'augmenter la migration des DC (Martín-Fontecha, Sebastiani et al. 2003), l'administration d'adjuvants comme l'IFN de type I (Banchereau and Palucka 2005) ou la molécule CpG ODN (CpG Oligodeoxynucleotide) (Hiraoka, Yamamoto et al. 2004) favorise quant à elle l'émergence de réponses de type Th1.

L'IL-2 est une cytokine qui favorise la prolifération et l'activité des lymphocytes T (Li, Demirci et al. 2001). Elle peut être co-administrée avec des DC afin de favoriser les réponses immunitaires et cliniques (Escobar, Lopez et al. 2005; Wei, Sticca et al. 2006). Son utilisation reste cependant limitée en immunothérapie puisqu'elle peut réduire la réponse T par le

phénomène d'AICD (Activation-Induced Cell Death) (Waldmann, Dubois et al. 2001) et favoriser la prolifération des Treg qui sont responsables de la suppression de la réponse immune anti-tumorale (Ahmadzadeh and Rosenberg 2006). En outre, elle se révèle toxique à forte dose (Dudley, Wunderlich et al. 2002). Par contre, un intérêt croissant est porté sur l'IL-15 (Rubinstein, Kadima et al. 2002; Gatzka and Okada 2006). Cette cytokine favorise en effet la prolifération des lymphocytes T mémoires, l'activation des cellules NK et contrairement à l'IL-2, elle a un effet anti-apoptotique (Li, Demirci et al. 2001). L'injection d'autres cytokines comme l'IL-7 ou l'IL-21 peut également être envisagée (Zou and Tam 2002). Cette méthode permettrait de palier l'absence d'induction de lymphocytes T mémoires à long terme observée lors de vaccinations utilisant les DC.

Récemment, beaucoup de progrès ont été réalisés dans l'induction de lymphocyte T mémoire chez l'animal et l'homme (Sallusto, Lenig et al. 1999; Geginat, Sallusto et al. 2001; Castellino and Germain 2007; Miller, van der Most et al. 2008). L'implication des lymphocytes helpers CD4 dans ce phénomène semble de plus en plus évidente (Trautmann and Valitutti 2003). Cependant, la majorité de ces essais cliniques utilisant les DC ont été élaborés pour induire une réponse CD8+ cytotoxique sans prendre en compte l'utilisation d'antigènes tumoraux également spécifiques des lymphocytes T helpers CD4. Dans le meilleur des cas, des antigènes reconnus par les lymphocytes CD4 sans relation avec les cellules tumorales ont été sélectionnés. C'est le cas par exemple de la KLH (Key hole limpet hémocyanin) (Nestle, Alijagic et al. 1998; Timmerman, Czerwinski et al. 2002; Hus, Rolinski et al. 2005). Pourtant, les lymphocytes T CD4 en plus de leur rôle « helper » sont également capables d'activités cytotoxiques vis-à-vis de la tumeur (Chiari, Hames et al. 2000; Larrieu, Ouisse et al. 2007) contribuant ainsi à la phase effectrice en partenariat avec les lymphocytes T CD8 cytotoxiques. De plus, lorsque la source d'antigènes tumoraux était compatible avec l'induction d'une réponse CD4 spécifique (utilisation de protéines ou de cellules tumorales mortes), le monitoring de cette réponse n'était pas réalisée car focalisée sur l'expansion de lymphocyte T CD8 cytotoxiques. Ainsi, sans résultats concernant la réponse des lymphocytes T CD4 dans les essais cliniques, il est difficile d'évaluer leur rôle. Une récente étude clinique a toutefois apporté un élément de réponse (Hunder, Wallen et al. 2008). L'équipe du Pr. Yee a en effet injecté des lymphocytes CD4+ spécifiques de l'antigène tumoral NY-ESO chez un patient présentant un mélanome métastatique avancé induisant par là même une rémission clinique durable. En outre, nous avons également démontré que seule l'action de lymphocytes T CD4+ activés sur des DC humaines préalablement maturées au TNF $\alpha$  / Poly I:C permettait à celles-ci de générer fortement des

lymphocytes T CD8 mémoires. L'utilisation de lymphocytes T CD4 activés comme second signal de maturation pour les DC favorise également l'induction d'une réponse CD4+ de profil Th1 tout en limitant la prolifération de lymphocytes T régulateurs, autant de paramètres essentiels à l'efficacité de la vaccination anti-tumorale.

L'immunothérapie, qui vise à induire des réponses cytotoxiques, tout en limitant les phénomènes de régulation ou de tolérance, et en induisant une mémoire immunitaire, a un avenir certain avec l'utilisation des DC. L'amélioration des protocoles de culture, de maturation, d'injection de ces cellules sera le point clé des années à venir. En particulier, favoriser la rencontre des DC avec les lymphocytes CD4 helpers semble très prometteur.

***REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES***

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarntzen, E. H., C. G. Figdor, et al. (2008). "Dendritic cell vaccination and immune monitoring." *Cancer Immunol Immunother* **57**(10): 1559-68.
- Aerts-Toegaert, C., C. Heirman, et al. (2007). "CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses." *Eur J Immunol* **37**(3): 686-95.
- Agadjanyan, M. G., J. J. Kim, et al. (1999). "CD86 (B7-2) can function to drive MHC-restricted antigen-specific CTL responses in vivo." *J Immunol* **162**(6): 3417-27.
- Aggarwal, S., N. Ghilardi, et al. (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." *J Biol Chem* **278**(3): 1910-4.
- Agrawal, S., A. Agrawal, et al. (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**(10): 4984-9.
- Ahmadzadeh, M. and S. A. Rosenberg (2006). "IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients." *Blood* **107**(6): 2409-14.
- Akiba, H., Y. Miyahira, et al. (2000). "Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis." *J Exp Med* **191**(2): 375-80.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.
- Albert, M. L., M. Jegathesan, et al. (2001). "Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells." *Nat Immunol* **2**(11): 1010-7.
- Albert, M. L., B. Sauter, et al. (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-9.
- Amsen, D., J. M. Blander, et al. (2004). "Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells." *Cell* **117**(4): 515-26.
- Andreesen, R., B. Hennemann, et al. (1998). "Adoptive immunotherapy of cancer using monocyte-derived macrophages: rationale, current status, and perspectives." *J Leukoc Biol* **64**(4): 419-26.
- Appelmelk, B. J., I. van Die, et al. (2003). "Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells." *J Immunol* **170**(4): 1635-9.
- Asea, A., M. Rehli, et al. (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." *J Biol Chem* **277**(17): 15028-34.
- Atreya, R., J. Mudter, et al. (2000). "Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo." *Nat Med* **6**(5): 583-8.
- Avigan, D., B. Vasir, et al. (2004). "Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses." *Clin Cancer Res* **10**(14): 4699-708.
- Babatz, J., C. Rollig, et al. (2003). "Large-scale immunomagnetic selection of CD14+ monocytes to generate dendritic cells for cancer immunotherapy: a phase I study." *J Hematother Stem Cell Res* **12**(5): 515-23.
- Bachmann, M. F., B. R. Wong, et al. (1999). "TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation." *J Exp Med* **189**(7): 1025-31.
- Bajtay, Z., E. Csomor, et al. (2006). "Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells." *Immunol Lett* **104**(1-2): 46-52.

- Balashov, K. E., S. J. Khoury, et al. (1995). "Inhibition of T cell responses by activated human CD8+ T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis." *J Clin Invest* **95**(6): 2711-9.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and A. K. Palucka (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." *Nat Rev Immunol* **5**(4): 296-306.
- Banchereau, J., B. Schuler-Thurner, et al. (2001). "Dendritic cells as vectors for therapy." *Cell* **106**(3): 271-4.
- Banchereau, J., H. Ueno, et al. (2005). "Immune and clinical outcomes in patients with stage IV melanoma vaccinated with peptide-pulsed dendritic cells derived from CD34+ progenitors and activated with type I interferon." *J Immunother* **28**(5): 505-16.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, et al. (2006). "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection." *Nature* **439**(7077): 682-7.
- Baselga, J., D. Tripathy, 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**(3): 737-44.
- Basu, S., R. J. Binder, et al. (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**(11): 1539-46.
- Bates, E. E., N. Fournier, et al. (1999). "APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif." *J Immunol* **163**(4): 1973-83.
- Baumgaertner, P., N. Rufer, et al. (2006). "Ex vivo detectable human CD8 T-cell responses to cancer-testis antigens." *Cancer Res* **66**(4): 1912-6.
- Becker, T., F. U. Hartl, et al. (2002). "CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes." *J Cell Biol* **158**(7): 1277-85.
- Bedrosian, I., R. Mick, et al. (2003). "Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients." *J Clin Oncol* **21**(20): 3826-35.
- Beissert, S., J. Hosoi, et al. (1995). "IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells." *J Immunol* **154**(3): 1280-6.
- Belles, C., A. Kuhl, et al. (1999). "Plasma membrane expression of heat shock protein 60 in vivo in response to infection." *Infect Immun* **67**(8): 4191-200.
- Bellinghausen, I., P. Brand, et al. (2003). "Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6." *Immunology* **108**(2): 167-76.
- Ben-Sasson, S. Z., G. Le Gros, et al. (1990). "IL-4 production by T cells from naive donors. IL-2 is required for IL-4 production." *J Immunol* **145**(4): 1127-36.
- Benlalam, H., V. Vignard, et al. (2006). "Infusion of Melan-A/Mart-1 specific tumor-infiltrating lymphocytes enhanced relapse-free survival of melanoma patients." *Cancer Immunol Immunother*.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, et al. (1997). "Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help." *J Exp Med* **186**(1): 65-70.
- Berard, F., P. Blanco, et al. (2000). "Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells." *J Exp Med* **192**(11): 1535-44.

- Berger, T. G., B. Feuerstein, et al. (2002). "Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories." *J Immunol Methods* **268**(2): 131-40.
- Berger, T. G., E. Strasser, et al. (2005). "Efficient elutriation of monocytes within a closed system (Elutra) for clinical-scale generation of dendritic cells." *J Immunol Methods* **298**(1-2): 61-72.
- Bernad, A., M. Kopf, et al. (1994). "Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system." *Immunity* **1**(9): 725-31.
- Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-8.
- Bevan, M. J. (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." *J Exp Med* **143**(5): 1283-8.
- Blank, C., H. Fuchs, et al. (1993). "Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*." *J Infect Dis* **167**(2): 418-25.
- Boccaccio, C., S. Jacod, et al. (2002). "Identification of a clinical-grade maturation factor for dendritic cells." *J Immunother* **25**(1): 88-96.
- Boisteau, O., F. Gautier, et al. (1997). "Apoptosis induced by sodium butyrate treatment increases immunogenicity of a rat colon tumor cell line." *Apoptosis* **2**(4): 403-12.
- Bonecchi, R., G. Bianchi, et al. (1998). "Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s." *J Exp Med* **187**(1): 129-34.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, et al. (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**(12): 1627-38.
- Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, et al. (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." *J Exp Med* **197**(1): 101-9.
- Bourgeois, C., H. Veiga-Fernandes, et al. (2002). "CD8 lethargy in the absence of CD4 help." *Eur J Immunol* **32**(8): 2199-207.
- Brandt, K., P. B. Singh, et al. (2007). "Interleukin-21: a new modulator of immunity, infection, and cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* **18**(3-4): 223-32.
- Braun, D., R. S. Longman, et al. (2005). "A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation." *Blood* **106**(7): 2375-81.
- Bukczynski, J., T. Wen, et al. (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**(5): 1291-6.
- Butterfield, L. H., A. Ribas, et al. (2003). "Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma." *Clin Cancer Res* **9**(3): 998-1008.
- Cambi, A., M. Koopman, et al. (2005). "How C-type lectins detect pathogens." *Cell Microbiol* **7**(4): 481-8.
- Campbell, J. J., K. E. Murphy, et al. (2001). "CCR7 expression and memory T cell diversity in humans." *J Immunol* **166**(2): 877-84.
- Campoli, M., C. C. Chang, et al. (2002). "HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection." *Vaccine* **20 Suppl 4**: A40-5.
- Camporeale, A., A. Boni, et al. (2003). "Critical impact of the kinetics of dendritic cells activation on the in vivo induction of tumor-specific T lymphocytes." *Cancer Res* **63**(13): 3688-94.

- Carr, J. M., M. J. Carrasco, et al. (2006). "CD27 mediates interleukin-2-independent clonal expansion of the CD8+ T cell without effector differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(51): 19454-9.
- Carrasco, Y. R., S. J. Fleire, et al. (2004). "LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation." Immunity **20**(5): 589-99.
- Castellino, F. and R. N. Germain (2006). "Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how." Annu Rev Immunol **24**: 519-40.
- Castellino, F. and R. N. Germain (2007). "Chemokine-guided CD4+ T cell help enhances generation of IL-6RalphahighIL-7Ralpha high prememory CD8+ T cells." J Immunol **178**(2): 778-87.
- Caux, C., C. Massacrier, et al. (1994). "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking." J Exp Med **180**(4): 1263-72.
- Caux, C., B. Vanbervliet, et al. (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." J Exp Med **184**(2): 695-706.
- Cella, M., F. Sallusto, et al. (1997). "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." Curr Opin Immunol **9**(1): 10-6.
- Center, D. M., H. Kornfeld, et al. (1996). "Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand." Immunol Today **17**(10): 476-81.
- Chabot, V., P. Reverdiau, et al. (2006). "CCL5-enhanced human immature dendritic cell migration through the basement membrane in vitro depends on matrix metalloproteinase-9." J Leukoc Biol **79**(4): 767-78.
- Chang, C. C., R. Ciubotariu, et al. (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." Nat Immunol **3**(3): 237-43.
- Chapoval, A. I., J. Ni, et al. (2001). "B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production." Nat Immunol **2**(3): 269-74.
- Chen, X. Q., J. Yang, et al. (2006). "Increased expression of CD86 and reduced production of IL-12 and IL-10 by monocyte-derived dendritic cells from allergic asthmatics and their effects on Th1- and Th2-type cytokine balance." Respiration **73**(1): 34-40.
- Chiari, R., G. Hames, et al. (2000). "Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules." Cancer Res **60**(17): 4855-63.
- Claxton, D. F., J. McManis, et al. (2001). "Therapeutic potential of leukemia-derived dendritic cells: preclinical and clinical progress." Crit Rev Immunol **21**(1-3): 147-55.
- Colombat, P., G. Salles, 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**(1): 101-6.
- Compte, E., P. Pontarotti, et al. (2004). "Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells." Eur J Immunol **34**(8): 2089-99.
- Cooper, M. A., J. E. Bush, et al. (2002). "In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells." Blood **100**(10): 3633-8.
- Cousens, L. P., J. S. Orange, et al. (1997). "Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 634-9.
- Cramer, S. O., C. Trumpheller, et al. (2000). "Activation-induced expression of murine CD83 on T cells and identification of a specific CD83 ligand on murine B cells." Int Immunol **12**(9): 1347-51.
- Creagh, E. M. and L. A. O'Neill (2006). "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity." Trends Immunol **27**(8): 352-7.

- Croft, M. (2003). "Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?" *Nat Rev Immunol* **3**(8): 609-20.
- Curti, A., M. Ratta, et al. (2001). "Interleukin-11 induces Th2 polarization of human CD4(+) T cells." *Blood* **97**(9): 2758-63.
- Dawicki, W. and T. H. Watts (2004). "Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo." *Eur J Immunol* **34**(3): 743-51.
- de Jong, E. C., H. H. Smits, et al. (2005). "Dendritic cell-mediated T cell polarization." *Springer Semin Immunopathol* **26**(3): 289-307.
- De Smedt, T., M. Van Mechelen, et al. (1997). "Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function." *Eur J Immunol* **27**(5): 1229-35.
- De Vries, I. J., D. J. Krooshoop, 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**(1): 12-7.
- de Vries, I. J., W. J. Lesterhuis, et al. (2005). "Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy." *Nat Biotechnol* **23**(11): 1407-13.
- de Vries, I. J., W. J. Lesterhuis, et al. (2003). "Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients." *Clin Cancer Res* **9**(14): 5091-100.
- Delamarre, L., H. Holcombe, et al. (2003). "Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation." *J Exp Med* **198**(1): 111-22.
- Delluc, S., L. Tourneur, et al. (2005). "Autologous peptides eluted from acute myeloid leukemia cells can be used to generate specific antileukemic CD4 helper and CD8 cytotoxic T lymphocyte responses in vitro." *Haematologica* **90**(8): 1050-62.
- Delneste, Y., N. Herbault, et al. (1999). "Vasoactive intestinal peptide synergizes with TNF-alpha in inducing human dendritic cell maturation." *J Immunol* **163**(6): 3071-5.
- Delneste, Y., G. Magistrelli, et al. (2002). "Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation." *Immunity* **17**(3): 353-62.
- Delon, J., K. Kaibuchi, et al. (2001). "Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin." *Immunity* **15**(5): 691-701.
- Demartino, G. N. and T. G. Gillette (2007). "Proteasomes: machines for all reasons." *Cell* **129**(4): 659-62.
- Deng, H., R. Apple, et al. (1993). "Determinant capture as a possible mechanism of protection afforded by major histocompatibility complex class II molecules in autoimmune disease." *J Exp Med* **178**(5): 1675-80.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, et al. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." *J Exp Med* **193**(2): 233-8.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, et al. (1999). "Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells." *J Clin Invest* **104**(2): 173-80.
- Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, et al. (2000). "Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors." *J Exp Med* **192**(5): 705-18.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, et al. (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." *J Exp Med* **188**(2): 373-86.
- Dillman, R. O., L. D. Beutel, et al. (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**(1): 51-66.

- Dinareello, C. A. (1991). "Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism." *Blood* **77**(8): 1627-52.
- Dorfel, D., S. Appel, et al. (2005). "Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA." *Blood* **105**(8): 3199-205.
- Dreno, B., J. M. Nguyen, et al. (2002). "Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma." *Cancer Immunol Immunother* **51**(10): 539-46.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." *Science* **298**(5594): 850-4.
- Dudziak, D., F. Nimmerjahn, et al. (2005). "Alternative splicing generates putative soluble CD83 proteins that inhibit T cell proliferation." *J Immunol* **174**(11): 6672-6.
- Dumitriu, I. E., M. E. Bianchi, et al. (2007). "The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells." *J Leukoc Biol* **81**(1): 84-91.
- Dustin, M. L. and J. A. Cooper (2000). "The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling." *Nat Immunol* **1**(1): 23-9.
- Ebert, L. M., P. Schaerli, et al. (2005). "Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues." *Mol Immunol* **42**(7): 799-809.
- Ebner, S., G. Ratzinger, et al. (2001). "Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4." *J Immunol* **166**(1): 633-41.
- Egen, J. G. and J. P. Allison (2002). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength." *Immunity* **16**(1): 23-35.
- Elkord, E., P. E. Williams, et al. (2005). "Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells." *Immunology* **114**(2): 204-12.
- Engering, A., T. B. Geijtenbeek, et al. (2002). "The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells." *J Immunol* **168**(5): 2118-26.
- Escobar, A., M. Lopez, et al. (2005). "Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients." *Clin Exp Immunol* **142**(3): 555-68.
- Fanger, N. A., K. Wardwell, et al. (1996). "Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." *J Immunol* **157**(2): 541-8.
- Faradji, A., A. Bohbot, 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**(1-2): 297-309.
- Feau, S., V. Facchinetti, et al. (2005). "Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice." *Blood* **105**(2): 697-702.
- Fehervari, Z. and S. Sakaguchi (2004). "Control of Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cell activation and function by dendritic cells." *Int Immunol* **16**(12): 1769-80.
- Felzmann, T., V. Witt, et al. (2003). "Monocyte enrichment from leukapheresis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection." *Cytotherapy* **5**(5): 391-8.
- Ferlazzo, G., M. Pack, et al. (2004). "Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16606-11.
- Ferlazzo, G., M. L. Tsang, et al. (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells." *J Exp Med* **195**(3): 343-51.

- Fields, R. C., K. Shimizu, et al. (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**(16): 9482-7.
- Figdor, C. G., I. J. de Vries, et al. (2004). "Dendritic cell immunotherapy: mapping the way." Nat Med **10**(5): 475-80.
- Fillatreau, S. and D. Gray (2003). "T cell accumulation in B cell follicles is regulated by dendritic cells and is independent of B cell activation." J Exp Med **197**(2): 195-206.
- Flo, T. H., O. Halaas, et al. (2001). "Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells." J Leukoc Biol **69**(3): 474-81.
- Floto, R. A., P. A. MacAry, et al. (2006). "Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5." Science **314**(5798): 454-8.
- Fong, L., D. Brockstedt, et al. (2001). "Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy." J Immunol **167**(12): 7150-6.
- Fong, L., D. Brockstedt, et al. (2001). "Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients." J Immunol **166**(6): 4254-9.
- Fong, L., Y. Hou, et al. (2001). "Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8809-14.
- Fontenot, J. D. and A. Y. Rudensky (2005). "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3." Nat Immunol **6**(4): 331-7.
- Friedl, P., A. T. den Boer, et al. (2005). "Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse." Nat Rev Immunol **5**(7): 532-45.
- Fritz, J. H., S. E. Girardin, et al. (2005). "Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists." Eur J Immunol **35**(8): 2459-70.
- Frucht, D. M., T. Fukao, et al. (2001). "IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge." Trends Immunol **22**(10): 556-60.
- Fujii, S., K. Liu, et al. (2004). "The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation." J Exp Med **199**(12): 1607-18.
- Fujimoto, Y., L. Tu, et al. (2002). "CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus." Cell **108**(6): 755-67.
- Fukao, T., S. Matsuda, et al. (2000). "Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells." J Immunol **164**(1): 64-71.
- Gatza, E. and C. Y. Okada (2006). "Adjuvant IL-15 does not enhance the efficacy of tumor cell lysate-pulsed dendritic cell vaccines for active immunotherapy of T cell lymphoma." Cancer Immunol Immunother **55**(4): 420-32.
- Gauldie, J., C. Richards, et al. (1987). "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7251-5.
- Geginat, J., F. Sallusto, et al. (2001). "Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells." J Exp Med **194**(12): 1711-9.
- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, et al. (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." Cell **100**(5): 587-97.
- Gerosa, F., A. Gobbi, et al. (2005). "The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions." J Immunol **174**(2): 727-34.
- Gett, A. V., F. Sallusto, et al. (2003). "T cell fitness determined by signal strength." Nat Immunol **4**(4): 355-60.

- Gil-Torregrosa, B. C., A. M. Lennon-Dumenil, et al. (2004). "Control of cross-presentation during dendritic cell maturation." *Eur J Immunol* **34**(2): 398-407.
- Gil, M. P., E. Bohn, et al. (2001). "Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6680-5.
- Gilboa, E. and J. Vieweg (2004). "Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells." *Immunol Rev* **199**: 251-63.
- Gildea, L. A., R. E. Morris, et al. (2001). "Histoplasma capsulatum yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells." *J Immunol* **166**(2): 1049-56.
- Ginhoux, F., F. Tacke, et al. (2006). "Langerhans cells arise from monocytes in vivo." *Nat Immunol* **7**(3): 265-73.
- Giordano, D., D. M. Magaletti, et al. (2006). "Nitric oxide and cGMP protein kinase (cGK) regulate dendritic-cell migration toward the lymph-node-directing chemokine CCL19." *Blood* **107**(4): 1537-45.
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, et al. (2003). "Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan." *Science* **300**(5625): 1584-7.
- Giri, J. G., S. Kumaki, et al. (1995). "Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor." *Embo J* **14**(15): 3654-63.
- Gitlitz, B. J., A. S. Belldegrun, et al. (2003). "A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma." *J Immunother* **26**(5): 412-9.
- Goldszmid, R. S., J. Idoyaga, et al. (2003). "Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma." *J Immunol* **171**(11): 5940-7.
- Goxe, B., N. Latour, et al. (1998). "Monocyte-derived dendritic cells: development of a cellular processor for clinical applications." *Res Immunol* **149**(7-8): 643-6.
- Granucci, F., I. Zanoni, et al. (2004). "A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation." *J Exp Med* **200**(3): 287-95.
- Gregoriadis, G. (1999). "DNA vaccines: a role for liposomes." *Curr Opin Mol Ther* **1**(1): 39-42.
- Grohmann, U., F. Fallarino, et al. (2001). "IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 alpha+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Immunol* **167**(2): 708-14.
- Grohmann, U., C. Orabona, et al. (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." *Nat Immunol* **3**(11): 1097-101.
- Groothuis, T. A. and J. Neefjes (2005). "The many roads to cross-presentation." *J Exp Med* **202**(10): 1313-8.
- Groux, H., A. O'Garra, et al. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* **389**(6652): 737-42.
- Guermonprez, P., L. Saveanu, et al. (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." *Nature* **425**(6956): 397-402.
- Gumbleton, M., A. G. Abulrob, et al. (2000). "Caveolae: an alternative membrane transport compartment." *Pharm Res* **17**(9): 1035-48.
- Gutzmer, R., B. Kother, et al. (2006). "Human Plasmacytoid Dendritic Cells Express Receptors for Anaphylatoxins C3a and C5a and Are Chemoattracted to C3a and C5a." *J Invest Dermatol*.
- Hallahan, D. E., D. R. Spriggs, et al. (1989). "Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(24): 10104-7.
- Hamann, D., S. Kostense, et al. (1999). "Evidence that human CD8+CD45RA+CD27- cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division." *Int Immunol* **11**(7): 1027-33.

- Hanabuchi, S., N. Watanabe, et al. (2006). "Human plasmacytoid dendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL)." Blood **107**(9): 3617-23.
- Harrison, B. D., J. A. Adams, et al. (2001). "Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia." Blood **97**(9): 2764-71.
- Hartgers, F. C., C. G. Figdor, et al. (2000). "Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology." Immunol Today **21**(11): 542-5.
- Heiser, A., D. Coleman, et al. (2002). "Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors." J Clin Invest **109**(3): 409-17.
- Hendriks, J., L. A. Gravestien, et al. (2000). "CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity." Nat Immunol **1**(5): 433-40.
- Hennemann, B., A. Rehm, et al. (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**(5): 365-71.
- Hersey, P., S. W. Menzies, et al. (2004). "Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma." Cancer Immunol Immunother **53**(2): 125-34.
- Hirano, T., T. Taga, et al. (1985). "Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2)." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(16): 5490-4.
- Hiraoka, K., S. Yamamoto, et al. (2004). "Enhanced tumor-specific long-term immunity of hemagglutinating [correction of hemagglutinating] virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides." J Immunol **173**(7): 4297-307.
- Hochweller, K. and S. M. Anderton (2005). "Kinetics of costimulatory molecule expression by T cells and dendritic cells during the induction of tolerance versus immunity in vivo." Eur J Immunol **35**(4): 1086-96.
- Hoene, V., M. Peiser, et al. (2006). "Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19." J Leukoc Biol.
- Holtl, L., C. Zelle-Rieser, et al. (2002). "Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells." Clin Cancer Res **8**(11): 3369-76.
- Horie, S., Y. Okubo, et al. (1997). "Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis." Intern Med **36**(3): 179-85.
- Hosken, N. A., K. Shibuya, et al. (1995). "The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model." J Exp Med **182**(5): 1579-84.
- Hsu, F. J., C. Benike, et al. (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." Nat Med **2**(1): 52-8.
- Huehn, J., K. Siegmund, et al. (2004). "Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells." J Exp Med **199**(3): 303-13.
- Huges, S., L. Fetler, et al. (2004). "Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity." Nat Immunol **5**(12): 1235-42.
- Hunder, N. N., H. Wallen, et al. (2008). "Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1." N Engl J Med **358**(25): 2698-703.
- Huppa, J. B. and M. M. Davis (2003). "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." Nat Rev Immunol **3**(12): 973-83.

- Hus, I., J. Rolinski, et al. (2005). "Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Leukemia* **19**(9): 1621-7.
- Hyodo, Y., K. Matsui, et al. (1999). "IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor." *J Immunol* **162**(3): 1662-8.
- Ishida, M., Y. Iwai, et al. (2002). "Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues." *Immunol Lett* **84**(1): 57-62.
- Ishii, K. J., C. Coban, et al. (2006). "A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA." *Nat Immunol* **7**(1): 40-8.
- Itano, A. A., S. J. McSorley, et al. (2003). "Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity." *Immunity* **19**(1): 47-57.
- Ito, T., R. Amakawa, et al. (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." *J Exp Med* **195**(11): 1507-12.
- Iwai, Y., M. Ishida, et al. (2002). "Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12293-7.
- Jacobsen, M., D. Schweer, et al. (2000). "A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis." *Nat Genet* **26**(4): 495-9.
- Janssen, E. M., E. E. Lemmens, et al. (2003). "CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes." *Nature* **421**(6925): 852-6.
- Jarrossay, D., G. Napolitani, et al. (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **31**(11): 3388-93.
- Jego, G., A. K. Palucka, et al. (2003). "Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6." *Immunity* **19**(2): 225-34.
- Jenne, L., J. F. Arrighi, et al. (2000). "Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8+ T cells for efficient tumor cell lysis." *Cancer Res* **60**(16): 4446-52.
- Jenne, L., G. Schuler, et al. (2001). "Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy." *Trends Immunol* **22**(2): 102-7.
- Jerome, V., A. Graser, et al. (2006). "Cytotoxic T lymphocytes responding to low dose TRP2 antigen are induced against B16 melanoma by liposome-encapsulated TRP2 peptide and CpG DNA adjuvant." *J Immunother* **29**(3): 294-305.
- Jilek, S., H. P. Merkle, et al. (2005). "DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells." *Adv Drug Deliv Rev* **57**(3): 377-90.
- Jinushi, M., T. Takehara, et al. (2003). "Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection." *J Immunol* **170**(3): 1249-56.
- Johnson, B. E. and P. A. Janne (2006). "Rationale for a Phase II Trial of Pertuzumab, a HER-2 Dimerization Inhibitor, in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer." *Clin Cancer Res* **12**(14): 4436s-40s.
- Jonuleit, H., A. Giesecke-Tuettenberg, et al. (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**(2): 243-51.

- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (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**(9): 1213-22.
- Josien, R., H. L. Li, et al. (2000). "TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **191**(3): 495-502.
- Kadowaki, N., S. Ho, et al. (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." *J Exp Med* **194**(6): 863-9.
- Kaech, S. M. and R. Ahmed (2001). "Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells." *Nat Immunol* **2**(5): 415-22.
- Kaech, S. M. and R. Ahmed (2003). "Immunology. CD8 T cells remember with a little help." *Science* **300**(5617): 263-5.
- Kaech, S. M., J. T. Tan, et al. (2003). "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." *Nat Immunol* **4**(12): 1191-8.
- Kaisho, T. and S. Akira (2004). "Pleiotropic function of Toll-like receptors." *Microbes Infect* **6**(15): 1388-94.
- Kalady, M. F., M. W. Onaitis, et al. (2004). "Sequential delivery of maturation stimuli increases human dendritic cell IL-12 production and enhances tumor antigen-specific immunogenicity." *J Surg Res* **116**(1): 24-31.
- Kalinski, P., J. H. Schuitemaker, et al. (1999). "Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells." *J Immunol* **162**(6): 3231-6.
- Kamath, A. T., S. Henri, et al. (2002). "Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs." *Blood* **100**(5): 1734-41.
- Kanazawa, N., K. Tashiro, et al. (2003). "Dendritic cell immunoactivating receptor, a novel C-type lectin immunoreceptor, acts as an activating receptor through association with Fc receptor gamma chain." *J Biol Chem* **278**(35): 32645-52.
- Kaser, A., S. Dunzendorfer, et al. (2000). "B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells." *J Immunol* **165**(5): 2474-80.
- Kaser, A., S. Dunzendorfer, et al. (1999). "A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells." *J Immunol* **163**(6): 3232-8.
- Kato, H., S. Sato, et al. (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." *Immunity* **23**(1): 19-28.
- Katz, S. I., K. Tamaki, et al. (1979). "Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow." *Nature* **282**(5736): 324-6.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." *Cell Death Differ* **13**(5): 816-25.
- Keller, A. M., T. A. Groothuis, et al. (2007). "Costimulatory ligand CD70 is delivered to the immunological synapse by shared intracellular trafficking with MHC class II molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 5989-94.
- Kellermann, S. A., S. Hudak, et al. (1999). "The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells." *J Immunol* **162**(7): 3859-64.
- Kennedy, M. K., M. Glaccum, et al. (2000). "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice." *J Exp Med* **191**(5): 771-80.
- Kikutani, H. and A. Kumanogoh (2003). "Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells." *Nat Rev Immunol* **3**(2): 159-67.

- Kim, J. J., M. L. Bagarazzi, et al. (1997). "Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes." *Nat Biotechnol* **15**(7): 641-6.
- Kim, Y. J., S. H. Kim, et al. (1998). "Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses." *Eur J Immunol* **28**(3): 881-90.
- Kitazawa, Y., M. Fujino, et al. (2007). "Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses." *Transplantation* **83**(6): 774-82.
- Klinke, D. J., 2nd (2006). "The ratio of P40 monomer to dimer is an important determinant of IL-12 bioactivity." *J Theor Biol* **240**(2): 323-35.
- Kobayashi, M., L. Fitz, et al. (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." *J Exp Med* **170**(3): 827-45.
- Koch, F., U. Stanzl, et al. (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10." *J Exp Med* **184**(2): 741-6.
- Kodaira, Y., S. K. Nair, et al. (2000). "Phenotypic and functional maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate." *J Immunol* **165**(3): 1599-604.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* **256**(5517): 495-7.
- Kondrack, R. M., J. Harbertson, et al. (2003). "Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells." *J Exp Med* **198**(12): 1797-806.
- Kong, Y. Y., H. Yoshida, et al. (1999). "OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis." *Nature* **397**(6717): 315-23.
- Krathwohl, M. D. and J. L. Anderson (2006). "Chemokine CXCL10 (IP-10) is sufficient to trigger an immune response to injected antigens in a mouse model." *Vaccine* **24**(15): 2987-93.
- Krug, A., A. Towarowski, et al. (2001). "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." *Eur J Immunol* **31**(10): 3026-37.
- Kuchroo, V. K., M. P. Das, et al. (1995). "B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy." *Cell* **80**(5): 707-18.
- Kugler, A., G. Stuhler, et al. (2000). "Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids." *Nat Med* **6**(3): 332-6.
- Kuniyoshi, J. S., C. J. Kuniyoshi, et al. (1999). "Dendritic cell secretion of IL-15 is induced by recombinant huCD40LT and augments the stimulation of antigen-specific cytolytic T cells." *Cell Immunol* **193**(1): 48-58.
- Kuwano, Y., C. M. Prazma, et al. (2007). "CD83 influences cell-surface MHC class II expression on B cells and other antigen-presenting cells." *Int Immunol* **19**(8): 977-92.
- Langenkamp, A., M. Messi, et al. (2000). "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." *Nat Immunol* **1**(4): 311-6.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* **201**(2): 233-40.
- Lanzavecchia, A. (1985). "Antigen-specific interaction between T and B cells." *Nature* **314**(6011): 537-9.
- Lapteva, N., M. R. Seethammagari, et al. (2007). "Enhanced activation of human dendritic cells by inducible CD40 and Toll-like receptor-4 ligation." *Cancer Res* **67**(21): 10528-37.

- Larregina, A. T., A. E. Morelli, et al. (2004). "Highly efficient expression of transgenic proteins by naked DNA-transfected dendritic cells through terminal differentiation." Blood **103**(3): 811-9.
- Larrieu, P., L. H. Ouisse, et al. (2007). "A HLA-DQ5 restricted Melan-A/MART-1 epitope presented by melanoma tumor cells to CD4+ T lymphocytes." Cancer Immunol Immunother **56**(10): 1565-75.
- Le Bon, A., N. Etchart, et al. (2003). "Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon." Nat Immunol **4**(10): 1009-15.
- Leblond, C. P. and S. Inoue (1989). "Structure, composition, and assembly of basement membrane." Am J Anat **185**(4): 367-90.
- Lechmann, M., D. J. Krooshoop, et al. (2001). "The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells." J Exp Med **194**(12): 1813-21.
- Lee, A. W., T. Truong, et al. (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, K. H., A. D. Holdorf, et al. (2002). "T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation." Science **295**(5559): 1539-42.
- Lee, W. C., H. C. Wang, et al. (2005). "Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial." J Immunother **28**(5): 496-504.
- Legge, K. L. and T. J. Braciale (2003). "Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection." Immunity **18**(2): 265-77.
- Lehar, S. M. and M. J. Bevan (2004). "Immunology: polarizing a T-cell response." Nature **430**(6996): 150-1.
- Lemaitre, B. (2004). "The road to Toll." Nat Rev Immunol **4**(7): 521-7.
- Li, J., M. L. Mbow, et al. (2004). "Induction of dendritic cell maturation by IL-18." Cell Immunol **227**(2): 103-8.
- Li, X. C., G. Demirci, et al. (2001). "IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo." Nat Med **7**(1): 114-8.
- Liau, L. M., R. M. Prins, et al. (2005). "Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment." Clin Cancer Res **11**(15): 5515-25.
- Lin, C. L., R. M. Suri, et al. (1998). "Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation." Eur J Immunol **28**(12): 4114-22.
- Lin, E. and J. Nemunaitis (2004). "Oncolytic viral therapies." Cancer Gene Ther **11**(10): 643-64.
- Lindhout, E., J. L. Vissers, et al. (2001). "The dendritic cell-specific CC-chemokine DC-CK1 is expressed by germinal center dendritic cells and attracts CD38-negative mantle zone B lymphocytes." J Immunol **166**(5): 3284-9.
- Lindner, M. and V. Schirmacher (2002). "Tumour cell-dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethylen-glycol versus electro-fusion protocols." Eur J Clin Invest **32**(3): 207-17.
- Lindquist, R. L., G. Shakhar, et al. (2004). "Visualizing dendritic cell networks in vivo." Nat Immunol **5**(12): 1243-50.
- Lindsten, T., K. P. Lee, et al. (1993). "Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells." J Immunol **151**(7): 3489-99.
- Linsley, P. S., J. Bradshaw, et al. (1996). "Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement." Immunity **4**(6): 535-43.

- Litinskiy, M. B., B. Nardelli, et al. (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL." *Nat Immunol* **3**(9): 822-9.
- Liu, G., K. L. Black, et al. (2006). "Sensitization of malignant glioma to chemotherapy through dendritic cell vaccination." *Expert Rev Vaccines* **5**(2): 233-47.
- Liu, J., C. S. Schmidt, et al. (2003). "LIGHT-deficiency impairs CD8+ T cell expansion, but not effector function." *Int Immunol* **15**(7): 861-70.
- Liu, Z., S. Tugulea, et al. (1998). "Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells." *Int Immunol* **10**(6): 775-83.
- Loetscher, M., B. Gerber, et al. (1996). "Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes." *J Exp Med* **184**(3): 963-9.
- Loke, P. and J. P. Allison (2003). "PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5336-41.
- Lonchay, C., P. van der Bruggen, et al. (2004). "Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** Suppl 2: 14631-8.
- Longman, R. S., D. Braun, et al. (2007). "Dendritic-cell maturation alters intracellular signaling networks, enabling differential effects of IFN-alpha/beta on antigen cross-presentation." *Blood* **109**(3): 1113-22.
- Lu, Z., L. Yuan, et al. (2000). "CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **191**(3): 541-50.
- Lucas, M., W. Schachterle, et al. (2007). "Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15." *Immunity* **26**(4): 503-17.
- Lucas, S., N. Ghilardi, et al. (2003). "IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 15047-52.
- Luft, T., M. Jefford, et al. (2002). "Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets." *Blood* **100**(4): 1362-72.
- Luft, T., K. C. Pang, et al. (1998). "Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells." *J Immunol* **161**(4): 1947-53.
- Luther, S. A. and J. G. Cyster (2001). "Chemokines as regulators of T cell differentiation." *Nat Immunol* **2**(2): 102-7.
- Lyakh, L. A., M. Sanford, et al. (2005). "TGF-beta and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells." *J Immunol* **174**(4): 2061-70.
- Machy, P., K. Serre, et al. (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**(3): 1172-80.
- Mackensen, A., T. Krause, et al. (1999). "Homing of intravenously and intralymphatically injected human dendritic cells generated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells." *Cancer Immunol Immunother* **48**(2-3): 118-22.
- Mackey, M. F., J. R. Gunn, et al. (1998). "Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity." *J Immunol* **161**(5): 2094-8.
- Maier, T., A. Tun-Kyi, et al. (2003). "Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intranodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells." *Blood* **102**(7): 2338-44.
- Maior, M., E. Fonsatti, et al. (2002). "Vaccination of stage IV patients with allogeneic IL-4- or IL-2-gene-transduced melanoma cells generates functional antibodies against vaccinating and autologous melanoma cells." *Cancer Immunol Immunother* **51**(1): 9-14.

- Manetti, R., P. Parronchi, et al. (1993). "Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells." *J Exp Med* **177**(4): 1199-204.
- Maraskovsky, E., E. Daro, et al. (2000). "In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand." *Blood* **96**(3): 878-84.
- Marrack, P., J. Kappler, et al. (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." *J Exp Med* **189**(3): 521-30.
- Marsland, B. J., P. Battig, et al. (2005). "CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells." *Immunity* **22**(4): 493-505.
- Martin-Fontecha, A., S. Sebastiani, et al. (2003). "Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming." *J Exp Med* **198**(4): 615-21.
- Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, et al. (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." *Nat Immunol* **5**(12): 1260-5.
- Martinson, J., J. Bae, et al. (2004). "Activated platelets rapidly up-regulate CD40L expression and can effectively mature and activate autologous ex vivo differentiated DC." *Cytotherapy* **6**(5): 487-97.
- Masse, D., C. Voisine, et al. (2002). "Increased vaccination efficiency with apoptotic cells by silica-induced, dendritic-like cells." *Cancer Res* **62**(4): 1050-6.
- Mattei, F., G. Schiavoni, et al. (2001). "IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation." *J Immunol* **167**(3): 1179-87.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* **12**: 991-1045.
- Mazzoni, A. and D. M. Segal (2004). "Controlling the Toll road to dendritic cell polarization." *J Leukoc Biol* **75**(5): 721-30.
- McIlroy, A., G. Caron, et al. (2006). "Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-gamma-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells." *Immunology* **117**(4): 507-16.
- McIlroy, D. and M. Gregoire (2003). "Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact." *Cancer Immunol Immunother* **52**(10): 583-91.
- McRae, B. L., R. T. Semnani, et al. (1998). "Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development." *J Immunol* **160**(9): 4298-304.
- McWilliam, A. S., D. Nelson, et al. (1994). "Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces." *J Exp Med* **179**(4): 1331-6.
- Means, T. K., F. Hayashi, et al. (2003). "The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells." *J Immunol* **170**(10): 5165-75.
- Meng, Y., H. Harlin, et al. (2006). "Induction of cytotoxic granules in human memory CD8+ T cell subsets requires cell cycle progression." *J Immunol* **177**(3): 1981-7.
- Menges, M., S. Rossner, et al. (2002). "Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity." *J Exp Med* **195**(1): 15-21.
- Menning, A., U. E. Hopken, et al. (2007). "Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets." *Eur J Immunol* **37**(6): 1575-83.

- Micallef, M. J., T. Ohtsuki, et al. (1996). "Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production." *Eur J Immunol* **26**(7): 1647-51.
- Miller, A. M. and P. PISA (2005). "Tumor escape mechanisms in prostate cancer." *Cancer Immunol Immunother*: 1-7.
- Miller, J. D., R. G. van der Most, et al. (2008). "Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines." *Immunity* **28**(5): 710-22.
- Mocikat, R., H. Braumuller, et al. (2003). "Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses." *Immunity* **19**(4): 561-9.
- Mohamadzadeh, M., F. Berard, et al. (2001). "Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells." *J Exp Med* **194**(7): 1013-20.
- Mohty, M., D. Olive, et al. (2002). "Leukemic dendritic cells: potential for therapy and insights towards immune escape by leukemic blasts." *Leukemia* **16**(11): 2197-204.
- Moingeon, P. (2001). "Cancer vaccines." *Vaccine* **19**(11-12): 1305-26.
- Morel, Y., J. M. Schiano de Colella, et al. (2000). "Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor." *J Immunol* **165**(8): 4397-404.
- Morel, Y., A. Truneh, et al. (2003). "LIGHT, a new TNF superfamily member, is essential for memory T helper cell-mediated activation of dendritic cells." *Eur J Immunol* **33**(11): 3213-9.
- Morse, M. A., T. M. Clay, et al. (2005). "Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules." *Clin Cancer Res* **11**(8): 3017-24.
- Morse, M. A., R. E. Coleman, et al. (1999). "Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies." *Cancer Res* **59**(1): 56-8.
- Mortarini, R., A. Anichini, et al. (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**(24): 5534-41.
- Mullins, D. W., S. L. Sheasley, et al. (2003). "Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control." *J Exp Med* **198**(7): 1023-34.
- Murphy, G., B. Tjoa, et al. (1996). "Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen." *Prostate* **29**(6): 371-80.
- Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). "The lineage decisions of helper T cells." *Nat Rev Immunol* **2**(12): 933-44.
- Nagai, T., O. Devergne, et al. (2003). "Timing of IFN-beta exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN-beta-mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation." *J Immunol* **171**(10): 5233-43.
- Nagata, Y., S. Ono, et al. (2002). "Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO-1, by distinct human dendritic cell populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10629-34.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, et al. (2005). "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells." *Nat Immunol* **6**(8): 769-76.

- Nelson, E. L., S. Strobl, et al. (1999). "Cycling of human dendritic cell effector phenotypes in response to TNF-alpha: modification of the current 'maturation' paradigm and implications for in vivo immunoregulation." *Faseb J* **13**(14): 2021-30.
- Nersting, J., M. Svenson, et al. (2003). "Maturation of human dendritic cells by monocyte-conditioned medium is dependent upon trace amounts of lipopolysaccharide inducing tumour necrosis factor alpha." *Immunol Lett* **89**(1): 59-65.
- Nestle, F. O., S. Aljagic, et al. (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Nat Med* **4**(3): 328-32.
- Nestle, F. O., A. Farkas, et al. (2005). "Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer." *Curr Opin Immunol* **17**(2): 163-9.
- Nilsen, N., U. Nonstad, et al. (2004). "Lipopolysaccharide and double-stranded RNA up-regulate toll-like receptor 2 independently of myeloid differentiation factor 88." *J Biol Chem* **279**(38): 39727-35.
- Norbury, C. C. (2006). "Drinking a lot is good for dendritic cells." *Immunology* **117**(4): 443-51.
- O'Mahony, D. and M. R. Bishop (2006). "Monoclonal antibody therapy." *Front Biosci* **11**: 1620-35.
- O'Neill, D. W., S. Adams, et al. (2004). "Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer." *Blood* **104**(8): 2235-46.
- Obeid, M., A. Tesniere, et al. (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." *Nat Med* **13**(1): 54-61.
- Ogden, C. A., A. deCathelineau, et al. (2001). "C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells." *J Exp Med* **194**(6): 781-95.
- Okada, M., M. Kitahara, et al. (1988). "IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells." *J Immunol* **141**(5): 1543-9.
- Okamura, H., H. Tsutsi, et al. (1995). "Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells." *Nature* **378**(6552): 88-91.
- Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." *Immunity* **13**(5): 715-25.
- Palucka, A. K. and J. Banchereau (2006). "Langerhans cells: daughters of monocytes." *Nat Immunol* **7**(3): 223-4.
- Parada, N. A., D. M. Center, et al. (1998). "Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2." *J Immunol* **160**(5): 2115-20.
- Parham, C., M. Chirica, et al. (2002). "A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R." *J Immunol* **168**(11): 5699-708.
- Park, C. S., S. O. Yoon, et al. (2004). "Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form." *J Immunol* **173**(11): 6676-83.
- Partida-Sanchez, S., S. Goodrich, et al. (2004). "Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity." *Immunity* **20**(3): 279-91.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." *Science* **299**(5609): 1033-6.
- Perez-Diez, A., N. T. Joncker, et al. (2007). "CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells." *Blood* **109**(12): 5346-54.
- Petroff, M. G., L. Chen, et al. (2003). "B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface." *Biol Reprod* **68**(5): 1496-504.

- Pflanz, S., J. C. Timans, et al. (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells." *Immunity* **16**(6): 779-90.
- Phan, V., F. Errington, et al. (2003). "A new genetic method to generate and isolate small, short-lived but highly potent dendritic cell-tumor cell hybrid vaccines." *Nat Med* **9**(9): 1215-9.
- Piccioli, D., S. Sbrana, et al. (2002). "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells." *J Exp Med* **195**(3): 335-41.
- Prazma, C. M., N. Yazawa, et al. (2007). "CD83 expression is a sensitive marker of activation required for B cell and CD4+ T cell longevity in vivo." *J Immunol* **179**(7): 4550-62.
- Prechtel, A. T., N. M. Turza, et al. (2007). "CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation." *J Immunol* **178**(9): 5454-64.
- Qin, H., C. Zhou, et al. (2006). "Enhancement of antitumour immunity by a novel chemotactic antigen DNA vaccine encoding chemokines and multiepitopes of prostate-tumour-associated antigens." *Immunology* **117**(3): 419-30.
- Quillien, V., A. Moisan, et al. (2005). "Biodistribution of radiolabelled human dendritic cells injected by various routes." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **32**(7): 731-41.
- Raez, L. E., P. A. Cassileth, et al. (2004). "Allogeneic vaccination with a B7.1 HLA-A gene-modified adenocarcinoma cell line in patients with advanced non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **22**(14): 2800-7.
- Ramakrishna, V., J. F. Treml, et al. (2004). "Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules." *J Immunol* **172**(5): 2845-52.
- Ratzinger, G., P. Stoitzner, et al. (2002). "Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin." *J Immunol* **168**(9): 4361-71.
- Reddy, A., M. Sapp, et al. (1997). "A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells." *Blood* **90**(9): 3640-6.
- Regnault, A., D. Lankar, et al. (1999). "Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization." *J Exp Med* **189**(2): 371-80.
- Reich, K., S. Hugo, et al. (2004). "The maturation-dependent production of interleukin-16 is impaired in monocyte-derived dendritic cells from atopic dermatitis patients but is restored by inflammatory cytokines TNF-α and IL-1β." *Exp Dermatol* **13**(12): 740-7.
- Reichardt, V. L., C. Y. Okada, et al. (1999). "Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study." *Blood* **93**(7): 2411-9.
- Reis e Sousa, C. (2006). "Dendritic cells in a mature age." *Nat Rev Immunol* **6**(6): 476-83.
- Reis e Sousa, C., G. Yap, et al. (1999). "Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology." *Immunity* **11**(5): 637-47.
- Ridgway, D. (2003). "The first 1000 dendritic cell vaccinees." *Cancer Invest* **21**(6): 873-86.
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, et al. (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." *Science* **283**(5405): 1183-6.
- Ritchie, D., I. Hermans, et al. (2006). "Autologous dendritic cells pulsed with eluted peptide as immunotherapy for advanced B-cell malignancies." *Leuk Lymphoma* **47**(4): 675-82.
- Rivino, L., M. Messi, et al. (2004). "Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells." *J Exp Med* **200**(6): 725-35.

- Robbiani, D. F., R. A. Finch, et al. (2000). "The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes." *Cell* **103**(5): 757-68.
- Rogers, P. R., J. Song, et al. (2001). "OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells." *Immunity* **15**(3): 445-55.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." *Blood* **90**(3): 909-28.
- Romagnoli, G., R. Nisini, et al. (2004). "The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function." *J Leukoc Biol* **75**(1): 117-26.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, 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**(15): 889-97.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, et al. (1985). "Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer." *N Engl J Med* **313**(23): 1485-92.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et al. (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." *Nat Med* **10**(9): 909-15.
- Rosenberg, S. A., J. R. Yannelli, et al. (1994). "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2." *J Natl Cancer Inst* **86**(15): 1159-66.
- Roth, M. G. (2006). "Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(1): 63-8.
- Royer, P. J., S. Tanguy-Royer, et al. (2006). "Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells." *Scand J Immunol* **63**(6): 401-9.
- Rubartelli, A., A. Poggi, et al. (1997). "The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium." *Eur J Immunol* **27**(8): 1893-900.
- Rubinstein, M. P., A. N. Kadima, et al. (2002). "Systemic administration of IL-15 augments the antigen-specific primary CD8+ T cell response following vaccination with peptide-pulsed dendritic cells." *J Immunol* **169**(9): 4928-35.
- Ruckert, R., K. Brandt, et al. (2003). "Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses." *Eur J Immunol* **33**(12): 3493-503.
- Rutault, K., C. Alderman, et al. (1999). "Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells." *Free Radic Biol Med* **26**(1-2): 232-8.
- Rutella, S., S. Danese, et al. (2006). "Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age." *Blood* **108**(5): 1435-40.
- Rutella, S. and R. M. Lemoli (2004). "Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications." *Immunol Lett* **94**(1-2): 11-26.
- Saeki, H., M. T. Wu, et al. (2000). "A migratory population of skin-derived dendritic cells expresses CXCR5, responds to B lymphocyte chemoattractant in vitro, and co-localizes to B cell zones in lymph nodes in vivo." *Eur J Immunol* **30**(10): 2808-14.
- Salcedo, M., N. Bercovici, et al. (2006). "Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate." *Cancer Immunol Immunother* **55**(7): 819-29.
- Sallusto, F., M. Cella, et al. (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**(2): 389-400.

- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med* **179**(4): 1109-18.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* **401**(6754): 708-12.
- Sallusto, F., P. Schaerli, et al. (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." *Eur J Immunol* **28**(9): 2760-9.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." *Nature* **407**(6805): 784-8.
- Scandella, E., Y. Men, et al. (2002). "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells." *Blood* **100**(4): 1354-61.
- Schadendorf, D., S. Ugurel, et al. (2006). "Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG." *Ann Oncol* **17**(4): 563-70.
- Scheu, S., J. Alferink, et al. (2002). "Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis." *J Exp Med* **195**(12): 1613-24.
- Schlienger, K., C. S. Chu, et al. (2003). "TRANCE- and CD40 ligand-matured dendritic cells reveal MHC class I-restricted T cells specific for autologous tumor in late-stage ovarian cancer patients." *Clin Cancer Res* **9**(4): 1517-27.
- Schluns, K. S., W. C. Kieper, et al. (2000). "Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo." *Nat Immunol* **1**(5): 426-32.
- Schluns, K. S., K. Williams, et al. (2002). "Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells." *J Immunol* **168**(10): 4827-31.
- Schneider, H., J. Downey, et al. (2006). "Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4." *Science* **313**(5795): 1972-5.
- Schnurr, M., P. Galambos, et al. (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**(17): 6445-50.
- Schnurr, M., F. Then, et al. (2000). "Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells." *J Immunol* **165**(8): 4704-9.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, et al. (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." *Nature* **393**(6684): 480-3.
- Schott, M. (2006). "Immunosurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers." *Endocr Relat Cancer* **13**(3): 779-95.
- Schuler-Thurner, B., D. Dieckmann, 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**(6): 3492-6.
- Schuler-Thurner, B., E. S. Schultz, et al. (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**(10): 1279-88.
- Schuler, G., B. Schuler-Thurner, et al. (2003). "The use of dendritic cells in cancer immunotherapy." *Curr Opin Immunol* **15**(2): 138-47.
- Schultz, E. S., B. Schuler-Thurner, et al. (2004). "Functional analysis of tumor-specific Th cell responses detected in melanoma patients after dendritic cell-based immunotherapy." *J Immunol* **172**(2): 1304-10.
- Schwendemann, J., C. Choi, et al. (2005). "Dynamic differentiation of activated human peripheral blood CD8+ and CD4+ effector memory T cells." *J Immunol* **175**(3): 1433-9.

- Seder, R. A., R. N. Germain, et al. (1994). "CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production." *J Exp Med* **179**(1): 299-304.
- Seki, E., H. Tsutsui, et al. (2001). "Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta." *J Immunol* **166**(4): 2651-7.
- Serwold, T., F. Gonzalez, et al. (2002). "ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum." *Nature* **419**(6906): 480-3.
- Shaif-Muthana, M., C. McIntyre, et al. (2000). "Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells." *Cancer Res* **60**(22): 6441-7.
- Shedlock, D. J. and H. Shen (2003). "Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory." *Science* **300**(5617): 337-9.
- Sheibanie, A. F., I. Tadmori, et al. (2004). "Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells." *Faseb J* **18**(11): 1318-20.
- Sherman, M. L., R. Datta, et al. (1991). "Regulation of tumor necrosis factor gene expression by ionizing radiation in human myeloid leukemia cells and peripheral blood monocytes." *J Clin Invest* **87**(5): 1794-7.
- Shi, Y., J. E. Evans, et al. (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." *Nature* **425**(6957): 516-21.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." *Nat Immunol* **3**(2): 135-42.
- Sica, G. L., I. H. Choi, et al. (2003). "B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity." *Immunity* **18**(6): 849-61.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science* **284**(5421): 1835-7.
- Sieling, P. A., D. Chatterjee, et al. (1995). "CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens." *Science* **269**(5221): 227-30.
- Simon, T et al (2009) "Dendritic cells preparation for immunotherapeutic intervention." *Immunotherapy* **1**(2), 289–302
- Slansky, J. E., F. M. Rattis, et al. (2000). "Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex." *Immunity* **13**(4): 529-38.
- Small, E. J., P. F. Schellhammer, et al. (2006). "Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer." *J Clin Oncol* **24**(19): 3089-94.
- Sozzani, S., F. Sallusto, et al. (1995). "Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines." *J Immunol* **155**(7): 3292-5.
- Spisek, R., G. Bougras, et al. (2003). "Transient exposure of dendritic cells to maturation stimuli is sufficient to induce complete phenotypic maturation while preserving their capacity to respond to subsequent restimulation." *Cancer Immunol Immunother* **52**(7): 445-54.
- Spisek, R., L. Bretaudeau, et al. (2001). "Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use." *Cancer Immunol Immunother* **50**(8): 417-27.
- Spisek, R., P. Chevallier, et al. (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**(10): 2861-8.
- Stark, M. A., Y. Huo, et al. (2005). "Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17." *Immunity* **22**(3): 285-94.
- Steinbrink, K., M. Wolfl, et al. (1997). "Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells." *J Immunol* **159**(10): 4772-80.

- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Steinman, R. M., S. Turley, et al. (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." J Exp Med **191**(3): 411-6.
- Stoitzner, P., G. Ratzinger, et al. (2001). "Interleukin-16 supports the migration of Langerhans cells, partly in a CD4-independent way." J Invest Dermatol **116**(5): 641-9.
- Strobl, H., C. Bello-Fernandez, et al. (1997). "flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions." Blood **90**(4): 1425-34.
- Su, Z., J. Dannull, et al. (2003). "Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells." Cancer Res **63**(9): 2127-33.
- Subklewe, M., C. Paludan, et al. (2001). "Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8(+) killer T cells." J Exp Med **193**(3): 405-11.
- Suh, W. K., B. U. Gajewska, et al. (2003). "The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses." Nat Immunol **4**(9): 899-906.
- Sun, J. C. and M. J. Bevan (2003). "Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help." Science **300**(5617): 339-42.
- Sun, J. C., S. M. Lehar, et al. (2006). "Augmented IL-7 signaling during viral infection drives greater expansion of effector T cells but does not enhance memory." J Immunol **177**(7): 4458-63.
- Tada, H., S. Aiba, et al. (2005). "Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells." Infect Immun **73**(12): 7967-76.
- Tamada, K., K. Shimosaki, et al. (2000). "LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response." J Immunol **164**(8): 4105-10.
- Tan, J. T., J. K. Whitmire, et al. (1999). "4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses." J Immunol **163**(9): 4859-68.
- Tanaka, H., C. E. Demeure, et al. (2000). "Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio." J Exp Med **192**(3): 405-12.
- Taraban, V. Y., T. F. Rowley, et al. (2002). "Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses." Eur J Immunol **32**(12): 3617-27.
- Taub, D. D., K. Conlon, et al. (1993). "Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta." Science **260**(5106): 355-8.
- Taub, D. D., A. R. Lloyd, et al. (1993). "Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells." J Exp Med **177**(6): 1809-14.
- Termeer, C. C., J. Hennies, et al. (2000). "Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells." J Immunol **165**(4): 1863-70.

- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* **188**(2): 287-96.
- Thurner, B., I. Haendle, 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**(11): 1669-78.
- Timmerman, J. M., D. K. Czerwinski, et al. (2002). "Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients." *Blood* **99**(5): 1517-26.
- Tominaga, K., T. Yoshimoto, et al. (2000). "IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells." *Int Immunol* **12**(2): 151-60.
- Tomiyama, H., T. Matsuda, et al. (2002). "Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype." *J Immunol* **168**(11): 5538-50.
- Tosello, V., K. Odunsi, et al. (2008). "Differential expression of CCR7 defines two distinct subsets of human memory CD4+CD25+ Tregs." *Clin Immunol* **126**(3): 291-302.
- Tough, D. F., P. Borrow, et al. (1996). "Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo." *Science* **272**(5270): 1947-50.
- Touret, N., P. Paroutis, et al. (2005). "Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation." *Cell* **123**(1): 157-70.
- Trakatelli, M., M. Toungouz, et al. (2006). "A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces CD8+ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients." *Cancer Immunol Immunother* **55**(4): 469-74.
- Trautmann, A. and S. Valitutti (2003). "The diversity of immunological synapses." *Curr Opin Immunol* **15**(3): 249-54.
- Trefzer, U., G. Herberth, et al. (2005). "Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results." *Vaccine* **23**(17-18): 2367-73.
- Trefzer, U., G. Herberth, et al. (2004). "Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients." *Int J Cancer* **110**(5): 730-40.
- Trinchieri, G. (1998). "Immunobiology of interleukin-12." *Immunol Res* **17**(1-2): 269-78.
- Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." *Annu Rev Immunol* **23**: 975-1028.
- Turner, J. G., A. L. Rakhmilevich, et al. (2001). "Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells." *J Immunol* **166**(1): 89-94.
- Tuyaerts, S., S. Van Meirvenne, et al. (2007). "Expression of human GITRL on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not abrogate the suppressive effect of CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Leukoc Biol* **82**(1): 93-105.
- Uronen-Hansson, H., L. Steeghs, et al. (2004). "Human dendritic cell activation by *Neisseria meningitidis*: phagocytosis depends on expression of lipooligosaccharide (LOS) by the bacteria and is required for optimal cytokine production." *Cell Microbiol* **6**(7): 625-37.
- Valladeau, J., O. Ravel, 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**(1): 71-81.
- van den Broeke, L. T., E. Daschbach, et al. (2003). "Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity." *J Immunol* **171**(11): 5842-52.
- van Endert, P. M., D. Riganelli, et al. (1995). "The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing." *J Exp Med* **182**(6): 1883-95.

- van Stipdonk, M. J., G. Hardenberg, et al. (2003). "Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses." *Nat Immunol* **4**(4): 361-5.
- Vegh, Z., R. R. Kew, et al. (2006). "Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR." *Mol Immunol* **43**(9): 1402-7.
- Verdijk, R. M., T. Mutis, et al. (1999). "Polyribonucleosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells." *J Immunol* **163**(1): 57-61.
- Verhasselt, V., O. Vosters, et al. (2004). "Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells." *Eur J Immunol* **34**(3): 762-72.
- Vieira, P. L., E. C. de Jong, et al. (2000). "Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction." *J Immunol* **164**(9): 4507-12.
- Vignard, V., B. Lemerrier, et al. (2005). "Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells." *J Immunol* **175**(7): 4797-805.
- Villadangos, J. A. and W. R. Heath (2005). "Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm." *Semin Immunol* **17**(4): 262-72.
- Villarino, A., L. Hibbert, et al. (2003). "The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection." *Immunity* **19**(5): 645-55.
- Visser, J. L., F. C. Hartgers, et al. (2001). "BLC (CXCL13) is expressed by different dendritic cell subsets in vitro and in vivo." *Eur J Immunol* **31**(5): 1544-9.
- Vulcano, M., S. Struyf, et al. (2003). "Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells." *J Immunol* **170**(7): 3843-9.
- Waldmann, T. A., S. Dubois, et al. (2001). "Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy." *Immunity* **14**(2): 105-10.
- Walker, W., M. Aste-Amezaga, et al. (1999). "IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma." *J Immunol* **162**(10): 5894-901.
- Wallach, D., M. Fellous, et al. (1982). "Preferential effect of gamma interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells." *Nature* **299**(5886): 833-6.
- Walzer, T., M. Dalod, et al. (2005). "Natural-killer cells and dendritic cells: 'l'union fait la force'." *Blood* **106**(7): 2252-8.
- Wang, Y., C. G. Kelly, et al. (2001). "CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines." *Immunity* **15**(6): 971-83.
- Ward, S., D. Casey, et al. (2002). "Immunotherapeutic potential of whole tumour cells." *Cancer Immunol Immunother* **51**(7): 351-7.
- Watanabe, N., M. Gavrieli, et al. (2003). "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1." *Nat Immunol* **4**(7): 670-9.
- Watanabe, S., H. Kagamu, et al. (2003). "The duration of signaling through CD40 directs biological ability of dendritic cells to induce antitumor immunity." *J Immunol* **171**(11): 5828-36.
- Webb, D. C., Y. Cai, et al. (2007). "Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Ralpha in dendritic cell maturation and CD4+ Th2 cell function." *J Immunol* **178**(1): 219-27.
- Webb, L. M., B. M. Foxwell, et al. (1997). "Interleukin-7 activates human naive CD4+ cells and primes for interleukin-4 production." *Eur J Immunol* **27**(3): 633-40.
- Wei, Y., R. P. Sticca, et al. (2006). "Dendritoma vaccination combined with low dose interleukin-2 in metastatic melanoma patients induced immunological and clinical responses." *Int J Oncol* **28**(3): 585-93.

- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." *Immunol Rev* **182**: 207-14.
- Wen, T., J. Bukczynski, et al. (2002). "4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function." *J Immunol* **168**(10): 4897-906.
- Weng, N. P., K. Liu, et al. (2002). "IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells." *Ann N Y Acad Sci* **975**: 46-56.
- West, M. A., R. P. Wallin, et al. (2004). "Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling." *Science* **305**(5687): 1153-7.
- Whiting, D., G. Hsieh, et al. (2004). "Chemokine monokine induced by IFN-gamma/CXC chemokine ligand 9 stimulates T lymphocyte proliferation and effector cytokine production." *J Immunol* **172**(12): 7417-24.
- Wierecky, J., M. R. Muller, et al. (2006). "Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients." *Cancer Res* **66**(11): 5910-8.
- Wiethe, C., K. Dittmar, et al. (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**(6): 2912-22.
- Wilcox, R. A., K. Tamada, et al. (2002). "Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity." *J Immunol* **169**(8): 4230-6.
- Woodhead, V. E., T. J. Stonehouse, et al. (2000). "Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation." *Int Immunol* **12**(7): 1051-61.
- Wu, A. M. and P. D. Senter (2005). "Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates." *Nat Biotechnol* **23**(9): 1137-46.
- Xia, D., S. Zheng, et al. (2003). "Effective induction of therapeutic antitumor immunity by dendritic cells coexpressing interleukin-18 and tumor antigen." *J Mol Med* **81**(9): 585-96.
- Yang, D., Q. Chen, et al. (2000). "Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells." *J Leukoc Biol* **68**(1): 9-14.
- Yannelli, J. R. and J. M. Wroblewski (2004). "On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy." *Vaccine* **23**(1): 97-113.
- Yoneyama, H., K. Matsuno, et al. (2004). "Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules." *Int Immunol* **16**(7): 915-28.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." *Nat Immunol* **5**(7): 730-7.
- Yoshida, A., Y. Koide, et al. (1994). "IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774." *Biochem Biophys Res Commun* **198**(3): 857-61.
- Yoshimoto, T., H. Mizutani, et al. (2000). "IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6." *Nat Immunol* **1**(2): 132-7.
- Yoshimura, T., K. Matsushima, et al. (1987). "Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(24): 9233-7.
- Zhang, A. L., P. Colmenero, et al. (2007). "Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells." *Blood* **110**(7): 2484-93.
- Zhang, X., J. C. Schwartz, et al. (2004). "Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1." *Immunity* **20**(3): 337-47.
- Zheng, S. G., J. H. Wang, et al. (2004). "Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10." *J Immunol* **172**(9): 5213-21.

- Zhou, L. J. and T. F. Tedder (1996). "CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2588-92.
- Zinkernagel, R. M. (2003). "On natural and artificial vaccinations." Annu Rev Immunol **21**: 515-46.
- Zou, G. M. and Y. K. Tam (2002). "Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances." Eur Cytokine Netw **13**(2): 186-99.

# ***ANNEXES***



## Dendritic cell preparation for immunotherapeutic interventions

Much effort has been made over the last decade to use dendritic cells (DCs) in vaccines to induce specific antitumor immune responses. However, the great hope provided by *in vitro* and *in vivo* preclinical investigations was not translated to the clinic in terms of clinical efficacy. Thus, one of the challenges resides in optimizing DC-based therapy to give maximum clinical efficacy while using manufacturing processes that enable quality control and scale-up of consistent products. In this article, we review DC biology and the DC-based clinical trials performed to date and focus on the DC maturation status compatible with the goals of cancer immunotherapy. We also highlight the different approaches used in these clinical studies, such as the DC types or subtypes used and their preparation. Finally, we discuss the immunological and clinical outcomes in treated patients, with emphasis on the strategies that could be used to improve DC-based vaccination.

**KEYWORDS:** cancer • clinical study • dendritic cell • immunogenicity • immunotherapy • tolerance

For decades, scientists have been attempting to exploit the concept of tumor immune surveillance to treat cancer. Advances made in research of tumor-associated antigens (TAAs) recognized by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) as well as studies of tumor-infiltrating cells have demonstrated that the immune system is able to control cancer development. Indeed, there are several lines of evidence showing that the immune system can induce tumor cell death, such as spontaneous tumor regression observed in numerous cases of carcinoma [1]. Thus, much effort has been made to exploit the concept of immune surveillance in clinical trials, notably by the use of dendritic cells (DCs) in vaccines. DCs are considered to be the most efficient antigen-presenting cells capable of inducing specific immune responses [2]. Unfortunately, despite the fact that DCs have been shown to activate T cells that in turn reject tumor cells in *in vitro* and *in vivo* (murine models) preclinical studies, clinical responses have only been observed in a few cases in human clinical trials [3]. Thus, a better understanding of DC biology could help to increase the efficiency of this therapeutic approach.

The central role of DCs in the control and activation of adaptive immune responses has been extensively demonstrated during recent decades [2]. Since DCs reside in the skin and mucosa, which are tissues directly in contact with antigens, these cells act as 'sentinels' by informing the immune system of an external aggression or neo-expression of (tumor-associated) antigens(s). Through their capacity to migrate

to lymph nodes and activate lymphocyte populations, they are at the origin of antigen-adapted immune responses. In the context of cancer, DCs are at the core of immune surveillance. They act by delivering TAAs to specific cytotoxic lymphocytes, which in turn become activated and thereby limit cancer cell expansion. However, DCs are also implicated in the induction of tolerance for specific antigens [4], notably by their interactions with regulatory T cells [5,6]. These tolerogenic abilities may thus reduce the efficacy of antitumor DC-based immunotherapy. In this article, we will review DC biology and the DC-based clinical trials performed to date and focus on the DC maturation status compatible with the goals of cancer immunotherapy. We will highlight the different approaches used in the clinical studies, such as the DC types or subtypes used and their preparation. Finally, we will discuss the immunological and clinical outcomes in treated patients, with emphasis on the strategies that could be used to improve DC-based vaccination.

### DC biology

Two main DC subsets have been identified in humans: the CD11c<sup>+</sup> myeloid DCs, which include Langerhans cells, dermal and interstitial DCs; and the CD11c/CD123<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> plasmacytoid DCs (pDCs) [7]. Both DC subsets are involved in the induction of adaptive immune responses, but only myeloid DCs have been used extensively in DC-based immunotherapy owing to their greater accessibility [8].

Thomas Simon<sup>1</sup>,  
Jean-François Fonteneau<sup>1</sup>  
& Marc Grégoire<sup>1\*</sup>

<sup>\*</sup>Author for correspondence:

<sup>1</sup>INSERM U892, Institut de  
Biologie, 9 quai Moncausu,  
44093 Nantes Cedex 01, France  
Tel.: +33 240 084 150  
Fax: +33 240 084 082  
marc.gregoire@  
nantes.inserm.fr

future  
medicine part of fsg

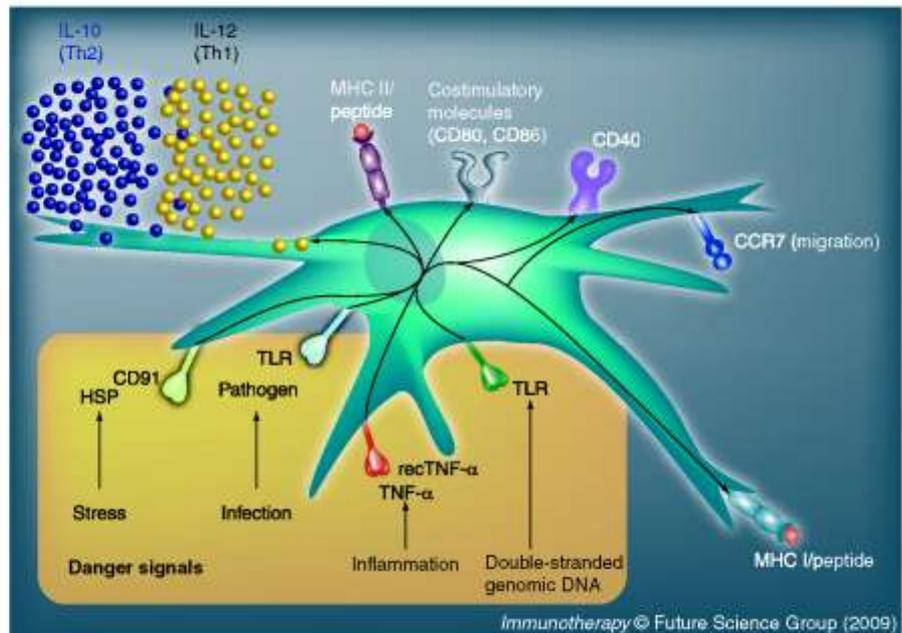
### ■ First signals inducing DC maturation

Dendritic cells differentiate from hematopoietic stem cells and exist in two distinct states commonly termed immature and mature. Immature DCs reside in peripheral tissues and sample the environment through the uptake of surrounding antigens. After receiving initial signals at the periphery, DCs migrate into lymph nodes where they present antigens to T cells, inducing tolerance in a steady state when they are exposed to physiological signals of maturation [9], or an immune response if they are exposed to danger signals (Figure 1) [10]. For example, DC maturation can be triggered via contacts with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) through receptors such as Toll-like receptors (TLRs) [11]. PAMPs are derived from microbial and viral pathogens, such as lipopolysaccharide, CpG DNA, peptidoglycan or dsRNA. Other maturation signals include proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and prostaglandin (PGE)<sub>2</sub>, and a variety of noninflammatory and pathogen-unrelated factors, such as histamine, uric acid, heat-shock protein (HSP) and ATP [12,13]. Altogether, these stimuli

modulate the nature of the maturation process and provide DCs with different capacities for T-cell effector subset priming [14]. In addition, cross-talk between DCs and T cells, described as the immunological synapse [15], is able to influence the properties of DCs, favoring CTL priming [16].

### ■ Sequential signals inducing DC maturation

During the first steps of maturation, DCs leave peripheral tissues and migrate, through a switch of chemokine receptors, towards the T-cell zone of proximal lymph nodes [17]. This first maturation step is associated with an enhanced migratory function, a decreased antigen-capturing capacity, and an increased antigen-processing capacity. The antigens (e.g., proteins or cell debris) captured by DCs are processed into antigenic peptides in the endosomal/lysosomal compartment by proteases, and in the cytoplasm by the proteasome/immunoproteasome complex [18–20]. These peptides are then loaded onto HLA class I (cross-presentation to CD8 T cells) or class II molecules (presentation to CD4 T cells) and thus exposed to specific and restricted T-cell



**Figure 1. Danger signals: first signals given at the periphery.** Signals such as stress (e.g., HSP and uric acid), inflammation (e.g., TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), pathogens (e.g., dsRNA and lipopolysaccharide) and/or cell-nuclear debris induce activation and maturation of dendritic cells (DCs). DCs reduce their capacity for phagocytosis and initiate their migration towards lymph nodes by their expression of CCR7. Costimulatory (e.g., CD80 and CD86) and presentation molecules (MHC I and II) are upregulated as part of this process. DC secretion of IL-12 and IL-10 skews the immune response toward a Th1 or Th2 profile, respectively. HSP: Heat-shock protein; TLR: Toll-like receptor.



### Use of DCs in clinical studies

To date, over 200 DC-based clinical studies have been reported in the context of cancer therapy (target keywords 'dendritic' and 'cancer') [201,202]. This treatment strategy for cancer was also reviewed and analyzed previously by others showing wide disparities in DC production, antigen loadings and cancer origins [3,28–30]. Thus, we humbly have to admit that there is no international consensus to date on the methods and processes of DC vaccines. The only consensus is to propose that an optimized cancer vaccine will have to induce not only CD8<sup>+</sup> (memory) cytotoxic but also CD4<sup>+</sup> Th cells.

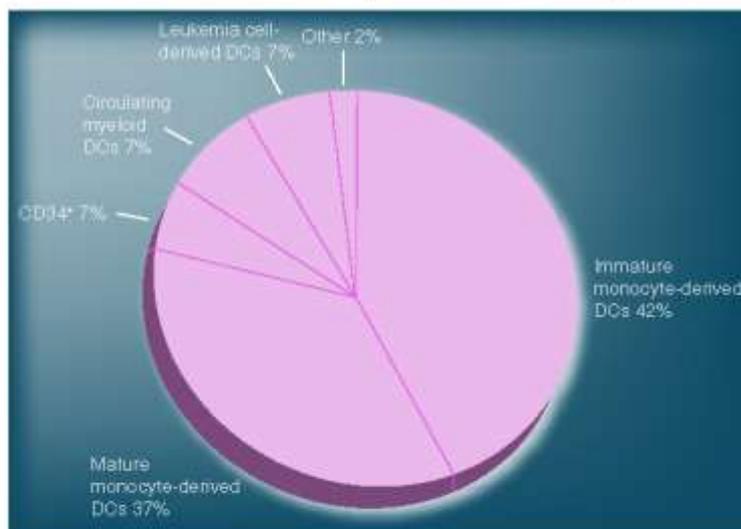
Although most of the DC-treated cancer is melanoma, several other cancers, where specific antigens were identified, have also been treated with DC vaccines. This is the case for prostate cancer [31], renal cell carcinoma [32], breast cancer [33], multiple myeloma [34], leukemia [35], colorectal cancer [36] and glioma [37]. However, the autologous DC vaccines were predominantly produced from patients either previously enrolled in a chemotherapeutic clinical trial or in a late phase of the cancer development, which are not favorable parameters in an immunotherapeutic trial. Indeed, very little information exists on the intensive and repetitive chemotherapies on the Mo-DCs or DCs derived from another origin. In addition, owing to ethical and clinical feasibilities, experimental and preclinical investigations were predominantly developed with cells from healthy donors, not from cancer patients.

### DC subtypes

As shown in *FIGURE 3*, four major types of myeloid DCs have been used in clinical studies: Mo-DCs, CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cell-derived DCs, circulating myeloid DCs and leukemia cell-derived DCs.

In the 1990s, Sallusto and Lanzavecchia described a method to generate a high quantity of human DCs from peripheral blood monocytes [38]. This work boosted the field of DC research and enabled clinicians to use these cells in immunotherapy trials to induce antitumor responses in cancer patients. Since large quantities of Mo-DCs are 'easily' generated due to the high proportion of monocytes in peripheral blood, these cells have been used extensively (in 75% of the clinical studies). A number of studies have been performed to adapt initial culture conditions of Mo-DC to good manufacturing product conditions [39–41]. For instance, we compared the impact of standard culture medium on Mo-DC differentiation and maturation [42]. Commercially available media for hematopoietic cell culture as well as different protein supplementations, fetal calf serum, autologous plasma, human serum and human serum albumin were tested and compared on culture yields, cell viability and DC maturation. Although we demonstrated that the differentiation yields were similar between the conditions used, we evidenced significant differences in terms of cytotoxicity and DC maturation (phenotypic and functional), depending on the culture medium batch origin. Thus, our results underscored the importance of defining culture medium composition in clinical standard operating procedures to insure quality control. In the majority of clinical trials, monocytes are primarily selected from peripheral blood or apheresis by plastic adherence or by magnetic cell sorting. More recently, an alternative selection by elutriation was proposed, enabling fast and easy enrichment of monocytes within a closed system [43]. *In vitro*, monocytes are activated and differentiated into immature Mo-DCs in the presence of GM-CSF and IL-4 (sometimes IL-13). Additional cytokines in the culture medium are subsequently used to induce Mo-DC maturation (for review see [44]). In approximately half of the clinical trials using Mo-DC-based vaccines, DCs pulsed with TAAs have been used directly in their immature state. In the remaining half, Mo-DCs have been activated with different maturation stimuli prior to injection.

The method to obtain DCs from blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells was described concomitantly to the description of Mo-DCs by Banchereau and collaborators [45]. Such DC



**Figure 3.** Subsets of dendritic cells used in clinical trials. DC, Dendritic cell.

populations have also been tested in clinical studies with some encouraging results [46,47]. However, this type of DC is barely used (only ~5% of clinical trials) owing to the complexity of CD34<sup>+</sup> cell sorting compared with the relative ease of monocyte purification. DCs are obtained by culturing CD34<sup>+</sup> stem cells in the presence of GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$  and FLT3 ligand [48,49]. The cells obtained in this manner were described to be highly immunogenic and to induce a better *in vitro* expansion of antigen-specific cytotoxic T cells than Mo-DCs [50,51].

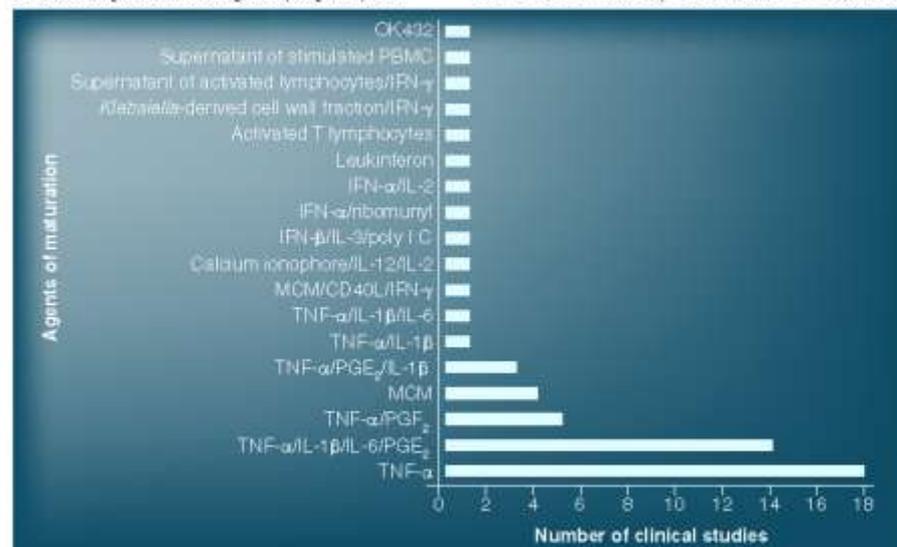
Another type of DC, circulating myeloid DCs (CD14<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup>), has been used in approximately 7% of the studies analyzed. These cells can be expanded several fold in the blood of patients by *in vivo* administration of FLT3 ligand [52,53]. They exhibit a high migratory capacity, but a reduced propensity for cytokine secretion.

Dendritic cells generated from leukemia blast cells have also been used in antileukemia therapies [54]. This type of DC is still used in some therapeutic approaches (~4% of the DC-based clinical trials). The DCs in question are generated *in vitro* from myelogenous leukemia cells and cultured with GM-CSF and IL-4. These cells have the morphology, phenotypic characteristics and T-cell-stimulatory capacity of DCs. They naturally express the leukemia antigens, as well as high levels of MHC class I and II antigens and costimulatory molecules. Thus, they have the capacity to stimulate the cytolytic activity of leukemia-specific autologous lymphocytes.

#### ■ DC maturation

The maturation state of DCs is one of the major determining points for the efficiency of DC-based immunotherapy. It is now known that immature DCs exhibit a limited capacity to prime T-cell responses and are likely involved in T-cell tolerance induction [5]. Indeed, a clinical study performed by Bhardwaj's group in 2001 showed that the injection of immature DCs led to the specific inhibition of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell effector function with induction of IL-10-producing antigen-specific T cells [55]. Furthermore, immature DCs accumulate at the injection sites with a very low potential to migrate to the lymph node compared with mature DCs [56]. However, 38% of clinical studies reported to date have used immature Mo-DCs (Kooze 3) [28]. In the majority of cases, this was due to the time interval between the clinical study proposal made before 2001 and the initiation of patient vaccination, which often takes years.

Since 2001, the majority of clinical studies have used mature DCs. In order to increase their immunogenicity, the DCs were generally matured for a period of 48 h or more with TNF- $\alpha$  alone or in combination with IL-1 $\beta$ , IL-6 and PGE<sub>2</sub>, referred to as macrophage condition medium (MCM) mimic (Mazzè 4) [57]. Other maturation stimuli, including the use of single or multiple agents, have also been described, such as IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, CD40L, IL-3 and Ribomunyl®. Such activation signals induce upregulation of MHC, costimulatory (CD80 and CD86) and



**Figure 4. Agents used for the maturation of monocyte-derived dendritic cells in clinical studies**

MCM: Macrophage condition medium; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; PG: Prostaglandin.

adhesion (CD54 and CD58) molecules and favor secretion of proinflammatory cytokines, such as IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$  and IL-6 [2]. However, all these stimuli are not equivalent and will differentially influence the outcome of DC maturation. For instance, we showed that tolerogenic DCs can be obtained *in vitro* by exposing human Mo-DCs to lipopolysaccharide, suggesting that the use of this maturation factor alone is not sufficient to obtain efficient immunogenic DCs [6]. Another example of maturation stimuli that are the subject of controversy is the addition of PGE<sub>2</sub> to maturation stimuli. Indeed, PGE<sub>2</sub> was added to maturation stimuli since it is required for DC lymph node migratory capacity by inducing CCR7 expression [1758], but at the same time it reduces IL-12 production that plays an important role in induction of Th1 and cytotoxic T-cell responses [59]. Currently, new protocols using PGE<sub>2</sub> in combination with TLR ligands have been designed and allow production of IL-12 by PGE<sub>2</sub>-treated DCs [60,61]. Such selective effect of maturation factors make the choice of maturation stimuli used in clinical trials very difficult and prompt scientists to better characterize the DC maturation mechanism. Furthermore, comparison of these maturation stimuli is difficult to perform from one clinical study to another, since it is not the only parameter that differs. Thus, DC-based immunotherapy would greatly benefit from clinical studies comparing these maturation stimuli. In addition, the continuous flow of new *in vitro* results regarding DC maturation has to be considered. For instance, two recent *in vitro* studies performed with DCs from chronic lymphocytic leukemia and renal carcinoma show that DCs matured with TNF- $\alpha$  were superior to DCs matured with MCM mimic cocktail at inducing DC maturation and stimulating antitumor reactive T cells [62,63].

These maturation approaches raised two questions. First, are these maturation stimuli sufficient to generate fully functional mature DCs with efficient immunogenic properties? Second, is the 48-h maturation period too long, resulting in DC exhaustion where DCs have already reached their optimal state of maturation *in vitro* and are exhausted when reinjected to the patient? DC maturation has to be viewed as a coordinated process in which DC antigen capturing, processing and presentation, expression of costimulatory molecules and cytokine secretion are temporally and spatially regulated. Throughout this process, DCs receive specific activation stimuli in the periphery and then in lymph nodes. *In vivo* migration studies have

demonstrated that DCs reach the lymph nodes as soon as a few hours (4–6 h) after intradermal injection and their influx increases up to 24 h [64,65]. Thus, their exposure to a maturation-inducing pathogen or inflammatory signals, in the case of localized infection, is likely to be only transient. In lymph nodes, the T-cell-stimulatory properties of maturing DCs are further enhanced by subsequent interactions with antigen-specific activated T cells, notably CD4<sup>+</sup> helper T cells, and other activated innate immune cells. Thus, DCs activated by a single exposure to maturation stimuli in clinical studies may not be as efficient as DCs that receive activation signals *in vivo* throughout the maturation process. Furthermore, *in vitro* experiments have demonstrated that prolonged periods of maturation lead to the development of DCs that have already exhausted their IL-12 production capacity and become refractory to further stimulation [66]. These exhausted DCs preferentially prime Th2 and nonpolarized T cells [67]. Based on these results, Lanzavecchia and Sallusto have proposed an elegant model in which recently activated DCs secreting IL-12 preferentially drive Th1 polarization, whereas DCs surviving in the T-cell areas or DCs entering secondary lymphoid organs later (>24 h) after maturation exhaust their IL-12-producing capacity and participate in the downregulation of the immune response and in the formation of the central memory T-cell pool [68]. Thus, the length of DC maturation should be considered in clinical trials to avoid injection of exhausted DCs that are no longer able to induce Th1 and cellular immune responses.

Many studies in mouse models have underlined the importance of CD4<sup>+</sup> T cells in the induction of CD8<sup>+</sup> T-cell responses by DCs, and more recently in the establishment of a CD8<sup>+</sup> T-cell memory pool [16]. Indeed, early *in vivo* experiments involving allograft rejection in murine models, and *in vitro* studies of allogeneic mixed lymphocyte reactions, concluded that CD4<sup>+</sup> T cells were necessary to induce cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-cell responses [69–71]. This finding led to the hypothesis that helper T cells are essential for immunity to antigens such as tissue grafts or tumors, where molecular stimuli from cells of the innate immune system are absent. Before receiving the CD4<sup>+</sup> T-cell help signals, DCs must first be exposed to preliminary signals in the periphery to induce their activation and migration to secondary lymphoid organs. Thus, DC maturation requires a two-step process in order to enable the efficient activation of CD8<sup>+</sup> T-cell responses. We

recently confirmed these observations in humans. We set up an *in vitro* human Mo-DC maturation protocol comprising TNF- $\alpha$  plus polyI:C as a primary combined signal that mimics the peripheral signal, followed by activated CD4<sup>+</sup> T cells or CD40L plus IFN- $\gamma$  as a second signal (SAMON T *et al.*, *SUBMITTED MANUSCRIPT*). We found that such sequential maturation, especially with activated CD4<sup>+</sup> T cells, led to a stronger Th1 phenotype of the CD4<sup>+</sup> T-cell responses, with a limited expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells and a better differentiation of antitumor CD8<sup>+</sup> T cells with a long-term memory phenotype. Indeed, this study revealed a useful approach to induce a long-lasting antitumor memory T-cell pool containing both effector and central components. Thus, this new preclinical strategy to prepare DCs *ex vivo* has important implications for the development of clinical DC-based immunotherapy and highlights the requirements of T-helper-derived signals in the DC maturation process.

### ■ Antigen loading onto DCs

The use of DCs in clinical studies generally requires several steps: differentiation and maturation of DCs as noted above, as well as their loading with tumor antigens.

Different methods of antigen loading have been set up. The source of TAAs for DC remains a critical issue that partially determines the efficacy of DC-based vaccination. Most currently used clinical vaccination protocols are based on pulsing DCs with MHC class I-restricted peptides of known TAA sequence and, therefore, require previous identification and characterization of the antigenic epitopes [72–77]. DCs can also be loaded with defined TAAs using proteins. For example, in myeloma DC-vaccine trials, idiotype proteins are used as the source of antigen [78]. Thus, the different epitopes contained in the protein are presented on both class I and II HLA molecules, leading to the induction of various specific CTL and helper T cells [78–81]. These methods allow the monitoring of the antitumor immune response, since only defined antigens are targeted, but it may favor the immune escape of tumor cells by downregulation or mutation of these specific antigens, especially when only one antigen is targeted. This escape phenomenon could be limited by targeting several TAAs or by targeting a TAA that plays a role in the survival of the tumor cells [82]. TAAs can also be delivered in the form of mRNA by electroporation, lipofection or nucleofection [83–87], or in the form of DNA by using recombinant viruses [88]. Furthermore, the use of whole tumor-derived

material to load DCs bypasses the need to identify targetable antigens in the tumor, provides a full array of antigenic peptides that rapidly gain access to both MHC class I and II molecules, and induces immune responses directed against a broad spectrum of antigenic epitopes. Different tumor-derived materials that have already been tested include total tumor RNA [89,90], exosomes [91,92], tumor lysates [93,94] or apoptotic tumor cells [95,96].

The drawback of using tumor cells as a source of antigens instead of defined TAAs is that the immunological response is more complex to monitor after DC vaccine, thus making the correlation between clinical and immune responses difficult to evaluate. In addition, controversy exists with respect to the optimal form of killed tumor cells for stimulating effective immune antitumor activity in DC-based vaccine strategies. Early reports argued that DCs that phagocytosed apoptotic cells could exclusively cross-present tumor antigens [97]. Other studies demonstrated the induction of tolerance by DCs that had captured apoptotic cells [98]. Moreover, it was shown that necrotic but not apoptotic cells induce the maturation of immunostimulatory DCs and increase their stimulatory capacities [99]. In an experimental preclinical antitumor vaccine strategy, we demonstrated that apoptotic tumor cells were more efficient in terms of antigen priming than necrotic ones [100].

We have previously suggested that the nature of the apoptotic-inducing agent employed for the tumor cells is the main factor responsible for determining the outcome of DC-based therapy [101]. More recently, an increasing number of studies have been undertaken to investigate the possible implication of chemotherapy in the immune response. Indeed, chemotherapy and radiotherapy were demonstrated to induce apoptotic processes within the tumor cells and thereby initiate an immunoadjuvant pathway that contributed to the success of cytotoxic treatments [102]. In particular, anthracyclines are described to induce specific immune responses that result either in immunogenic cancer cell death or in immunostimulatory side effects [103,104]. In the latter studies, it was demonstrated that the translocation of calreticulin to the plasma membrane in tumor cells [104] and the release of high-mobility-group box (HMGB)1 by tumor cells [105] are two key post-transcriptional events required for the immunogenicity of anthracyclines. These recent discoveries represent a step forward in the conceptual understanding of the mechanisms underlying the immunogenicity of chemotherapeutic agents.

### ■ Injection procedures for DC-based antitumor vaccination

Many questions also remain unanswered regarding the injection of DCs to patients. These relate to the nature and level of DC maturation, their route and frequency of injection, and the number of DCs to be injected.

Dendritic cells have been mostly administered intravenously, intradermally and subcutaneously, although a consensus emerged that intravenous injection is not as efficient compared with the two other routes. Indeed, intravenously injected indium-radiolabeled DCs transiently accumulate in the lungs before reaching the spleen, liver and bone marrow, but they were not detected in lymph nodes, whereas a small percentage of intradermally injected DCs reached the regional lymph nodes [65,106]. Furthermore, all of these routes have been shown to induce immunity, but the quality of the responses was different, with a better Th1 differentiation in the case of subcutaneous or intradermal injection [107]. Alternatively, injections into a lymph node or directly into the tumor have also been performed in a few studies [108].

The frequency of DC injections and the number of DCs injected are other points to consider in DC-based vaccination. Early clinical studies showed that a single injection of DCs induces a T-cell response [109]. This immune response can be boosted by a second injection [110]. The majority of clinical studies now perform several injections with variable frequency ranging from weekly to monthly. Similar to injection frequency, the quantity of DC injected to patients varies considerably from one clinical trial to another. The results of all these studies are difficult to compare owing to different injection schedules and quantity of injected DCs, and other parameters such as the DC preparation procedure. Thus, there is now a need for studies comparing both the schedule and the number of DCs injected.

### ■ Immune-monitoring & clinical responses

Dendritic cell-based vaccination has been shown to be safe in humans, with only minor or mild side effects being reported. The outcome of antitumor DC therapy is mainly evaluated on two different levels. The first level of evaluation referred to as immune monitoring consists of measuring the immune responses induced by the treatment. The second level is the evaluation of the clinical benefits for the patients and their relationship with the nature of the vaccine.

### ■ T-cell monitoring

Immune monitoring of DC-based vaccination has been made possible by the recent development of several technologies, such as HLA/peptide tetramers [111], ELISPOT [112] and intracytoplasmic staining of cytokines [113]. These sensitive assays, which are able to detect very low fractions of TAA-specific T cells, have allowed the measurement of significant T-cell responses against the targeted antigens in the majority of patients included in DC-based clinical studies. The production of antibodies against TAAs has also been reported [114]. However, T-cell responses observed in vaccinated patients were often transient and did not result in the differentiation of long-term memory T cells [115]. Several studies have reported an epitope spreading after DC vaccination, which is described as a T-lymphocyte response specific to TAAs that were not included in the original vaccine formulation [116–118]. This effect is believed to be induced by *in vivo* killing of cancer cells by T cells activated after injection of the DC vaccine. Subsequent internalization of the dead cells and cross-presentation of the tumor antigen by tissue resident antigen-presenting cells is able to promote epitope spreading. It is thought that this may help to avoid immune escape by tumor cells since, in a few studies, it was correlated to the clinical response [115,116].

### ■ Immune response & correlation with therapeutic effect

In the majority of DC-based vaccination studies, few clinical responses have been observed, leading rarely to complete remission. Interestingly, a statistically significant correlation was recently demonstrated between favorable clinical outcome and the presence of vaccine-related, tumor antigen-specific T cells in delayed type hypersensitivity (DTH) skin biopsies [119]. A direct correlation was observed between the presence of DC vaccine-related T cells in the DTH biopsies of stage IV melanoma patients and a positive clinical outcome ( $p = 0.0012$ ). Importantly, these clinical responses were correlated with the presence of specific DC-induced immune responses. However, in the majority of patients, an immune response was detected without or with only very little clinical benefits for the patients. Several hypotheses could explain this discrepancy. First, a great majority of these clinical studies have been performed in late-stage cancer patients often resistant to chemotherapy or radiotherapy, where tumor burden is heavy. Second, chemotherapy and radiotherapy treatments could have

a negative effect on the immune system and its activation, either at the DC or lymphocyte level. In these conditions, the immunological response induced by a DC vaccine may not be effective. In fact, the immune-suppressive potential of tumor cells, referred to as 'cancer immunoeediting', has been shown to develop throughout the disease progression and may, therefore, counteract the vaccine effect [120]. However, clinical responses have been reported even in late-stage patients [46,79]. This result suggests that the DC vaccine efficiency may be increased by performing it at an earlier stage of the disease. Along these lines, a clinical study consisting of *in vitro* tumor-infiltrating leukocyte expansion and injection performed at an early point in stage III melanoma patients showed that the clinical benefit was inversely correlated to the tumor burden [121,122]. Thus, DC-vaccination approaches should be considered to treat patients at an earlier stage of the disease.

#### ■ Importance of CD4<sup>+</sup> T-cell derived signals for DC preparation to potentiate the clinical response

Dendritic cells are able to induce antitumor responses, but the quality of these responses or the specificity of DCs may not be high enough to induce cancer 'rejection'. The absence of long-term memory T-cell induction by DC vaccines (i.e., an immune response able to generate secondary antitumor efficacy more effectively and thereby protect from relapse) could be one of the reasons. Recently, much progress has been made to understand the induction of memory T cells in animals and humans [123–126]. There is accumulating evidence from *in vivo* murine models that CD4<sup>+</sup> helper T cells play an important role in this phenomenon [13]. However, many DC-vaccination studies were designed to induce CD8<sup>+</sup> CTL responses without adapted TAA loading to stimulate the CD4<sup>+</sup> helper T-cell subset. In several other human clinical studies, antigens unrelated to tumor cells, such as the keyhole limpet hemocyanin, were used in combination with tumor antigens to activate CD4<sup>+</sup> T cells [72,79,95]. These antigens not borne by tumor cells may not be as efficient as TAAs, since CD4<sup>+</sup> T cells, in addition to their helper role, are often able to lyse tumor cells, thus probably contributing to the effector phase with CTLs [127,128]. Furthermore, when the source of antigens, such as TAA proteins or dead tumor cells, was compatible with induction of a CD4<sup>+</sup> T cell response, the immune monitoring of this response was not performed

and focused only on the expansion of tumor-specific CD8<sup>+</sup> CTLs. Without data concerning the CD4<sup>+</sup> T-cell response in these clinical studies, their role remains difficult to evaluate. However, a recent clinical study addressed this question [129]. Yee's group injected CD4<sup>+</sup> T cells specific for the NY-ESO-1 antigen in a patient with refractory metastatic melanoma, leading to a durable clinical remission. Finally, we recently demonstrated that human DCs matured *in vitro* by a combination of TNF- $\alpha$  and polyI:C are poor activators of long-term memory CD8<sup>+</sup> T cells and that exposure of these DCs to activated CD4<sup>+</sup> T cells several hours after addition of TNF- $\alpha$  and polyI:C strongly increased their capacity to induce memory T cells [SIMON T *ET AL.*, SUBMITTED MANUSCRIPT]. Thus, in the future, DC-based clinical studies should be designed to induce not only antitumor CD8<sup>+</sup> T cells, but also antitumor CD4<sup>+</sup> T cells that can in return increase DC functions.

#### Conclusion & future perspective

Dendritic cell-based vaccination against cancer is still a new and developing field that should benefit from the increasing knowledge of DC biology. Overall, the experience with DCs in cancer patients has shown that these cells can be safely administered with no or only mild side effects. Some of the issues that remain to be resolved concern the best signals required to produce mature/immunogenic DCs and the conditions necessary to improve their migration to the lymphoid organs where the interactions with T cells (helper and cytotoxic) take place. Importantly, the methods for immunological monitoring, especially of the CD4<sup>+</sup> antitumor T-cell response (i.e., proliferation assays, ELISPOT, tetramers or intracellular IFN- $\gamma$  staining) must allow for the development of better clinical efficiency of DC vaccines in the near future. These issues are complex, and yet so far just partially understood. Thus, defining the most appropriate stimulation conditions for DCs is not trivial and this issue in DC immunotherapy remains the matter of numerous investigations.

#### Highlights

- Dendritic cell maturation is required to increase efficiency of DC-based antitumor immunotherapy;
- Dendritic cells require two sequential signals to achieve full maturation: periphery signal (pathogen, inflammation or danger) and T-cell-derived signal (Th1 helper signal);

- Optimization of antitumor DC-based immunotherapy requires that: antitumor DC-based vaccination be performed at an earlier stage of cancer; DC-based vaccine should be designed to stimulate not only CD8<sup>+</sup> T cells, but also CD4<sup>+</sup> Th cells; and immunomonitoring of DC-based antitumor vaccine should be designed to measure not only CD8<sup>+</sup> T-cell response, but also CD4<sup>+</sup> T-cell response.

#### Financial & competing interests disclosure

This work was supported by grants from the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organisation or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

#### Executive summary

- In the 1990s, the discovery of tumor-associated antigens (TAAs) recognized by CD8<sup>+</sup> T cells prompted clinicians to develop an immunotherapeutic approach to treat cancer.
- It is now admitted that mature dendritic cells (DCs) are the most efficient antigen-presenting cells to induce a CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell response.
- More than 200 DC-based clinical trials have been performed in cancer patients.
- Four subsets of DCs were used: monocyte-derived DCs, CD34<sup>+</sup>-derived DCs, circulating myeloid DCs and DCs derived from leukemia blast cells.
- In approximately half the DC-based clinical trials, immature DCs were used.
- In clinical trials using mature DCs, more than ten different maturation factors were used alone or in combination.
- A number of different sources of TAAs have been used to load DCs with antigen (e.g., peptides, protein or cell lysates).
- In the majority of clinical trials, DCs were not loaded with a TAA recognized by CD4<sup>+</sup> T cells or were loaded with a tumor-unrelated antigen such as keyhole limpet hemocyanin.
- Intranodal, intralymphatic, subcutaneous or intradermal injections are now preferred to intravenous injections.
- TAA-specific T-cell responses were observed in the majority of DC-treated cancer patients and led, in a few cases, to objective clinical responses.
- TAA-specific T-cell responses were often transient and required multiple DC injections to be maintained.
- It is now admitted that signals from helper CD4<sup>+</sup> T cells are necessary for the DCs to efficiently stimulate long-term memory T cells. Thus, DC-based vaccines should be designed to stimulate not only CD8<sup>+</sup> T cells, but also CD4<sup>+</sup> helper T cells.
- DC-based vaccines are mainly used in late-stage cancer patients; they should be used at an earlier stage of the disease to increase their efficiency.

#### Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

\* of interest

\*\* of considerable interest

- Rosenberg SA: Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380–384 (2001).
- Banchereau J, Briere F, Caux C *et al.*: Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767–811 (2000).
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10, 909–915 (2004).
- Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252 (1998).
- Tarbell KV, Yamazaki S, Steinman RM: The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Semin. Immunol.* 18, 93–102 (2006).
- Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P *et al.*: IDO expands human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 3054–3062 (2007).
- Wu L, Liu YJ: Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 26, 741–750 (2007).
- Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A: Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 10–16 (1997).
- Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB: Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.* 2, 1010–1017 (2001).
- Matzinger P: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045 (1994).
- \*\* **Opinion paper that described the concept of the danger signal.**
- Reis e Sousa C: Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin. Immunol.* 16, 27–34 (2004).
- Binder RJ, Varner R, Srivastava P: The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 64, 442–451 (2004).
- Skoberne M, Beignon AS, Bhardwaj N: Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol. Med.* 10, 251–257 (2004).
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC: Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 685–711 (2003).
- Trautmann A, Valitutti S: The diversity of immunological synapses. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 249–254 (2003).
- Canellino F, Germain RN: Cooperation between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells: when, where, and how. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 519–540 (2006).
- Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M: Prostaglandin E<sub>2</sub> is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 100, 1354–1361 (2002).
- Guemourprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S: ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397–402 (2003).

- 19 Yewdell JW, Beutls E, Neefjes J: Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 952–961 (2003).
- 20 Kloetzel PM, Ossendorp F: Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 76–81 (2004).
- 21 Creusot RJ, Mitchison NA, Terazzini NM: The immunological synapse. *Mol. Immunol.* 38, 997–1002 (2002).
- 22 Trinchieri G: Immunobiology of interleukin-12. *Immunol. Rev.* 17, 269–278 (1998).
- 23 de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML: Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin. Immunopathol.* 26, 289–307 (2005).
- 24 Mackey MF, Gunn JR, Maliszewsky C, Kikutani H, Noelle RJ, Barth RJ Jr: Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J. Immunol.* 161, 2094–2098 (1998).
- 25 Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P: A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4<sup>+</sup> T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474–478 (1998).
- 26 Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ: T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions. *Nature* 393, 480–483 (1998).
- 27 Kalsdy MF, Onaitis MW, Emami S, Abdel-Wahab Z, Tyler DS, Pruitt SK: Sequential delivery of maturation stimuli increases human dendritic cell IL-12 production and enhances tumor antigen-specific immunogenicity. *J. Surg. Res.* 116, 24–31 (2004).
- 28 Figdor CG, de Vries J, Lesterhuis WJ, Melief CJ: Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat. Med.* 10, 475–480 (2004).
- 29 Newle FO, Faikas A, Conrad C: Dendritic cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 163–169 (2005).
- 30 Banchereau J, Palucka AK: Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 296–306 (2005).
- 31 Thomas-Kasel AK, Waller CF, Schultze-Seemann W, Veelken H: Immunotherapy with dendritic cells for prostate cancer. *Int. J. Cancer* 121, 467–473 (2007).
- 32 Schendel DJ: Dendritic cell vaccine strategies for renal cell carcinoma. *Expert Opin. Biol. Ther.* 7, 221–232 (2007).
- 33 Pinzon-Charry A, Schmidt C, Lopez JA: Dendritic cell immunotherapy for breast cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 6, 591–604 (2006).
- 34 Reichardt VL, Brossart P: Dendritic cells in clinical trials for multiple myeloma. *Methods Mol. Med.* 109, 127–136 (2005).
- 35 Duncan C, Roddie H: Dendritic cell vaccines in acute leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 21, 521–541 (2008).
- 36 Atreya I, Neurath MF: Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 8, 561–572 (2008).
- 37 Luptawan A, Liu G, Yu JS: Dendritic cell immunotherapy for malignant gliomas. *Rev. Recent Clin. Trials* 3, 10–21 (2008).
- 38 Sallusto F, Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118 (1994).
- \* Described for the first time an *in vitro* method to produce, from monocytes, large quantities of myeloid dendritic cells (DCs) that are usable in clinical approaches.
- 39 Schuler G, Romani N: Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *Adv. Exp. Med. Biol.* 417, 7–19 (1997).
- 40 Berger TG, Feuerstein B, Strasser E *et al.*: Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. *J. Immunol. Methods* 268, 131–140 (2002).
- 41 Boccaccio C, Jacod S, Kaiser A, Boyer A, Abastado JP, Nardin A: Identification of a clinical-grade maturation factor for dendritic cells. *J. Immunother.* 25, 88–96 (2002).
- 42 Royer PJ, Tanguy-Royer S, Eberstein F *et al.*: Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells. *Satnd. J. Immunol.* 63, 401–409 (2006).
- 43 Erdmann M, Dorrie J, Schaft N *et al.*: Effective clinical-scale production of dendritic cell vaccines by monocyte elutriation directly in medium, subsequent culture in bags and final antigen loading using peptides or RNA transfection. *J. Immunother.* 30, 663–674 (2007).
- 44 Zou GM, Tam YK: Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur. Cytokine New.* 13, 186–199 (2002).
- 45 Caux C, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C *et al.*: Human dendritic Langerhans cells generated *in vitro* from CD34<sup>+</sup> progenitors can prime naive CD4<sup>+</sup> T cells and process soluble antigen. *J. Immunol.* 155, 5427–5435 (1995).
- \* Described for the first time an *in vitro* method to produce from CD34<sup>+</sup> progenitors, large quantities of myeloid DCs that are usable in clinical approaches.
- 46 Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M *et al.*: Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34<sup>+</sup> progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 61, 6451–6458 (2001).
- 47 Paczesny S, Banchereau J, Witkowski KM, Saracino G, Fay J, Palucka AK: Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8<sup>+</sup> T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34<sup>+</sup> progenitor-derived dendritic cells. *J. Exp. Med.* 199, 1503–1511 (2004).
- 48 Fong L, Engleman BG: Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 245–273 (2000).
- 49 Caux C, Denzter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J: GM-CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258–261 (1992).
- 50 Montarini R, Anichini A, Di Nicola M *et al.*: Autologous dendritic cells derived from CD34<sup>+</sup> 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 (1997).
- 51 Rutzinger G, Baggers J, de Cos MA *et al.*: Mature human Langerhans cells derived from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 173, 2780–2791 (2004).
- 52 Fong L, Hou Y, Rivas A *et al.*: Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 8809–8814 (2001).
- 53 Maraskovsky E, Daro E, Roux B *et al.*: *In vivo* generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96, 878–884 (2000).
- 54 Mohy M, Olive D, Gaugler B: Leukemic dendritic cells: potential for therapy and insights towards immune escape by leukemic blasts. *Leukemia* 16, 2197–2204 (2002).

- 55 Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovskiy J, Munz C, Bhardwaj N: Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193, 233–238 (2001).
- 56 De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM *et al.*: Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res.* 63, 12–17 (2003).
- 57 McIlroy D, Grégoire M: Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 583–591 (2003).
- 58 Legler DF, Krause P, Scandella E, Singer E, Grottrup M: Prostaglandin E<sub>2</sub> is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors. *J. Immunol.* 176, 966–973 (2006).
- 59 Jongmans W, Tiemessen DM, van Vlodrop IJ, Mulders PF, Oosterwijk E: Th1-polarizing capacity of clinical-grade dendritic cells is triggered by Ribomunyl® but is compromised by PGE<sub>2</sub>, the importance of maturation cocktails. *J. Immunother.* 28, 480–487 (2005).
- 60 Boullart AC, Aarntzen EH, Verdijk P *et al.*: Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E<sub>2</sub> results in high interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1589–1597 (2008).
- 61 Dauer M, Lam V, Arnold H *et al.*: Combined use of toll-like receptor agonists and prostaglandin E<sub>2</sub> in the FastDC model: rapid generation of human monocyte-derived dendritic cells capable of migration and IL-12p70 production. *J. Immunol. Methods.* 337, 97–105 (2008).
- 62 Lee JJ, Foon KA, Maillard RB, Muthuswamy R, Kalinski P: Type 1-polarized dendritic cells loaded with autologous tumor are a potent immunogen against chronic lymphocytic leukemia. *J. Leukoc. Biol.* 84, 319–325 (2008).
- 63 Gigante M, Mandic M, Wess AK *et al.*: Interferon-alpha (IFN-α)-conditioned DC preferentially stimulate type-1 and limit Treg-type *in vitro* T-cell responses from RCC patients. *J. Immunother.* 31, 254–262 (2008).
- 64 Quillien V, Moisan A, Carstin A *et al.*: Biodistribution of radiolabelled human dendritic cells injected by various routes. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 32, 731–741 (2005).
- 65 Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lyerly HK: Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res.* 59, 56–58 (1999).
- 66 Kalinski P, Schuitmaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML: Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-γ and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J. Immunol.* 162, 3231–3236 (1999).
- 67 Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F: Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 1, 311–316 (2000).
- 68 Lanzavecchia A, Sallusto F: Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106, 263–266 (2001).
- 69 Keene JA, Forman J: Helper activity is required for the *in vivo* generation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155, 768–782 (1982).
- 70 Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR: Induction of a CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4<sup>+</sup> T cell help. *J. Exp. Med.* 186, 65–70 (1997).
- 71 Wang JC, Livingstone AM: Cutting edge: CD4<sup>+</sup> T cell help can be essential for primary CD8<sup>+</sup> T cell responses *in vivo*. *J. Immunol.* 171, 6339–6343 (2003).
- 72 Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M *et al.*: Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4, 328–332 (1998).
- 73 Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G *et al.*: Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93, 4309–4317 (1999).
- 74 Thurner B, Haendle I, Roder C *et al.*: 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 (1999).
- 75 Schmidt SM, Schag K, Muller MR *et al.*: Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood* 102, 571–576 (2003).
- 76 Schmidt SM, Schag K, Muller MR *et al.*: Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res.* 64, 1164–1170 (2004).
- 77 Singh-Jasuja H, Emmerich NE, Rammensee HG: The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 187–195 (2004).
- 78 Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F *et al.*: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 2, 52–58 (1996).
- 79 Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA *et al.*: Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99, 1517–1526 (2002).
- 80 Reichardt VL, Okada CY, Liso A *et al.*: Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma – a feasibility study. *Blood* 93, 2411–2419 (1999).
- 81 Reichardt VL, Milazzo C, Brugger W, Einsle H, Kanz L, Brossart P: Idiotype vaccination of multiple myeloma patients using monocyte-derived dendritic cells. *Hematologica* 88, 1159–1149 (2003).
- 82 Miza AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ: Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.* 14, 5000–5005 (2008).
- 83 Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E: Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med.* 184, 465–472 (1996).
- 84 Dorfel D, Appel S, Grunebach F *et al.*: Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with *in vitro*-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 105, 3199–3205 (2005).
- 85 Grunebach F, Muller MR, Nencioni A, Brossart P: Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Ther.* 10, 367–374 (2003).
- 86 Heiser A, Coleman D, Dannull J *et al.*: Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J. Clin. Invest.* 109, 409–417 (2002).

- 87 Nair SK, Boczkowski D, Morse M, Cumming RI, Lyerly HK, Gilboa E: Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes *in vitro* using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol* 16, 364–369 (1998).
- 88 Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Schuler G: Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 106, 271–274 (2001).
- 89 Palma M, Adamson L, Hansson L *et al.*: Development of a dendritic cell-based vaccine for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 57, 1705–1710 (2008).
- 90 Kyte JA, Gaudernack G: Immuno-gene therapy of cancer with tumour-mRNA transfected dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 55, 1432–1442 (2006).
- 91 Hao S, Moyana T, Xiang J: Review: cancer immunotherapy by exosome-based vaccines. *Cancer Biother Radiopharm* 22, 692–703 (2007).
- 92 Chaput N, Flament C, Viaud S *et al.*: Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. *J Leukoc Biol* 80, 471–478 (2006).
- 93 Moiseyenko V, Imyanitov E, Danilova A, Danilov A, Baldueva I: Cell technologies in immunotherapy of cancer. *Adv Exp Med Biol* 601, 387–393 (2007).
- 94 Schadendorf D, Paschen A, Sun Y: Autologous, allogeneic tumor cells or genetically engineered cells as cancer vaccine against melanoma. *Immunol Lett* 74, 67–74 (2000).
- 95 Hus J, Rolinski J, Tabackiewicz J *et al.*: Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 19, 1621–1627 (2005).
- 96 Gregoire M, Ligeza-Poisson C, Juge-Morineau N, Spisek R: Anti-cancer therapy using dendritic cells and apoptotic tumour cells: pre-clinical data in human mesothelioma and acute myeloid leukaemia. *Vaccine* 21, 791–794 (2003).
- 97 Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N: Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86–89 (1998).
- \* **First report showing *in vitro* antigen cross-presentation by human DCs.**
- 98 Steinman RM, Tuley S, Mellman I, Inaba K: The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191, 411–416 (2000).
- 99 Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N: 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 (2000).
- 100 Boizseau O, Gautier F, Cordel S *et al.*: Apoptosis induced by sodium butyrate treatment increases immunogenicity of a 1st colon tumor cell line. *Apoptosis* 2, 403–412 (1997).
- 101 Masse D, Eberlein F, Bougras G, Harb J, Mellah K, Gregoire M: Increased expression of inducible HSP 70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy. *Int J Cancer* 111, 575–583 (2004).
- 102 Terme M, Ulrich E, Delahaye NF, Chaput N, Zitvogel L: Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* 9, 486–494 (2008).
- 103 Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F *et al.*: Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13, 54–61 (2007).
- 104 Obeid M, Panaretakis T, Joza N *et al.*: Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of  $\gamma$ -irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 14, 1848–1850 (2007).
- 105 Apetoh L, Tesniere A, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L: Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Res* 68, 4026–4030 (2008).
- 106 Mackensen A, Krause T, Blum U, Uhrmeister P, Mertelsmann R, Lindemann A: Homing of intravenously and intralymphatically injected human dendritic cells generated *in vitro* from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Cancer Immunol Immunother* 48, 118–122 (1999).
- 107 Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman BG: Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* 166, 4254–4259 (2001).
- 108 Jonuleit H, Giesecke-Tuettgenberg A, Tuting T *et al.*: 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 (2001).
- 109 Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M *et al.*: Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* 104, 173–180 (1999).
- 110 Dhodapkar MV, Krasovskiy J, Steinman RM, Bhardwaj N: Mature dendritic cells boost functionally superior CD8<sup>+</sup> T-cell in humans without foreign helper epitopes. *J Clin Invest* 105, R9–R14 (2000).
- 111 Altman JD, Moss PA, Goulder PJ *et al.*: Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94–96 (1996).
- 112 Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Taskowski A: A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 65, 109–121 (1983).
- 113 Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159, 197–207 (1993).
- 114 Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J *et al.*: Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/Ii specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12837–12842 (2007).
- 115 Palucka AK, Ueno H, Fay JW, Banchereau J: Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev* 220, 129–150 (2007).
- 116 Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W: Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses *in vivo* after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96, 3102–3108 (2000).
- 117 Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB *et al.*: Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 9, 998–1008 (2003).
- 118 Wierzecky J, Muller MR, Wirths S *et al.*: Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res* 66, 5910–5918 (2006).
- 119 Aarntzen EH, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJ, de Vries IJ: Dendritic cell vaccination and immune monitoring. *Cancer Immunol Immunother* 57, 1559–1568 (2008).
- 120 Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD: Cancer immunoevasion: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991–998 (2002).
- 121 Dreano B, Nguyen JM, Khammari A *et al.*: Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 51, 539–546 (2002).

- 122 Labarrière N, Pandolfino MC, Gervois N *et al.*: Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 51, 532–538 (2002).
- 123 Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712 (1999).
- \* **First report to describe the two subsets of memory T cells: central memory and effector memory T cells.**
- 124 Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A: Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 194, 1711–1719 (2001).
- 125 Castellino F, Germain RN: Chemokine-guided CD4<sup>+</sup> T cell help enhances generation of IL-6R $\alpha^{\text{hi}}$ IL-7R $\alpha^{\text{hi}}$  prememory CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 178, 778–787 (2007).
- 126 Miller JD, van der Meer RG, Akondy RS *et al.*: Human effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 28, 710–722 (2008).
- 127 Chiarri R, Hames G, Stroobant V *et al.*: Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules. *Cancer Res.* 60, 4855–4863 (2000).
- 128 Larrieu P, Ouisse LH, Guilloux Y, Jotereau F, Fonteneau JF: A HLA-DQ5 restricted Melan-A/MART-1 epitope presented by melanoma tumor cells to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother.* 56, 1565–1575 (2007).
- 129 Hunder NN, Wallen H, Cao J *et al.*: Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4<sup>+</sup> T cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.* 358, 2698–2703 (2008).

Websites

- 201 Mater Medical Research Institute. Results of clinical trials using DC vaccines for cancer immunotherapy. [www.mmri.mater.org.au/index.php?option=com\\_content&task=view&id=62&Itemid=123](http://www.mmri.mater.org.au/index.php?option=com_content&task=view&id=62&Itemid=123)
- 202 Clinicaltrials.gov. A service of the US NIH. <http://clinicaltrials.gov/ct2/search>

Les cellules dendritiques (DC) font partie intégrante de l'immunité, à l'interface entre le système inné et le système adaptatif. De par leur capacité de présentation antigénique (sur les CMH de classe I et II), de maturation et de migration aux organes lymphoïdes secondaires, elles possèdent la propriété unique d'activer les lymphocytes T naïfs et de les induire en différenciation. Ainsi, elles sont à la base de la spécialisation lymphocytaire CD4 et CD8. Elles sont également capables d'interagir avec un grand nombre de types cellulaires (lymphocytes B, cellules NK, neutrophiles, éosinophiles, cellules endothéliales...). Les DC peuvent ainsi activer les réponses immunes ou au contraire les réguler, selon les conditions de maturation. Depuis plusieurs années, elles sont utilisées en thérapie anti-tumorale mais, malgré l'obtention de réponses lymphocytaires, les résultats cliniques restent encore décevants. Ainsi, une connaissance approfondie de la biologie des DC, associée à leur modalité de production est devenue primordiale. Ceci nous a amené à développer dans un premier temps les conditions de culture favorables à l'obtention des DC et à en déterminer les conséquences sur leur activation. Ensuite, nous avons mis au point un protocole de maturation séquentielle permettant aux DC d'acquérir des qualités fonctionnelles favorables à la mise en place d'une réponse immunitaire à long terme. L'ensemble de ce travail devrait ainsi contribuer à l'amélioration de la production de ces cellules pour leur utilisation en immunothérapie anti-tumorale.

Mots-clés : cellules dendritiques, immunothérapie, maturation, phénotype

II)

Dendritic cells (DC) are an integral part of immunity, at the interface between the innate and adaptive systems. With regards to antigenic presentation capacity (on class I and II MHC), to maturation and migration to secondary lymphoid organs, they possess the unique property to activate naïve T lymphocytes and to induce their differentiation. Thus, they are at the basis of CD4 and CD8 lymphocyte specialization. They are able to interact with many cell types (B lymphocytes, NK cells, neutrophils, eosinophils, endothelial cells...). DC may stimulate immune responses or, on the contrary, regulate them, depending on maturation conditions. For many years, they've been used in anti-tumoral therapy but, despite of some lymphocyte responses, clinical results remain disappointing. Thus, DC biology and production mode must be thoroughly understood. Such preoccupations led us first to elaborate favourable culture conditions for DC generation and to determine the impact on DC activation. Second, we designed a sequential maturation protocol, allowing DC to acquire functional properties for establishment of a long term immune response. The study presented here should contribute to improvement of DC production for use in anti-tumoral immunotherapy

Key words :. dendritic cells, immunotherapy, maturation, phenotype