

**THÈSE**  
**pour le**

**DIPLÔME D'ÉTAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
PAR

Thomas DAVID

---

*Présentée et soutenue publiquement le 4 Décembre 2008*

**Effet du 5-aza-2'-désoxycytidine et de l'acide  
valproïque sur l'expression d'antigènes  
tumoraux dans le mésothéliome pleural malin**

Président : M. Jacques AUBRY, Professeur d'Immunologie

Membres du jury : Mlle. Marianne LE PRIELLEC, Docteur en  
Pharmacie

M. Stéphane BIRKLE, Maître de Conférences en  
Immunologie

# Sommaire

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX .....	7
ABREVIATIONS.....	8
Première partie : introduction générale .....	11
I. Le mésothéliome pleural malin .....	12
I. 1. Définition et situation anatomique .....	12
I. 2. Données épidémiologiques .....	13
I. 3. Facteurs étiologiques et mécanismes pathogéniques .....	14
I.3.1. Les fibres minérales .....	14
I.3.2. Le virus SV40.....	16
I.3.3. Autres facteurs étiologiques.....	17
I.3.4. Mécanismes moléculaires .....	18
I. 4. Etablissement du diagnostic.....	20
I.4.1. Analyses immunocytochimiques .....	21
I.4.2. Analyses immunohistochimiques .....	21
I.4.3. Dosage de marqueurs solubles.....	23
I. 5. Modalités thérapeutiques .....	26
I.5.1. La chirurgie .....	26
I.5.2. La chimiothérapie .....	27
I.5.3. La radiothérapie.....	28
II. L'immunité anti-tumorale .....	28
II.1. Emergence d'une théorie : de l'immunosurveillance à l'immunoédition .....	28
II.2. Les effecteurs de la surveillance immunitaire anti-tumorale.....	31
II.2.1. Les lymphocytes T cytotoxiques .....	31
II.2.2. Les cellules dendritiques.....	35
II.2.3. Les autres cellules effectrices de l'immunité anti-tumorales .....	46

II.3. Les antigènes de tumeurs.....	51
II.3.1. Les différentes techniques d'identification d'antigènes de tumeurs .....	51
II.3.2. Classification des antigènes .....	53
II.4. Les mécanismes d'échappement à la réponse antitumorale .....	58
II.4.1. Phénomène de tolérance. ....	59
II.4.2. Influence des facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales.....	60
II.4.3. Défaut d'activation des lymphocytes T.....	60
II.4.4. Résistance à l'apoptose .....	61
II.4.5. Lymphocytes T régulateurs.....	61
II.4.6. Localisation des tumeurs. ....	62
III. Immunothérapie du mésothéliome .....	62
IV. Intérêt de l'utilisation de molécules hypométhylant l'ADN et d'inhibiteurs d'histone désacétylase .....	63
IV. 1. Rôle et mécanisme de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones .....	63
IV.1.1. La méthylation de l'ADN.....	63
IV.1 2. L'acétylation des histones .....	65
IV.2. Modifications épigénétiques et oncogenèse .....	66
IV.3. Mécanisme d'action du 5-azacytidine, du 5-aza-2'-désoxycytidine et de l'acide valproïque .	66
IV.3.1. Le 5-aza-2'-désoxycytidine et du 5-azacytidine .....	66
IV.3.2. L'acide valproïque.....	68
IV. 4. Méthylation de l'ADN, acétylation des histones et expression d'antigènes tumoraux.....	68
IV.4.1. Généralités .....	68
IV.4.2. Molécules hypométhylantes et expression des antigènes tumoraux.....	70
V. Choix des antigènes tumoraux étudiés.....	71
V.1. Les antigènes tumoraux de type testiculaire .....	71
V.2. La mésothéline et la mucine-1.....	72
VI. Objectif de l'étude.....	73
Deuxième partie : partie expérimentale .....	74

MATERIEL ET METHODES .....	75
I. Patients.....	75
II. Lignées cellulaires.....	75
III.Traitement des cellules .....	75
III.1. Préparation des solutions-mères .....	75
III.2. Comparaison de l'efficacité du 5-azacytidine et du 5-aza-2'-désoxycytidine sur l'induction de l'expression d'antigènes tumoraux.....	75
III.3. Choix du mode de traitement .....	76
III.4. Test effet-dose du 5-aza-2'-désoxycytidine et de l'acide valproïque .....	76
IV. Extraction des ARN totaux .....	77
V. Traitement à la DNase et transcription inverse (RT).....	77
VI. Réaction d'amplification génique (PCR).....	78
VII. PCR en temps-réel.....	79
VIII. Etude de la persistance d'expression des gènes induits par le traitement au 5-azaCdR.....	80
IX. Fixation de l'anticorps anti-NY-ESO-1 .....	80
X. Activation de la réponse immunitaire.....	80
X.I. Etude de la réponse immunitaire après traitement des cellules avec 5-azaCdR ou VPA.....	80
X.II. Traitement des cellules avec 5-azaCdR et VPA .....	81
RESULTATS.....	82
I. Vérification de l'intégrité des ARN .....	82
II. Comparaison de l'efficacité du 5-azaCR et du 5-azaCdR sur l'induction de l'expression d'antigènes tumoraux (CTA et antigènes de différenciation) .....	82
III. Choix du mode de traitement .....	83
IV. Test effet-dose du 5-azaCdR et de l'acide valproïque .....	84
IV.1. Etude de la viabilité cellulaire .....	84
IV.2. Etude de la prolifération cellulaire.....	85
IV.2.1. Effets du 5-azaCdR.....	85
IV.2.2. Effets du VPA.....	86

V. PCR quantitative en temps réel.....	86
V.1. Mise au point de la qPCR .....	86
V.2. Induction de l'expression du transcrit <i>NY-ESO-1</i> .....	87
VI. Induction de l'expression de différents antigènes de tumeur par le 5-azaCdR et le VPA. ....	90
VII. Etude de la persistance d'expression des gènes induits par le traitement au 5-azaCdR.....	91
VIII. Fixation de l'anticorps anti- <i>NY-ESO-1</i> .....	91
IX. Activation de la réponse immunitaire .....	92
IX.1. Traitement des cellules avec 5-azaCdR ou VPA .....	92
IX.2. Traitement des cellules avec combinaison de 5-azaCdR et de VPA.....	94
DISCUSSION .....	97
PERSPECTIVES.....	102
CONCLUSION .....	103
BIBLIOGRAPHIE.....	104

## LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Représentation de la plèvre.....	12
<u>Figure 2</u> : Estimation de l'incidence du mésothéliome dans le monde.....	13
<u>Figure 3</u> : Principales caractéristiques biologiques des cellules de mésothéliome. ....	20
<u>Figure 4</u> : Processus de maturation de la mésothéline.....	24
<u>Figure 5</u> : Les trois phases de l'immunoédition.....	30
<u>Figure 6</u> : Synapse immunologique.....	31
<u>Figure 7</u> : Signaux de costimulation et activation des LT CD8.....	33
<u>Figure 8</u> : Mécanismes d'action des Lymphocytes T cytotoxiques. ....	34
<u>Figure 9</u> : Voies d'ontogénèse des cellules dendritiques. ....	36
<u>Figure 10</u> : Origines possibles des peptides présentés sur les molécules du CMH - I. ....	39
<u>Figure 11</u> : Origines des peptides présentés par le CMH-II. ....	40
<u>Figure 12</u> : Représentation schématique des molécules du CMH de classe I et II.....	41
<u>Figure 13</u> : Théories de polarisation Th <sub>1</sub> /Th <sub>2</sub> par les cellules dendritiques.....	45
<u>Figure 14</u> : Implication des lymphocytes T CD4 dans l'élimination des tumeurs.....	47
<u>Figure 15</u> : Activation des cellules NK par les cellules cibles. ....	49
<u>Figure 16</u> : Implication des lymphocytes B dans l'immunité anti-tumorale.....	50
<u>Figure 17</u> : Classification des antigènes de tumeur reconnus par les CTL.....	54
<u>Figure 18</u> : Représentation schématique de la protéine MUC-1. ....	57
<u>Figure 19</u> : Maintien des profils de méthylation au cours des divisions cellulaires par la méthyltransférases DNMT1. ....	64
<u>Figure 20</u> : Structure de la cytosine, de la 5-méthylcytosine et des agents hypométhylants 5-azacytidine et du 5-aza-2'-désoxycytidine.....	67
<u>Figure 21</u> : Métabolisation du 5-azacytidine (5-azaCR) et du 5-aza-2'-désoxycytidine (5-azaCdR) ...	67
<u>Figure 22</u> : Structure chimique de l'acide valproïque.....	68
<u>Figure 23</u> : Régulation épigénétique de l'expression des antigènes tumoraux de type testiculaires (CTA).....	69
<u>Figure 24</u> : (A) Electrophorégramme obtenu par la méthode des puces Agilent, (B) Gel de migration correspondant.....	82

<u>Figure 25</u> : Electrophorégramme des produits de PCR (A : <i>MSLN</i> , B : <i>MUC-1</i> , C : <i>NY-ESO-1</i> , D : <i>MAGE-1</i> et E : <i>MAGE-3</i> ) après traitement avec le 5-azaCR ou le 5-azaCdR. ....	83
<u>Figure 26</u> : Electrophorégramme des produits de PCR (A : <i>NY-ESO-1</i> et B : <i>MAGE-1</i> ) après traitement en une ou quatre doses de 5-azaCR ou de 5-azaCdR.....	84
<u>Figure 27</u> : Pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire des lignées Mésos 34, 47, 56 et 122, après traitement avec 5 mM de VPA .....	86
<u>Figure 28</u> : Courbes de dissociation pour les différents transcrits étudiés en qPCR « SYBR-Green ». 87	
<u>Figure 29</u> : Test effet-dose .....	89
<u>Figure 30</u> : Variation de l'expression du transcrit <i>NY-ESO-1</i> pour différentes lignées cellulaires, en fonction de la concentration en 5-azaCdR .....	89
<u>Figure 31</u> : Etude de la persistance d'expression de <i>NY-ESO-1</i> après traitement avec 0,5 µM de 5-azaCdR. ....	91
<u>Figure 32</u> : Fixation de l'anticorps anti <i>NY-ESO-1</i> à différentes concentrations (2,5 ; 5 et 10 µg/ml) sur les lignées de mélanome M117, M18 et M140. ....	92
<u>Figure 33</u> : Réponse du clone anti <i>NY-ESO-1</i> après traitement avec 5-azaCdR ou VPA.....	93
<u>Figure 34a</u> : Réponse du clone anti <i>NY-ESO-1</i> après traitement avec 5-azaCdR et VPA : témoins positifs et négatifs .....	95
<u>Figure 34b</u> : Réponse du clone anti <i>NY-ESO-1</i> après traitement avec 5-azaCdR et VPA : lignées de mésothéliomes HLA* A2O1. ....	96

## LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Evolution de l'incidence du mésothéliome en Europe.....	14
<u>Tableau II</u> : Les principaux arguments en faveur ou contre le rôle potentiel du SV40 dans l'étiologie du MPM.....	17
<u>Tableau III</u> : Les différents marqueurs disponibles pour le diagnostic immunohistochimique du mésothéliome. ....	22
<u>Tableau IV</u> : Séquence, température d'hybridation et taille des fragments amplifiés pour les différentes paires d'amorces utilisées en PCR. ....	78
<u>Tableau V</u> : Test effet-dose du 5-azaCdR et du VPA sur la viabilité de différentes lignées cellulaires tumorales.....	85
<u>Tableau VI</u> : Intensité d'expression des produits de qRT-PCR ( <i>RPLPO</i> , <i>MUC-1</i> , <i>MSLN</i> , <i>MAGE-1</i> , <i>MAGE-3</i> et <i>NY-ESO-1</i> ) en fonction du traitement 5-azaCdR 0,5µM ou VPA 5 mM.....	90

## ABREVIATIONS

5-azaCdR : 5-aza-2'-désoxycytidine

5-azaCR : 5-azacytidine

ADCC : Cytotoxicité dépendante des anticorps (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*)

ADNc: ADN complémentaire

AAT: Antigènes associés aux tumeurs

$\alpha$ GalCer:  $\alpha$ -GalactosylCeramide

ARNm: ARN messenger

$\beta$ 2M: Beta2-microglobuline

bp: paires de bases

BSA: Albumine de sérum bovin (*Bovine Serum albumine*)

CA: Antigène carbohydate (*Carbohydrate Antigen*)

CARD: Domaine de recrutement et d'activation des caspases (*Caspase Activation and Recruitment Domain*)

CCL: Protéines chimiotactiques des monocytes (*Chemokine CC-motif*)

Ligand CCR: Ligand du récepteur des CCL (*Chemokine CC-motif Receptor*)

CDK : Kinase cycline-dépendante (*Cyclin-dependent kinase*)

CEA: Antigène carcino-embryonnaire (*Carcino Embryonic Antigen*)

CK 5/6: Cytokératines 5/6

CLR: Récepteur de lectine de type C (*C-type Lectin Receptors*)

CP: Présentation croisée (*Cross-presentation*)

CPA: Cellules présentatrices d'antigènes

CR: Récepteurs du complément

cSMAC: *central Supramolecular Activation Cluster*

Ct : cycle-seuil (*cycle-threshold*)

CTA : Antigènes testiculaires du cancer (*Cancer Testis Antigens*)

CTL: Lymphocyte T cytotoxique

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Nonintegrin*

DO: Densité optique

dNTPs : désoxynucléotides

EGF: Facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor*)

EMA: Antigène de membrane épithéliale (*Epithelial Membrane Antigen*)

ER: Réticulum endoplasmique

ERK: Signal extracellulaire de régulation des kinases (*Extracellular signal-Regulated Kinases*)

E:T: Ratio effecteur/cible (*Effector/Target*)

Fas-L: ligand de Fas

Fc: Fragment constant des immunoglobulines

FcR: Récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines

FGF: Facteur de croissance du fibroblaste (*Fibroblast Growth Factor*)

GPI: GlycosylPhosphatidyl Inositol

HDACi: Inhibiteur d'activité histone désacétylase

HGF: Facteur de croissance des hépatocytes (*Hepatocyte Growth Factor*)

HLA: Antigène des leucocytes humains (*Human Leucocyte Antigen*)  
 HPV: Papillomavirus humain (*Human PapillomaVirus*)  
 HSP: Protéines de choc thermique (*heat shock proteins*)  
 HSVtk: thymidine kinase de l'herpes simplex virus (*Herpes Simplex Virus*)

ICAM: Molécule d'adhérence intra-cellulaire (*IntraCellular Adhesion Molecule*)  
 IFN: Interféron  
 IGF: Facteur de croissance analogue de l'insuline (*Insulin-like growth factor*)  
 IgG: Immunoglobuline de type G  
 IKDC: Cellule dendritique productrice d'IFN (*Interferon-producing Killer Dendritic Cell*)  
 IL: Interleukine  
 IPP: isopentenyl pyrophosphate

LEF: Facteur de transcription lymphoïde (*Lymphoid Enhancer Factor*)  
 LFA: Antigène associé à la fonction lymphocytaire (*Leucocyte Function Antigen*)  
 LPS: Lipopolysaccharide  
 LRR: Motif riche en leucine (*Leucin-Rich-Repeat*)  
 LT: Lymphocytes T  
 LTh: Lymphocyte T auxiliaire

MAGE: Antigènes associés au mélanome (*Melanoma Associated Genes*).  
 MAP: Protéine activatrice de mitose (*Mitogen Activated Protein*)  
 Melan-A/MART1: Antigène de mélanome A / Antigène de mélanome reconnu par les cellules T 1 (*Melanoma antigen A / melanoma antigen recognized by T cells 1*)  
 MICA/B: *CMH-IMHC class I-related Chain A/B*  
 MM: Mésothéliome malin  
 MMP: Matrix métalloprotéinases  
 MMR: Récepteur mannose des macrophages (*Macrophage Mannose Receptor*)  
 MPF: Facteur de potentialisation des mégacaryocytes (*Megakaryocyte-Potentiating Factor*)  
 MPM: Mésothéliome pleural malin  
 MSLN: Mésothéline  
 MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)  
 MUC: Mucine  
 M-MLV RT: Enzyme reverse transcriptase (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*)

NAT2: N-Acétyltransférases 2  
 NF2: NeuroFibromatosis type 2  
 NOD: Domaine de liaison aux nucléotides (*Nucleotide binding Oligomerization Domain*)  
 NK: Cellule naturelle tueuse (*Natural Killer*)  
 NKG2D: *Natural Killer Group protein 2 D*  
 NSE: Enolase spécifique de neurone (*Neuron-Specific Enolase*)  
 NY-ESO-1: New-York ESO-1

PAMP: Molécule signature pathogène (*Pathogen Associated Molecular Patterns*)  
 PBMCs: Cellules mononuclées du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)  
 PBS: Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered-Saline*)  
 PCR: Réaction d'amplification génique (*Polymerase Chain Reaction*)  
 PDGF: Facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-Derived Growth Factor*)  
 pRb: Protéine du rétinoblastome  
 PRR: Récepteur de molécule signature pathogénique (*Pattern Recognition Receptor*)  
 pSMAC: *peripheral Supramolecular Activation Cluster*  
 qPCR: PCR quantitative

ROX : carboxy-X-rhodamine

RPLPO : Protéine ribosomale (*large ribosomal protein*)  
RCA1: *Receptor-binding Cancer Antigen expressed on SiSo cells 1*  
RPM: Tours par minute  
RT : Transcription inverse (*Reverse Transcription*)

SEREX: *SER*ological *identif*ication of antigens by recombinant *EX*pression cloning  
SFRP: Protéines sécrétées apparentées aux frizzled (*Secreted Frizzled-Related Proteins*)  
SH: Sérum humain  
SMRP: Protéine soluble apparentée à la mésothéline (*Soluble Mesothelin Related Proteins*)  
SR: Récepteur scavenger (*Scavenger Receptor*)  
SV: *Simian Virus*  
SVF: Sérum de veau fœtal

Tag: Antigène Grand T (*large T antigen*)  
TAP: Transporteur de peptides (*Transporter associated with Antigen Processing*)  
TCF: Facteur de transcription de cellule T (*T-cell Factor*)  
TERT: Transcription inverse de la télomérase (*TElomerase Reverse Transcriptase*)  
TGF: Facteur de croissance transformant (*Transforming Growth Factor*)  
TILs: Lymphocytes infiltrants la tumeur (*Tumor Infiltrating Lymphocyte*)  
TIR: *Toll/IL-1R homology domain*  
TLR: *Toll-Like Receptor*  
TNF: Facteur de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor*)  
TRAIL: *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*  
Treg: Lymphocyte T régulateur  
TSA: Acide sialique total (*Total Sialic Acid*)  
TTF1: Facteur de transcription thyroïdien 1 (*Thyroid Transcription Factor 1*)

UV: Ultra-violet

VEGF: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor*)  
VNTR: Nombre variable de répétitions en tandem (*Variable Number of Tandem Repeats*)

WT1: Gène suppresseur de tumeur de wilm (*Wilms' Tumour 1 gene*)

Par convention, le nom des transcrits sera noté en italique, à l'inverse des protéines.  
Par exemple : *NY-ESO-1* correspond au transcrit et NY-ESO-1 désigne la protéine correspondante.

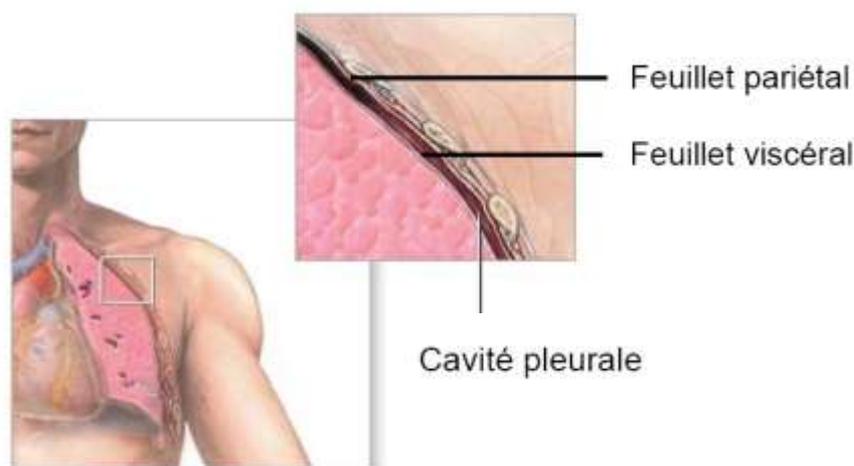
Première partie :  
**introduction générale**

# I. Le mésothéliome pleural malin

## I. 1. Définition et situation anatomique

Le mésothéliome est une tumeur primitive agressive résultant de la transformation maligne des cellules mésothéliales qui tapissent les cavités séreuses de l'organisme, telles que la plèvre, le péricarde et le péritoine, ainsi que les organes internes. Le type de mésothéliome le plus fréquemment rencontré se développe au niveau de la plèvre et est qualifié de mésothéliome pleural malin (MPM). Il représente environ 80% des cas de mésothéliome.

La plèvre est constituée d'un double feuillet qui isole les poumons de la paroi interne du thorax (Fig. 1). Ces deux feuillets, dont l'un adhère à la paroi thoracique (feuillet pariétal), et l'autre au poumon (feuillet viscéral), glissent l'un sur l'autre lors des mouvements respiratoires grâce notamment à la présence d'un liquide aux propriétés surfactantes dans la cavité pleurale, délimitée par les deux feuillets. Le liquide pleural est produit par la monocouche de cellules mésothéliales qui tapissent chacun des deux feuillets (Mutsaers *et al*, 2004 ; Mutsaers *et al*, 2007).



### Figure 1: Représentation de la plèvre.

Dans les conditions physiologiques, l'espace pleural délimité par les deux feuillets (viscéral et pariétal) est quasiment virtuel et ne contient que peu de liquide pleural).

Source: [http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100008\\_1.htm](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100008_1.htm) (21.06.2008)

Lors du développement d'un MPM, la cavité pleurale est envahie à la fois par les cellules mésothéliales tumorales et par du liquide pleural présent en quantité anormalement élevée. Si le volume normal du liquide pleural est de l'ordre de quelques millilitres, il peut atteindre plusieurs litres en cas d'atteinte par un cancer.

## I. 2. Données épidémiologiques

La relation entre l'exposition à l'amiante et le MPM a été établie il y a 40 ans par une étude portant sur des personnes qui travaillaient dans des mines d'amiante (Wagner *et al*, 1960). Une exposition à l'amiante pouvant être retrouvée dans 70 à 80% des cas de MPM (Gross-Goupil *et al*, 1999), ces dérivés asbestosiques sont considérés comme les principaux agents responsables de l'apparition de MPM. D'autres facteurs (radiations ionisantes, prédispositions génétiques ou virus) font l'objet de controverses et leur rôle dans l'étiologie du mésothéliome n'est pas clairement déterminé.

L'utilisation massive de l'amiante et de ses dérivés dans différents secteurs de l'industrie et du bâtiment à partir du début du XX<sup>ième</sup> ainsi que l'application tardive des mesures d'interdiction concernant l'utilisation de l'amiante (1997 en France) ont abouti à des expositions importantes à ces fibres dans de nombreux secteurs d'activités. De plus, le délai qui sépare l'exposition de la survenue d'un mésothéliome est long (30 à 40 ans). L'ensemble de ces facteurs explique l'augmentation constante de l'incidence du mésothéliome dans les pays industrialisés depuis les années 1970 (Fig. 2 et Tableau I) (Montanaro *et al*, 2003 ; Bianchi *et al*, 2007). Une étude récente prédisait un doublement du nombre de décès annuel en Europe d'ici 2020 (incidence annuelle estimée en France en 2020 : 3 cas pour 10<sup>5</sup> habitants) (Peto *et al*, 1999). Toutefois, cette équipe a depuis étudié les données cliniques devenues disponibles pour les années 1995 à 1999 et il s'est avéré que l'incidence réelle était inférieure à leurs prévisions (Pelucchi *et al*, 2004). Malgré tout, on s'attend à voir apparaître de plus en plus de cas de mésothéliome au cours des prochaines décennies.



**Figure 2 : Estimation de l'incidence du mésothéliome dans le monde**

La couleur des pays indique l'incidence estimée: gris foncé > 20 cas par million ; gris intermédiaire: 11- 20 cas par million ; gris clair < 11 cas par million ; en blanc, données non disponibles. D'après Bianchi *et al*, 2007.

PAYS	PERIODE				
	1970-74	1975-79	1980-84	1965-89	1990-94
Angleterre	0,33	0,52	0,69	1,05	1,20
France	0,68	0,87	1,08	1,36	1,42
Allemagne	0,52	0,60	0,79	0,93	1,14
Italie	0,74	0,75	0,98	1,14	1,24
Pays-Bas	0,84	1,13	1,71	2,02	2,39
Suisse	0,63	0,69	0,97	1,17	1,35
Hongrie	0,32	0,39	0,49	0,52	0,70

**Tableau I : Evolution de l'incidence du mésothéliome en Europe.**

Les valeurs correspondent à l'incidence pour  $10^5$  Habitants. D'après Peto et al, 1999

### I. 3. Facteurs étiologiques et mécanismes pathogéniques

Si la relation entre l'exposition à certaines fibres minérales et le développement d'un mésothéliome semble clairement établie (Robinson *et al*, 2005), d'autres facteurs pourraient aussi être impliqués dans l'étiologie de ce cancer.

#### I.3.1. Les fibres minérales

Comme nous l'avons déjà vu, la relation entre une exposition aux fibres d'amiante et l'apparition d'un MPM est connue depuis plus de 50 ans déjà (Wagner *et al*, 1960). L'amianté est un terme industriel désignant des minéraux à texture fibreuse utilisés dans l'industrie. Ce sont des silicates magnésiens ou calciques. Les diverses catégories d'amianté correspondent à plusieurs espèces minérales. Deux groupes de fibres minérales existent. Le groupe de la serpentine dont fait partie l'amianté blanc ou chrysolite qui est censé être le moins dangereux de tous. La serpentine est un minéral de la famille des phyllosilicates. Elle cristallise dans le système orthorhombique. Le deuxième groupe est celui des amphiboles dont font parties la crocidolite et l'aminosite. Les amphiboles sont des silicates de fer, de calcium ou de magnésium. Elles cristallisent dans les systèmes orthorhombique et monoclinique en prismes très allongés, avec un clivage typique selon les faces du prisme. Très largement répandus dans la nature, elles sont généralement de couleur sombre, mais peuvent varier du blanc au noir. En

général, ce sont des minéraux durs et lourds. Ils entrent en partie dans la constitution des roches magmatiques et métamorphiques. Les fibres d'amiante sont des minéraux aux propriétés physiques et chimiques exceptionnelles : ils ne brûlent pas, résistent remarquablement aux diverses agressions chimiques et présentent une résistance mécanique élevée à la traction. Ces propriétés ont favorisé le développement de l'utilisation des fibres d'amiante sous de multiples formes, que ce soit pour la fabrication de nombreux produits industriels de grande consommation ou dans la construction des bâtiments.

Une fois inhalées, les fibres d'amiante pénètrent et s'accumulent dans les poumons et le tissu pleural (Sebastien *et al*, 1980). Elles sont parfois responsables de l'apparition de pathologies bénignes (plaques pleurales, épanchements pleuraux bénins) ou malignes (mésothéliome, cancer du poumon) (Chapman *et al*, 2003 ; Cugell *et al*, 2004). Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans l'oncogenèse du MPM (Jaurand *et al*, 2005 ; Spugnini *et al*, 2006) :

- L'effet de la longueur des fibres, de leur épaisseur ou encore du ratio entre les deux sur le développement ultérieur de cancers a fait l'objet de nombreuses études. Il semblerait qu'un ratio longueur/diamètre élevé soit favorable à la pénétration des fibres dans la cavité pleurale et donc au développement ultérieur d'un mésothéliome (Dodson *et al*, 2003 ; Zucali *et al*, 2006). Ce ratio varie de 5/1 à 10/1 en fonction du type de fibres d'amiante.
- Les fibres d'amiante sont capables d'interagir de manière directe avec les chromosomes des cellules. Elles interfèrent ainsi avec le processus de mitose, générant des modifications importantes dans le caryotype des cellules (aneuploïdie, réarrangements chromosomiques) (Lechner *et al*, 1985 ; Yegles *et al*, 1993 ; Ault *et al*, 1995). Certaines de ces modifications sont fréquemment rencontrées et semblent nécessaires au développement du mésothéliome (Sandberg *et al*, 2001).
- Des dérivés oxygénés ou des radicaux libres formés par oxydoréduction à la surface de la fibre ou au cours de processus de phagocytose exerceraient un effet génotoxique (rupture de l'ADN et mutations) sur les cellules (Kamp *et al*, 1992 ; Dong *et al*, 1994 ; Jaurand *et al*, 1997 ; Upadhyay *et al*, 2003).
- Enfin, les fibres d'amiante entraînent la phosphorylation de certaines MAP kinases, notamment ERK1 et ERK2 (Zanella *et al*, 1996 ; Berken *et al*, 2003). La phosphorylation des protéines ERK induit l'activation du programme de division cellulaire.

Bien que tous les mécanismes impliqués dans la carcinogenèse ne soient pas encore complètement élucidés, et que les effets varient d'un type de fibre à l'autre (Jaurand *et al*, 1997), la causalité des fibres d'amiante dans le développement du MPM est bien établie. Cette prise de conscience a abouti à un abandon progressif de l'utilisation des dérivés asbestosiques dans l'industrie et le bâtiment. Cependant, 20% des patients porteurs de MPM n'ont a priori pas été exposés à l'amiante. D'autres agents étiologiques non asbestosiques sont donc régulièrement recherchés dans la physiopathogénie du MPM.

### **1.3.2. Le virus SV40**

Le SV40 appartient à la famille des *Papovaviridae* (genre *Polyomavirus*). Son rôle éventuel dans le développement du mésothéliome est très controversé, et ce, depuis de nombreuses années. Le débat quant au rôle du SV40 dans l'oncogenèse du MPM reste ouvert puisque certains arguments semble indiquer que le SV40 est impliqué dans l'étiologie du MPM tandis que d'autres indiquent le contraire (Tableau II).

Arguments positifs	Arguments négatifs
<p>Le SV40 est capable d'induire l'immortalisation et la transformation maligne de cellules humaines malgré des variations en fonction du type cellulaire infecté ( Saenz-Robles <i>et al</i>, 2001 ; Carbone <i>et al</i>, 2003). Les cellules mésothéliales sont particulièrement sensibles à une transformation par le SV40 car elles sont peu lysées suite à une infection et parmi les cellules survivantes, la fréquence de transformation est élevée (Bocchetta <i>et al</i>, 2000 ; Carbone <i>et al</i>, 2003). Action sur la transformation des cellules via la protéine Tag qui a la capacité d'inactiver des protéines inhibitrices de tumeur (protéine p53 et la protéine du rétinoblastome (pRb)) ou encore d'induire l'activité télomérase (Carbone <i>et al</i>, 1997 ; Foddis <i>et al</i>, 2002).</p>	<p>Certaines études incriminant le SV40 dans l'étiologie du MPM sont basées sur des modèles animaux (Cicala <i>et al</i>, 1993). Or, le type cellulaire et l'espèce à laquelle appartiennent les cellules modifient considérablement l'impact de l'infection virale. Il paraît donc difficile de se fier à de telles expérimentations pour affirmer ou infirmer le rôle éventuel du SV40 en tant que facteur responsable de l'apparition du MPM.</p>

Arguments positifs	Arguments négatifs
De nombreuses personnes ont pu être infectées par ce virus de par l'utilisation entre 1955 et 1963 de vaccins antipoliomyélitiques contaminés et ce, dans de nombreux pays	La prévalence des personnes contaminées n'est pas clairement établie à ce jour (Gazdar <i>et al</i> , 2002). La cohorte de personnes potentiellement infectées correspond à celle qui développe des MPM, mais il s'agit aussi d'une population exposée à l'amiante. Aucune étude n'a apporté la preuve irréfutable de l'implication du SV40 dans le développement d'un MPM chez ces personnes (Leithner <i>et al</i> , 2006).
Depuis les années 1970, la présence de séquences de l'ADN ou de produits de gènes du SV40 a été fréquemment détectée dans différents types de tumeurs humaines, et en particulier dans le mésothéliome (Carbone <i>et al</i> , 2003 ; Gazdar <i>et al</i> , 2002).	
D'autres équipes n'ont en revanche pas pu mettre en évidence la présence du SV40 dans les tumeurs (Jasani <i>et al</i> , 2001 ; Carbone <i>et al</i> , 2003). L'existence de faux positifs et de faux négatifs peuvent expliquer les divergences observées (Jasani <i>et al</i> , 2001 ; Leithner <i>et al</i> , 2006). Les anticorps ainsi que les amorces utilisés ne sont pas tous équivalents (Pilatte <i>et al</i> , 2000 ; Hubner <i>et al</i> , 2002) et sont source d'erreurs pour l'interprétation.	

**Tableau II : Les principaux arguments en faveur ou contre le rôle potentiel du SV40 dans l'étiologie du MPM.**

### ***1.3.3. Autres facteurs étiologiques***

Certaines anomalies génétiques contribueraient aussi à l'étiologie du MPM. Dans une région de la Turquie, deux villages exposés aux fibres d'érionites présentent des fréquences de mésothéliome très différentes : dans un des deux villages, la moitié des hommes sont morts suite à un mésothéliome alors que dans l'autre, un seul cas a été rapporté (Roushdy-Hammady *et al*, 2001). La réalisation d'arbres généalogiques dans ces populations a permis de mettre en évidence une prédisposition génétique au développement de MPM (Roushdy-Hammady *et al*, 2001 ; Dogan *et al*, 2006). Des pertes chromosomiques ont été détectées dans des familles avec plusieurs cas de mésothéliomes mais les gènes associés n'ont pas été identifiés (Ascoli *et al*, 2001). Une équipe a démontré que les sujets présentant une délétion homozygote du gène *GSTM1* (codant la glutathion S-transférase M1) ou possédant des allèles de la N-acétyltransférases 2 à l'origine d'un phénotype « acétylateur lent » présenteraient un risque accru de survenue de mésothéliome malin (Hirvonen *et al*, 1995 ; Hirvonen *et al*, 1996). Une autre étude a au contraire permis d'observer une proportion plus importante de sujets « acétylateurs

rapides » chez les patients atteints de mésothéliome que chez les sujets normaux (Neri *et al*, 2005). Pour l'instant, on ne dispose d'aucune explication concernant ces différences. Ces exemples illustrent le fait qu'il existe des marqueurs de susceptibilité génétique, présents chez des populations à risque accru, mais qu'il est nécessaire de les étudier encore.

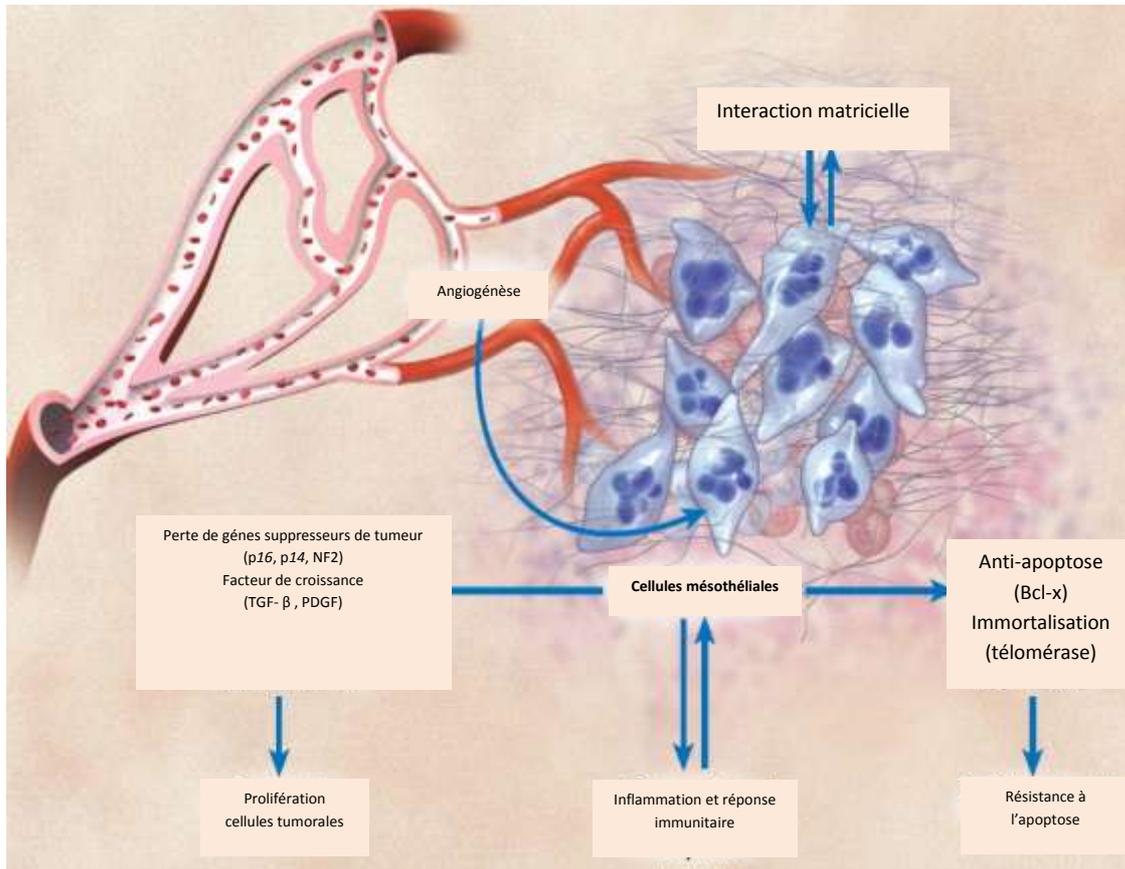
L'exposition à des radiations ionisantes ou des séquelles d'infection pleurale (inflammation chronique) ont aussi été rapportées comme pouvant jouer un rôle dans la survenue ultérieure d'un MPM (Brenner *et al*, 1982 ; van Kaick *et al*, 1999). Les radiations ionisantes représentent des cancérogènes certains chez l'homme et il semble donc logique de considérer des irradiations importantes de la plèvre comme une cause de mésothéliome. Cependant, il n'existe pas de preuve irréfutable que les radiations ionisantes induisent le développement d'un MPM chez l'homme à l'heure actuelle.

#### ***1.3.4. Mécanismes moléculaires***

Les mécanismes par lesquels les cellules mésothéliales donnent naissance à des cellules malignes de mésothéliome sont eux aussi loin d'être complètement élucidés. Néanmoins, la durée élevée de la période de latence (30-35 ans) (Selikoff *et al*, 1980) laisse à penser que le processus de transformation résulte de l'acquisition de nombreuses particularités biologiques par les cellules avant qu'elles ne deviennent des cellules de MPM (Fig. 3, page 20) (Hanahan *et al*, 2000 ; Robinson *et al*, 2005 ; Spugnini *et al*, 2006 ; Zitvogel *et al*, 2006). Ces cellules présentent en effet l'ensemble des caractéristiques suivantes :

- **Capacité à induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse).** Les cellules de mésothéliome, comme toutes les cellules tumorales qui se multiplient de manière importante, ont des besoins en nutriments élevés. Elles produisent des facteurs angiogéniques puissants tels que le VEGF (Masood *et al*, 2003) ou l'IL-8 (Galffy *et al*, 1999).
- **Autosuffisance en facteurs de croissance.** Ces cellules produisent et répondent à de nombreux facteurs de croissance comme le PDGF A et B (Versnel *et al*, 1991 ; Langerak *et al*, 1996), l'EGF (Dazzi *et al*, 1990), le TGF- $\beta$  (Fitzpatrick *et al*, 1994 ; Marzo *et al*, 1997) ou encore l'IGF (Lee *et al*, 1993).

- **Perte de sensibilité vis-à-vis des signaux d'inhibition de la croissance cellulaire.** Les gènes p16 et p14, impliqués dans les voies de signalisation de Rb et p53, ne sont généralement plus exprimés par les cellules de MPM (Cheng *et al*, 1994 ; Hirao *et al*, 2002 ; Wong *et al*, 2002). La conséquence qui en résulte se traduit par une perte de la régulation du cycle cellulaire et l'acquisition de mécanismes de résistance à l'apoptose.
  
- **Possibilité de se diviser indéfiniment (immortalisation).** Environ 90% des mésothéliomes présentent une activité télomérase qui participe à leur immortalisation (Dhaene *et al*, 2000 ; Kumaki *et al*, 2002). La TERT est une enzyme dont la fonction est de rajouter des motifs d'acides nucléiques (TTAGGG) à l'extrémité des chromosomes et maintient ainsi leur intégrité au cours des divisions cellulaires (Stewart *et al*, 2006). Les cellules somatiques saines perdent l'expression de la TERT, et, à partir d'un certain nombre de division, entrent dans un processus de dégénérescence dû au raccourcissement des chromosomes. De plus, la transcription de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et du développement tumoral sont sous contrôle de la voie Wnt, une voie activée dans les cellules de mésothéliome (Uematsu *et al*, 2003 ; Lee *et al*, 2004).
  
- **Acquisition de mécanismes de résistance à l'apoptose.** Certaines protéines anti-apoptotiques, comme la protéine Bcl-xL, sont surexprimées par le mésothéliome (Soini *et al*, 1999) et confèrent à ces cellules une résistance vis-à-vis des signaux inducteurs de l'apoptose (dommages sur l'ADN, retrait de facteurs de croissance, stress hypoxique ou thermique, système perforine / granzyme B, ligation de Fas ou TNF $\alpha$ ) (Riedl *et al*, 2004).
  
- **Invasion des tissus voisins et interactions avec la matrice extracellulaire.** Les cellules du MPM sont caractérisées par une invasion rapide des structures intra-thoraciques. L'expression de protéases leur permet de moduler la matrice extracellulaire riche en collagène qui constitue leur environnement (Harvey *et al*, 2000 ; Liu *et al*, 2001 ; Edwards *et al*, 2003).



**Figure 3 : Principales caractéristiques biologiques des cellules de mésothéliome.**

L'approvisionnement des cellules de mésothéliome en nutriments indispensables à leur croissance est assuré par la formation de vaisseaux sanguins (angiogenèse). La matrice extracellulaire fournit un support au développement de la tumeur. La prolifération cellulaire est aussi assurée par des facteurs de croissance (PDGF, TGF $\beta$ ) et la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeur comme p16, p14 et NF2 (NeuroFibromatosis type 2). L'activation de la télomérase et de mécanismes de résistance à l'apoptose les rend résistantes à la mort cellulaire ainsi qu'à l'élimination par l'hôte. D'après Robinson *et al*, 2005.

## I. 4. Etablissement du diagnostic

Les principaux symptômes du MPM sont assez peu spécifiques et apparaissent tardivement (Scherpereel *et al*, 2007). Difficulté respiratoire, douleur thoracique, toux, anorexie, faiblesse généralisée, perte de poids et fièvre font partie du tableau clinique du MPM. Devant l'absence de signes spécifiques, on comprend aisément que le diagnostic de MPM n'est pas fondé sur les seuls critères cliniques. Le contexte épidémiologique doit aussi être pris en compte mais il n'apporte pas toujours suffisamment d'informations pour affirmer qu'on se trouve face à un MPM. Les techniques d'imagerie ne permettent pas non plus d'établir un diagnostic de certitude car elles ne différencient pas le MPM des autres affections pouvant se développer à cette localisation. Pour établir un diagnostic de MPM, il est nécessaire de réaliser des marquages sur des cellules et/ou des biopsies issues de patients. Doser certaines protéines dans le sang ou les liquides pleuraux pourrait aussi représenter une alternative intéressante.

### ***1.4.1. Analyses immunocytochimiques***

L'immunocytochimie est une méthode d'analyse des cellules, *in situ*, par une technique d'immunofluorescence, dont l'échantillon est une préparation cytologique. Les analyses immunocytochimiques consistent à réaliser des marquages sur les cellules présentes dans les liquides d'épanchement. Malgré l'amélioration des techniques et des appareillages disponibles, ces marquages ne permettent pas toujours de conclure sur la nature des cellules. Il est en effet très difficile de faire la distinction entre des cellules de MPM et des cellules mésothéliales bénignes. De plus, il arrive qu'il n'y ait pas de cellule dans l'épanchement, ce qui rend bien évidemment impossible la mise en œuvre de ce type d'analyse. Il est donc souvent nécessaire de recourir à des techniques plus invasives pour prélever des échantillons de tissus en vue de réaliser des marquages sur ces derniers.

### ***1.4.2. Analyses immunohistochimiques***

L'immunohistochimie est le processus de détection d'antigènes dans les tissus au moyen d'anticorps. Ce type d'analyse représente à l'heure actuelle un des meilleurs outils diagnostiques dans le cadre du MPM. Il permet notamment de différencier un mésothéliome d'autres affections malignes (adénocarcinomes, carcinomes et même sarcomes) ou bénignes (hyperplasie mésothéliale). C'est en 1979 que l'utilité de faire de marquages histologiques afin de différencier les MPM d'autres types de cancers a été démontrée pour la première fois (Wang *et al*, 1979). Dans cette étude, les auteurs ont démontré qu'un marquage sur le CEA exprimé par les adénomes carcinomes mais pas par les MPM, peut s'avérer utile pour établir un diagnostic différentiel entre ces deux pathologies. Depuis, de nombreux marqueurs ont été décrits. Les marqueurs dits négatifs (exprimés par des cancers comme les adénomes carcinomes par exemple mais pas par le mésothéliome) ont été identifiés en premier. Puis, dans les années 1990, des marqueurs dits positifs (exprimés par le mésothéliome cette fois) ont à leur tour fait leur apparition (Ordonez *et al*, 2002). De nombreux marqueurs sont maintenant disponibles (Tableau III, page 22).

Devant le nombre croissant de marqueurs disponibles et afin d'homogénéiser les procédures de diagnostic en France, un groupe d'experts, le MESOPATH, a défini les marqueurs à utiliser pour établir le diagnostic de MPM.

Marqueurs positifs	Marqueurs négatifs
Podoplanine	Epithelial cell adhesion molecule
<b>Calretinine</b>	MOC-31
<b>CK 5/6 ou kératines large spectre</b>	<b>Ber-Ep4</b>
<b>WT1</b>	HEA 125
Thrombomoduline	AUA1
N-cadherine	<b>CEA</b>
Mésothéline	<b>B72.3</b>
<b>EMA (marquage membranaire)</b>	BG-8
	CD15
	CA 19-9
	<b>EMA (marquage cytoplasmique)</b>
	<b>TTF1</b>
	E-cadherine
	<b>CD34</b>
	<b>Bcl-2</b>
	<b>Desmine</b>

### Tableau III : Les différents marqueurs disponibles pour le diagnostic immunohistochimique du mésothéliome.

Les marqueurs dont l'utilisation est recommandée par le groupe d'experts MESOPATH apparaissent en rouge. Deux marqueurs positifs et deux marqueurs négatifs doivent être associés pour établir un diagnostic de certitude. (Ordonez *et al*, 2002 ; Scherpereel *et al*, 2006 ; Ordonez *et al*, 2006 ; Ordonez *et al*, 2007).

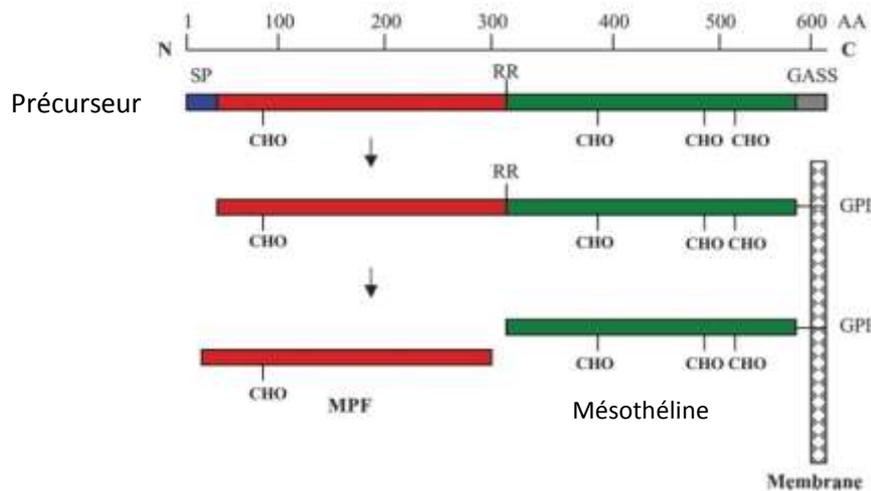
Bien qu'il y ait de nombreux marqueurs disponibles à l'heure actuelle, il est parfois impossible d'établir le diagnostic par cette technique. Des recherches sont donc toujours en cours afin d'identifier un marqueur qui serait plus sensible et plus spécifique du mésothéliome mais du fait de l'hétérogénéité de ce cancer, qui peut être différencié en plusieurs sous-types histologiques (épithélioïde, sarcomatoïde, biphasique et desmoplastique), il semble peu probable qu'on identifie un jour un tel marqueur. Le dosage de protéines présentes dans le sang ou dans le liquide d'épanchement, semble prometteur pour aider à établir le diagnostic et éventuellement tester des populations à risque (individus exposés à l'asbestose).

### **1.4.3. Dosage de marqueurs solubles**

Le dosage de marqueurs sériques est fréquemment réalisé pour aider à établir le diagnostic, ou pour suivre les réponses aux traitements dans différents types de cancers (Perkins *et al*, 2003 ; Seregini *et al*, 2004 ; Tarro *et al*, 2005 ; Yuen *et al*, 2005 ; Duffy *et al*, 2006 ; Steinbach *et al*, 2006) Les marqueurs tels que CEA, CA19-9, CYFRA21-1 (*cytokeratine fragment 19*), acide hyaluronique, CA125 ont été dosés dans les sérums et/ou les liquides pleuraux de patients (Freboung *et al*, 1987 ; Lee *et al*, 1999 ; Schouwink *et al*, 1999 ; Miedouge *et al*, 1999 ; Fuhrman *et al*, 2000 ; alata *et al*, 2001 ; Paganuzzi *et al*, 2001 ; Thylen *et al*, 2001 ; Hedman *et al* M, 2003 ; Villena *et al*, 2003). Cependant leur manque de sensibilité ou de spécificité vis-à-vis du MPM a pour conséquence que leur utilisation semble peu pertinente dans le cadre de ce cancer. La recherche de nouveaux marqueurs est toujours d'actualité et des techniques allant de l'analyse des protéines sériques par spectrométrie de masse à l'analyse des gènes exprimés par les cellules tumorales sont actuellement employées à cette fin (Posadas *et al*, 2005). Malgré les efforts intensifs fournis ces dernières années pour identifier le marqueur idéal, il n'y a finalement que peu de protéines qui pourraient s'avérer intéressantes pour établir le diagnostic de MPM, donner un pronostic ou encore suivre la réponse tumorale suite à la mise en œuvre d'un traitement chez les patients. Parmi les marqueurs les plus étudiés figurent l'ostéopontine, le CA125, RCAS1, le MPF et surtout, les formes solubles de la mésothéline qui semblent de loin être les plus prometteuses.

#### **1.4.3.a. Dosage de formes solubles de la mésothéline**

La mésothéline (MSLN) est une glycoprotéine de 40 kDa exprimée à la surface des cellules mésothéliales qui tapissent la plèvre, le péricarde et le péritoine. Cette protéine est surexprimée par les cellules du mésothéliome, du cancer pancréatique et du cancer de l'ovaire (Chang *et al*, 1996 ; Hassan *et al*, 2004 ; Hassan *et al*, 2007). La protéine codée par le gène de la mésothéline est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 69 kDa clivé par la furine en deux protéines distinctes : une protéine soluble de 31 kDa, le MPF (*Megakaryocyte-Potentiating Factor*), et la mésothéline, attachée à la membrane par le biais d'un groupement GPI (Fig. 4, page 24) (Hassan *et al*, 2004).



**Figure 4: Processus de maturation de la mésothéline.**

La protéine codée par le gène de la MSLN est un précurseur de 622 A.A., possédant 4 sites de glycosylation (CHO) et un site de clivage furine (RR). Après élimination de la séquence signal du peptide (SP en bleu) et de la séquence d'ancrage glycosylphosphatidyl inositol (GASS en gris), la protéine est clivée au niveau du site RR. La mésothéline se retrouve donc attachée à la membrane tandis que le MPF est libéré dans l'environnement de la cellule. D'après Hassan *et al*, 2004.

Des formes solubles de protéines apparentées à la mésothéline, ou SMRPs, ont été détectées pour la première fois dans des sérums de patients atteints de carcinomes ovariens (23/30 sérums positifs, soit 77%) et pulmonaires (6/9 sérums positifs, soit 66%) (Scholler *et al*, 1999). En 2003, une équipe australienne a publié des résultats de dosages sériques de protéines apparentées à la mésothéline chez des patients atteints de MPM ou d'autres types de pathologie pleurale ou pulmonaire (Robinson *et al*, 2003). 84% des patients atteints de MPM présentaient un taux de SMRPs élevé contre 4% pour les autres patients. Des patients sains exposés à l'amiante ont également été inclus dans cette étude et il s'est avéré que 7/40 possédaient un taux sérique important de SMRP. Parmi ces 7 patients, 3 ont développé un MPM et un autre un cancer du poumon, suggérant ainsi un intérêt potentiel du dosage des SMRPs chez des individus exposés à des dérivés asbestosiques. Plusieurs études ont par la suite confirmé ces résultats et apporté quelques précisions sur les dosages de SMRPs dans le cas du MPM (Scherpereel *et al*, 2006 ; Creaney *et al*, 2007 ; Pass *et al*, 2008 ; Amati *et al*, 2008). Ainsi, deux études réalisées sur des cohortes importantes ont montré que les taux de SMRPs contenues dans les liquides pleuraux sont plus élevés que ceux des sérums, ce qui explique que des analyses réalisées sur ce type de prélèvements soient plus sensibles pour détecter un MPM (Scherpereel *et al*, 2006 ; Creaney *et al*, 2007). En revanche, doser les SMRPs ne présenterait aucun intérêt pronostique (Creaney *et al*, 2007). Ces résultats ne sont valables que pour les mésothéliomes épithélioïdes car les prélèvements issus de patients atteints de mésothéliome de type sarcomatoïde ne contiennent pas ou très peu de SMRP (Robinson *et*

*al*, 2003 ; Scherpereel *et al*, 2006). Malgré tout, les SMRP représentent actuellement le marqueur le plus intéressant dans le diagnostic et éventuellement le suivi des patients du MPM.

La question des mécanismes responsables du relargage de ces formes solubles a été soulevée très rapidement. Deux hypothèses ont été proposées : la synthèse d'une protéine incapable de s'ancrer à la membrane cellulaire suite à un défaut d'épissage (Hellstrom *et al*, 1999) ou bien le relargage de formes membranaires suite à l'intervention de protéases (Hassan *et al*, 2004).

#### **I.4.3.b. L'ostéopontine**

Cette protéine a été récemment suggérée comme pouvant être utile dans le suivi de patients exposés à l'amiante (Pass *et al*, 2005). En effet, dans cette étude, les taux d'ostéopontine sériques étaient plus élevés chez les patients atteints de MPM que chez les patients exposés à l'asbestose ; ce qui a été par ailleurs confirmé par Grigoriu *et al* (2007). Cependant, l'ostéopontine est décrite dans de nombreux autres types de cancers, comme les cancers de l'ovaire, du poumon, du sein, etc. (Fedarko *et al*, 2001 ; Rittling *et al*, 2004). Elle n'est donc a priori pas spécifique du MPM. Le dosage de l'ostéopontine semble par conséquent peu pertinent dans le cadre du diagnostic différentiel du MPM.

#### **I.4.3.c. Le CA125**

Cette protéine transmembranaire de grande taille, appartenant à la famille des mucines, est exprimée à la surface des cellules des trompes de Fallope, de l'endomètre et des cellules mésothéliales (Kabawat *et al*, 1983). Son intérêt diagnostique et pronostique qui avait été évoqué par Hedman *et al* (2003) a été écarté par une étude portant sur une cohorte constituée de plus de 200 patients (dont 117 atteints de MPM, 33 exposés à l'amiante mais n'ayant développé aucune pathologie au moment de l'étude et 83 souffrant de pathologies bénignes ou non liées à l'asbestose) qui a démontré que ce marqueur ne présentait que peu d'intérêt dans le diagnostic du MPM du fait de sa trop faible sensibilité (Creaney *et al*, 2007).

#### **I.4.3.d. Les formes solubles de RCAS1**

Une étude réalisée sur 38 patients atteints de MPM a montré que la plupart des cellules de mésothéliome exprimaient RCAS1 et qu'une forme soluble de cette protéine était détectée dans les liquides pleuraux de patients atteints de MPM (Hiraki *et al*, 2005). Cette protéine est aussi détectée dans des liquides pleuraux de patients atteints de cancers du poumon à une concentration significativement plus élevée. D'autres études sur ce marqueur sont nécessaires afin de préciser et valider son utilité en clinique dans le cadre du MPM.

#### **I.4.3.e. Le MPF**

Pour l'instant, la seule étude réalisée sur ce marqueur a montré que dans 91% des cas, les taux sériques de MPF des patients atteints de mésothéliome étaient plus élevés que ceux des patients sains (Onda *et al*, 2005). De plus, ce taux diminuait après une chirurgie, suggérant un intérêt potentiel de ce marqueur dans le suivi des patients suite à un traitement (Onda *et al*, 2005) mais d'autres études sont nécessaires pour le confirmer.

#### **I.4.3.f. Autres marqueurs en cours de développement**

Une étude a récemment montré que les dosages sériques de facteurs impliqués dans l'angiogénèse, telles que VEGF $\beta$ , HGF ou FGF ainsi que de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG), un indicateur des dommages subis par l'ADN suite à l'action de radicaux oxygénés, permettaient d'évaluer le risque de développement d'un mésothéliome chez des patients exposés à l'amiante (Amati *et al*, 2008). Ces résultats nécessitent encore d'être validés à une plus grande échelle avant de pouvoir être utilisés en routine.

### **I. 5. Modalités thérapeutiques**

Le pronostic du MPM est extrêmement sombre car, sans traitement, la survie est en général inférieure à 12 mois (Edwards *et al*, 2000). A l'heure actuelle, les modalités thérapeutiques classiques représentées par la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie ne sont pas réellement satisfaisantes. Devant l'absence de moyens efficaces contre le MPM, il est impératif de mettre au point de nouveaux traitements.

#### **I.5.1. La chirurgie**

Différents protocoles de chirurgie sont disponibles, certains plus invasifs que d'autres. Ils sont généralement utilisés à des fins palliatives (réduction de la masse tumorale et des signes cliniques) plutôt que curatives. Une pleurectomie (exérèse complète de plèvre) ne peut être envisagée qu'en cas de stade précoce de développement de MPM (Scherpereel *et al*, 2007). Il a été rapporté que la réduction chirurgicale par pleuro-pneumectomie extrapleurale (exérèse « en bloc » de la coupole diaphragmatique, du péricarde, de la plèvre et du poumon touchés par le processus tumoral) apportait un bénéfice aux patients traités (Sugarbaker *et al*, 1999). Cependant, d'autres équipes n'ont pu confirmer ces résultats (Maziak *et al*, 2005). Plus d'études seraient donc nécessaires afin de conclure sur le bénéfice apporté. Le taux de mortalité lié

à l'intervention chirurgicale n'est pas négligeable et a pour conséquence de limiter le nombre de candidats potentiels ainsi que le nombre de centres capables de proposer cette thérapie. Enfin, il est admis qu'un tel traitement doit s'accompagner d'une thérapie adjuvante ayant pour but de détruire les cellules tumorales résiduelles.

### **1.5.2. La chimiothérapie**

Dans de nombreux essais, l'emploi simultané de plusieurs drogues donne de meilleurs résultats que lors de l'utilisation d'une seule (Steele *et al*, 2005). Pour le moment, le seul traitement recommandé en France est l'association de pemetrexed et de cisplatine (Scherpereel *et al*, 2006). La cisplatine (Cisplatine<sup>®</sup>) est une drogue utilisée depuis presque 30 ans en thérapie anti-cancéreuse. Elle se lie à l'ADN nucléaire et interfère ainsi avec les mécanismes de transcription et de réplication de l'ADN. L'activité toxique de la cisplatine s'exercerait également via des interactions avec d'autres cibles, comme des protéines cytoplasmiques. Le pemetrexed (Alimta<sup>®</sup>) appartient à la famille des anti-folates. Il inhibe des enzymes impliquées dans la synthèse des groupements purine et pyrimidine. Les cellules du mésothéliome pourraient être particulièrement sensibles à cette molécule puisqu'elles expriment toutes, quelle que soit leur nature histologique, un récepteur de haute affinité aux alpha-folates (Wang *et al*, 2002). L'association de ces deux drogues a été étudiée naguère dans le cadre du MPM au cours notamment d'un essai de phase III réalisé avec 448 patients (Vogelzang *et al*, 2003).

Avec des taux de réponses avoisinant les 40% et une médiane de survie de 12,1 mois, l'association pemetrexed – cisplatine s'est révélée plus efficace que la cisplatine utilisée seule (taux de réponse de 17% et 9,3 mois de médiane de survie.) (Vogelzang *et al*, 2003). Une étude plus récente réalisée sur plus de 1000 patients a en partie confirmé ces résultats avec une médiane de survie de 11 mois environ mais des taux de réponses inférieurs (de l'ordre de 20%) (Obasaju *et al*, 2007). L'emploi d'un autre anti-folate, le raltitrexed, combiné à la cisplatine a démontré une efficacité à peu près équivalente en terme d'allongement de médiane de survie au cours d'un autre essai clinique de phase III (Van Meerbeeck *et al*, 2004). Ainsi, l'association cisplatine et anti-folates, et plus particulièrement le pemetrexed, semble intéressante dans le cadre du MPM. Cependant les effets secondaires sont importants puisque la toxicité de cette association est de grade 3/4. Les plus fréquents sont les affections hématologiques (neutropénie, granulocytopenie), gastro-intestinales, du système nerveux (neuropathie sensorielle), du rein et des voies urinaires.

D'autres associations sont en cours d'étude, par exemple, les associations gemcitabine – cisplatine (Byrne *et al*, 1999 ; Van haerst *et al*, 2002 ; Nowak *et al*, 2002 ; Kalmadi *et al*, 2007 ; Utkan *et al*, 2006 ; Castageto *et al*, 2003), oxaliplatine et raltitrexed (Fizazi *et al*, 2003) ou encore oxaliplatine et gemcitabine (Schutte *et al*, 2003), mais leur emploi n'est pas encore validé pour le traitement du MPM (Steele *et al*, 2006 ; Garcia-Carbonero *et al*, 2006). Seule l'association cisplatine – pemetrexed est recommandée en première intention. L'administration simultanée de dexaméthasone, d'acide folique et de vitamine B12 réduirait les effets secondaires et la toxicité liés à ce protocole de chimiothérapie (Vogelzang *et al*, 2003). La limite de la chimiothérapie apparaît donc puisque ce protocole, qui est le meilleur dont on dispose actuellement, ne permet qu'un allongement limité de la durée de survie des patients et moins de la moitié d'entre eux répondent partiellement à ce traitement. De plus, en cas d'absence de réponse, aucun autre protocole de chimiothérapie ne peut être préconisé.

### ***1.5.3. La radiothérapie***

Les résultats obtenus par l'emploi de la radiothérapie se sont révélés décevants et cette alternative ne peut être utilisée qu'à des fins palliatives (Waite *et al*, 2007) afin de diminuer la douleur ressentie par les patients souffrant d'un MPM. La radiothérapie ne peut être utilisée seule dans le traitement des patients atteints de ce cancer du fait de la nature diffuse de la tumeur et de l'importance des doses à utiliser : des effets secondaires importants, allant jusqu'à des complications parfois fatales, ont été décrits suite à un tel traitement.

## **II. L'immunité anti-tumorale**

### **II.1. Emergence d'une théorie : de l'immunosurveillance à l'immunoédition**

Paul Ehrlich fut le premier à envisager que le système immunitaire pouvait réprimer le développement de cancers (Ehrlich *et al*, 1909). Toutefois, l'hypothèse initialement formulée par Ehrlich nécessitait le développement de l'immunologie fondamentale et l'idée que le système immunitaire puisse exercer un contrôle sur le développement tumoral n'a pas été réellement poursuivie jusqu'à la moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Le concept de surveillance immunitaire fut repris par Sir Mac Farlane Burnet en 1957 (Burnet *et al*, 1957). Au même moment, Lewis Thomas suggéra qu'une des fonctions principales de l'immunité cellulaire était de maintenir l'homéostasie des organismes multicellulaires complexes en les protégeant des éventuels développements de maladies néoplasiques (Thomas *et al*, 1959). L'ensemble de

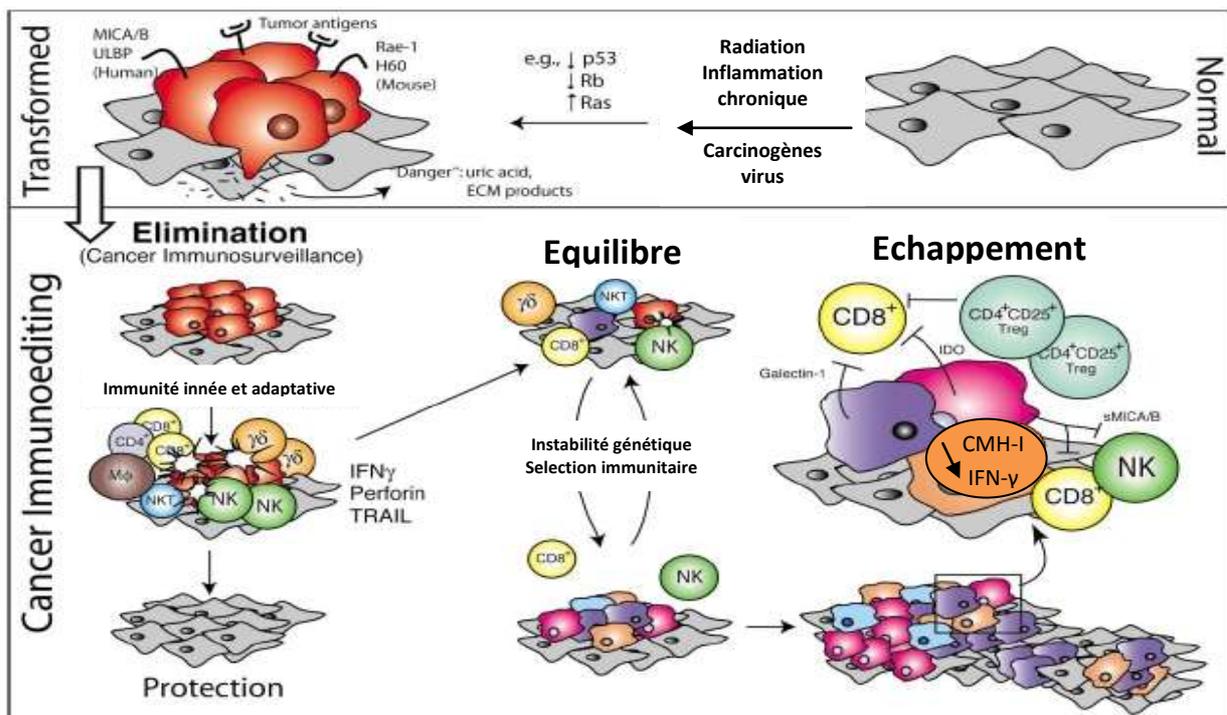
ces idées a finalement abouti à la théorie selon laquelle les lymphocytes pouvaient agir telles des sentinelles dans la reconnaissance et l'élimination des cellules transformées de l'organisme (Burnet *et al*, 1970).

Cette théorie a cependant fait l'objet de nombreuses critiques, notamment à cause de données expérimentales démontrant que des souris *nude*, bien que défaillantes sur le plan immunitaire, ne présentaient pas une incidence plus élevée de tumeurs que des souris normales. Ce n'est que plus tard que les défauts de ce modèle et des études réalisées ont été identifiés. En particulier, les souris *nude* se sont avérées ne pas être totalement dépourvues de lymphocytes T. En outre, elles possèdent des composants de l'immunité innée capables de compenser, dans une certaine mesure, leur déficit immunitaire. Finalement, plusieurs preuves ont permis d'établir le fait que plusieurs types cellulaires et molécules effectrices du système immunitaire jouaient un rôle dans le contrôle du développement tumoral chez l'animal : des souris déficientes en composants essentiels du système immunitaire inné ou acquis sont plus sensibles au développement de tumeurs spontanées ou induites (Dunn *et al*, 2004). Des expériences similaires réalisées à l'aide d'anticorps afin d'éliminer les populations de cellules NK ou NKT, et de neutraliser les molécules TRAIL (Takeda *et al*, 2002) ou le NKG2D exprimés par ces cellules (Raulet *et al*, 2003) ont confirmé ces résultats. Enfin, l'activation de certains composants du système immunitaire comme les cellules NK ou NKT (Smyth *et al*, 2005) ou une sous-population de cellules dendritiques particulières produisant de l'IFN $\gamma$  (Taieb *et al*, 2006) ont abouti à réduire le développement de tumeurs dans des modèles murins.

Chez l'homme, plusieurs observations cliniques permettent de confirmer un rôle actif de la surveillance immunitaire contre les tumeurs. Par exemple, des patients transplantés et sous traitement immunosuppresseur présentent une fréquence plus importante de cancers par rapport à la population générale (Euvrard *et al*, 2003 ; Hollenbeak *et al*, 2005). De plus, une infiltration lymphocytaire peut être associée à une meilleure survie des patients atteints de cancer. La présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) au sein de certains types de tumeurs, tels que les mélanomes (Clark *et al*, 1989 ; Clemente *et al*, 1996), les cancers pulmonaires (Villegas *et al*, 2002), ovariens (Zhang *et al*, 2003), ou encore les tumeurs du tractus gastro-intestinal (Ishigami *et al*, 2000 ; Schumacher *et al*, 2001), a en effet été associée à une survie plus élevée des patients. Malgré l'existence de ce processus d'immunosurveillance, des cancers peuvent se développer chez des individus immunocompétents. Plusieurs travaux réalisés sur divers modèles murins ont démontré que des tumeurs qui se développent chez des hôtes sans pression

du système immunitaire sont globalement plus immunogènes que des tumeurs issues d'hôtes immunocompétents (Smyth *et al*, 2000 ; Shankaran *et al*, 2001 ; Street *et al*, 2002 ; Dunn *et al*, 2005). Ainsi, bien que le système immunitaire soit dans certains cas capable de lutter contre le développement tumoral, il semble aussi être à l'origine de la sélection de tumeurs moins immunogènes.

L'équipe de Schreiber a récemment proposé un concept, l'immunoédition, qui tient compte du fait que l'immunosurveillance ne constitue qu'une partie des relations entre le système immunitaire et les cancers (Dunn *et al*, 2002 ; Dunn *et al*, 2004). L'immunoédition est décrite comme étant la résultante de trois processus: élimination, équilibre et échappement (Fig. 5). L'immunosurveillance proprement dite correspond à la phase d'élimination. La sélection des variant tumoraux se passe pendant la phase dite d'équilibre. Ceci pouvant conduire à l'échappement, et par conséquent, à l'apparition clinique de tumeurs.



**Figure 5 : Les trois phases de l'immunoédition.**

Sous l'influence de divers facteurs, des cellules cancéreuses peuvent apparaître dans l'organisme. La phase d'élimination correspond à l'immunosurveillance, pendant laquelle le système immunitaire reconnaît et lutte contre ces cellules. L'équilibre est le processus au cours duquel des variants tumoraux, résistants au système immunitaire, sont sélectionnés (immunosélection). Au cours de la phase d'échappement, la croissance tumorale n'est plus maîtrisée par le système immunitaire. (Dunn *et al*, 2004)

## II.2. Les effecteurs de la surveillance immunitaire anti-tumorale

Les données disponibles dans la littérature ont permis d'établir que de nombreux types de cellules ou de molécules effectrices, appartenant aussi bien au versant inné qu'acquis de l'immunité, étaient impliquées dans l'immunosurveillance des cancers.

### II.2.1. Les lymphocytes T cytotoxiques

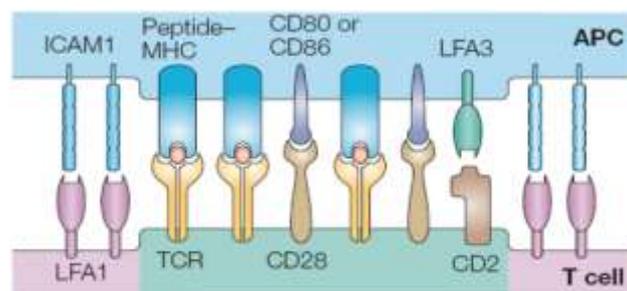
La partie adaptative du système immunitaire est constituée d'une branche cellulaire, médiée par les lymphocytes T, et d'une branche humorale, qui fait intervenir les lymphocytes B. Les lymphocytes T subissent une étape de maturation dans le thymus : seuls les lymphocytes T capables de reconnaître les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité, aussi appelé HLA chez l'homme) du soi sont sélectionnés (sélection positive). Les lymphocytes T présentant une haute affinité pour un peptide du soi associé aux molécules du CMH sont quant à eux éliminés (sélection négative). A l'issue de cette maturation, les lymphocytes T entrent dans la circulation et gagnent les organes lymphoïdes secondaires. Ils ne sont pas encore capables de lyser les cellules cibles: pour cela, ils doivent d'abord être activés par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

#### II. 2.1. a. Activation des lymphocytes T CD8, synapse immunologique et signaux d'activation

Le contact entre cellules dendritiques et lymphocytes T conduit à une polarisation du cytosquelette d'actine et des microtubules des cellules en contact et aboutit à la concentration de molécules de présentation, de co-stimulation et d'adhérence au sein d'une synapse immunologique (Fig. 6). La synapse immunologique s'organise en régions concentriques. La partie centrale appelée cSMAC comprend principalement le TCR, interagissant avec les complexes pCMH et les molécules de costimulation. A la périphérie se trouve la région pSMAC composée des molécules d'adhérences, notamment ICAM et LFA1 (Friedl *et al*, 2005).

**Figure 6 : Synapse immunologique.**

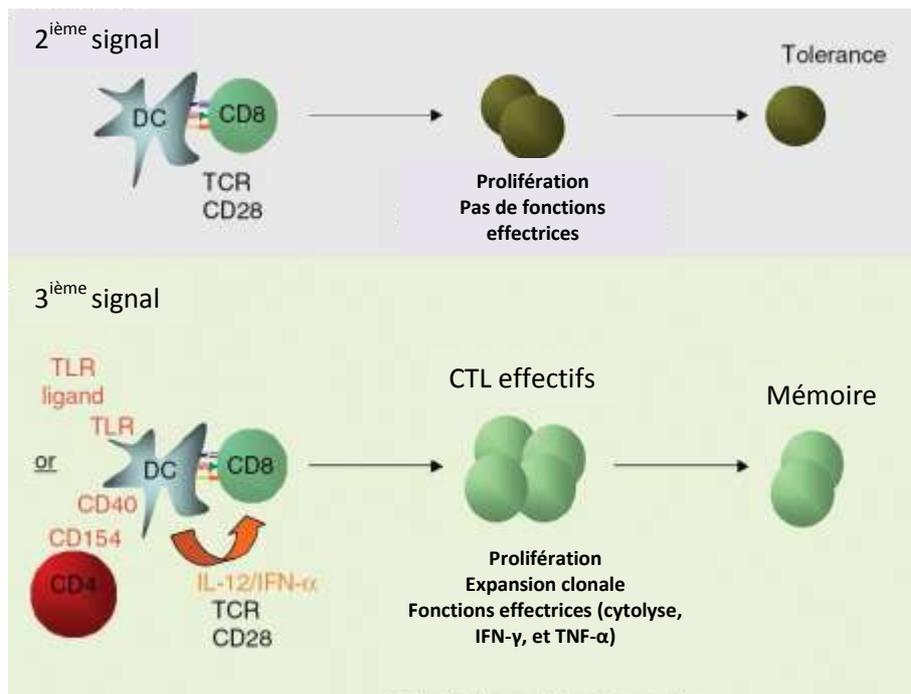
Les molécules d'adhérences sont situées à la périphérie tandis que les TCR et les molécules de costimulation sont concentrées au centre. D'après Friedl *et al*, 2005.



Le TCR des lymphocytes T CD8 peut reconnaître un complexe formé par un peptide de 8 à 10 acides aminés en association avec une molécule de CMH de classe I (Germain *et al*, 1994). Il s'agit du premier signal de stimulation. A lui seul, l'engagement du TCR est insuffisant pour activer une cellule T naïve. Pour induire son expansion clonale et sa différenciation en cellules effectrices efficaces, des signaux de costimulation doivent être délivrés simultanément à la présentation de l'antigène par la CPA (Mescher *et al*, 2006). Quand le TCR d'une cellule T naïve se fixe à un complexe pCMH présent à la surface d'une cellule qui n'exprime pas de signaux de costimulation, la cellule T perd alors sa capacité de réponse immunologique et entre dans un état qualifié d'anergie. Une cellule T dans cet état ne peut alors plus être activée, même si l'antigène vient à lui être présenté par la suite par des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.

Le deuxième signal de costimulation des CTLs consiste en l'interaction entre des molécules exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et leurs ligands exprimés par les lymphocytes T CD8. C'est le cas par exemple de la liaison entre des molécules de la famille B7 (CD80 ou CD86), exprimées par la CPA, au CD28, exprimé par la cellule T (Fig. 7, page 33) (Andersen *et al*, 2006 ; Mescher *et al*, 2006). Une étude réalisée sur des cellules humaines a cependant montré que des CPA exprimant des niveaux élevés d'antigènes et de molécules de costimulation de la famille de B7 n'étaient pas pour autant capables d'induire des CTLs efficaces (Albert *et al*, 2001). D'autres signaux doivent être apportés par les CPA et/ou les lymphocytes T CD4 pour éviter l'induction d'un état de tolérance (Fig. 7, page 33) (Mescher *et al*, 2006). Parmi les mécanismes impliqués dans ce troisième signal, des interactions entre molécules appartenant à la famille TNF/ TNFR sont impliquées (Croft *et al*, 2003 ; O'Neill *et al*, 2004 ; Watts *et al*, 2005). Les molécules CD28 et HVEM, présentes sur les lymphocytes T naïfs, seraient les premières à intervenir dans l'interaction avec les cellules dendritiques (Croft *et al*, 2003). L'expansion clonale nécessiterait ensuite des interactions via les protéines CD28 et CD27 et ultérieurement, l'expression des molécules 4-1BB et OX40 procurerait des signaux de survie aux lymphocytes T.

Le troisième signal fait aussi intervenir des communications entre cellules par le biais de la sécrétion de cytokines. En effet, une équipe a démontré que l'IL-12 (Curtsinger *et al*, 1999) ainsi que les IFN de type I (Curtsinger *et al*, 2005) sont des cytokines nécessaires à la différenciation et à l'amplification clonale des CTLs (Fig. 7, page 33).



**Figure 7 : Signaux de costimulation et activation des LT CD8.**

Trois signaux d'activation sont nécessaires afin d'induire la génération de CTLs efficaces à partir de lymphocytes T CD8 naïfs. La stimulation du CD8 via le TCR et le CD28 induit une prolifération des cellules mais pas l'acquisition des fonctions effectrices. A long terme, les cellules se révèlent être tolérantes. Le troisième signal, qui peut être apporté par l'IL-12 ou des IFN de type I produits par la cellule dendritique, est nécessaire à l'expansion clonale ainsi qu'à la différenciation des CTLs. (Mescher *et al*, 2006)

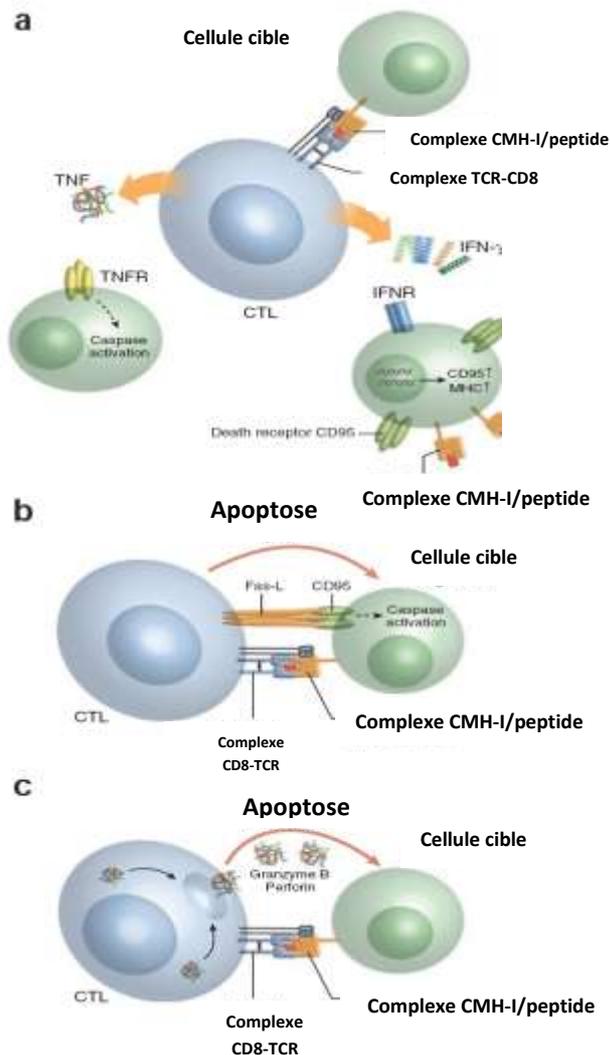
### ***1. 2.1. b. Mécanismes d'action des CTLs***

La présentation de l'antigène et les signaux de costimulation déclenchent l'expression de l'IL-2 et de son récepteur de haute affinité par les cellules T CD8. L'IL-2 a pour effet d'induire l'expansion clonale de la cellule T naïve puis la différenciation d'une partie de sa descendance en cellules effectrices, capables de synthétiser les protéines requises pour leur fonction spécialisée de cellules T cytotoxiques. Lorsqu'un CTL reconnaît l'antigène pour lequel il est spécifique à la surface d'une cellule cible, il n'a plus besoin de recevoir de signaux de costimulation pour remplir son rôle.

Les cellules effectrices migrent de l'organe lymphoïde où elles ont reçu les signaux de stimulation vers les tissus périphériques. La migration peut se faire grâce à un ensemble de molécules d'adhésion, exprimés à la surface du lymphocyte T, qui reconnaissent un ensemble de molécules complémentaires situées sur des cellules avec lesquelles les lymphocytes T entrent en interaction. Les principales classes de molécules d'adhésion sont les sélectines, les intégrines, certains membres de la famille des immunoglobulines (CD2) et certaines molécules semblables à la mucine. Certaines de ses molécules sont plus importantes pour la migration

des lymphocytes T alors que d'autres interviennent dans l'interactions avec leurs cibles cellulaires.(Janeway & Travers, 1997).

Les CTLs sont capables de détruire les cellules cibles par trois mécanismes (Andersen *et al*, 2006). Le premier d'entre eux est médié par des cytokines, comme l'IFN $\gamma$  et le TNF, qui sont produites et sécrétées tant que la stimulation via le TCR est maintenue (Fig. 8a). Ces cytokines affectent à la fois la cellule en contact avec le CTL mais aussi les cellules situées à distance. Le TNF se fixe sur son récepteur situé sur la cellule cible et induit son entrée en apoptose. L'IFN $\gamma$ , quant à lui, est à l'origine de l'augmentation de la présentation de peptides endogènes par les molécules de CMH de classe I et de la synthèse de Fas (CD95) par les cellules cibles. En outre, il exerce une action anti-proliférative sur les cellules tumorales, effet qui a été décrit dans certaines lignées cellulaires humaines de MPM (Buard *et al*, 1998), il inhibe l'angiogénèse, ce qui limite la croissance tumorale (Ikeda *et al*, 2002), et enfin, il agit sur d'autres effecteurs de la réponse immunitaire.



**Figure 8: Mécanismes d'action des Lymphocytes T cytotoxiques.**

(a) Relargage de TNF et d'IFN $\gamma$ , cytokines qui induisent l'entrée en apoptose des cellules cibles, par les CTLs.

(b) Induction de l'apoptose des cellules cibles de manière directe, via l'interaction Fas-L / CD95.

(c) Lyse directe par relargage de perforines et de granzyme B dans l'espace intercellulaire entre la cellule cible et le CTL. D'après Andersen *et al*, 2006.

Les deux autres mécanismes agissent par contact direct. Le premier implique le ligand de Fas (Fas-L), exprimé à la surface des CTLs. Il se lie à son récepteur (Fas ou CD95) situé à la surface de la cellule cible (Fig. 8b, page 34) et induit le recrutement de molécules adaptatrices qui aboutit à l'activation de la caspase 8 et à l'induction de l'apoptose de la cellule cible (Krammer *et al*, 2000). Dans le second cas, le CTL relargue des protéines (perforines et granzymes) dans l'espace intercellulaire (Fig. 8c, page 34). Le mécanisme d'action du système perforines / granzymes repose lui aussi sur l'induction de la cascade apoptotique via l'activation de la caspase 10 (Talanian *et al*, 1997). Les perforines et granzymes sont pré-synthétisées par les CTLs, stockées dans des lysosomes et relarguées très rapidement dès que la rencontre entre un CTL et une cellule cible a lieu. Le contenu des lysosomes n'est pas relargué au hasard mais en un point précis. Ainsi, ces protéines cytotoxiques sont concentrées au niveau de la surface de la cellule cible, ce qui améliore leur efficacité et limite leur diffusion dans le milieu environnant, protégeant ainsi les autres cellules de leur action cytotoxique.

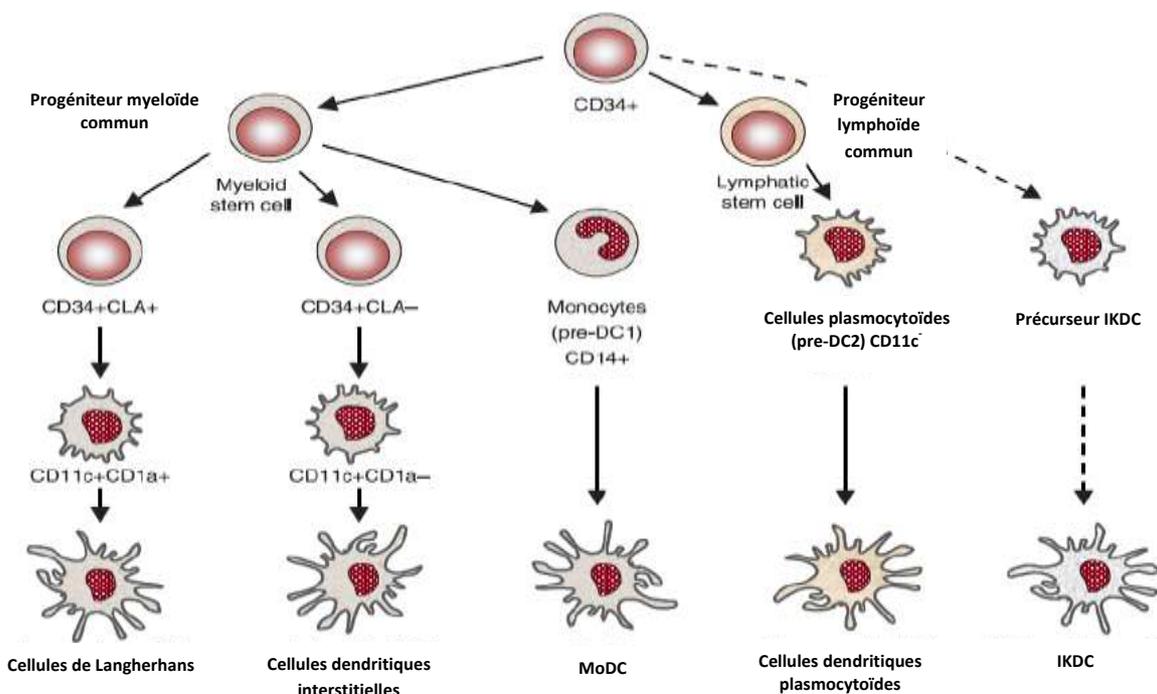
## **II. 2. 2. Les cellules dendritiques**

Parmi les trois types de cellules présentatrices d'antigènes décrits (macrophages, lymphocytes B et cellules dendritiques), seules les cellules dendritiques sont spécialisées dans la fonction de présentation et sont capables de stimuler des lymphocytes T naïfs. C'est pourquoi elles ont été qualifiées de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Comme nous allons le voir, les cellules dendritiques sont caractérisées par une extrême plasticité phénotypique et fonctionnelle, ce qui leur permet d'intervenir aussi bien dans le développement de réponses immunitaires acquises comme innées, ainsi que dans l'induction de la tolérance (Banchereau *et al*, 2000 ; Steinman *et al*, 2003 ; Sousa *et al*, 2006).

### **II.2.2.a. Les différentes populations de cellules dendritiques**

Différents types de cellules dendritiques ont été décrits depuis la découverte des cellules de Langherhans en 1868, et le terme cellules dendritiques regroupe aujourd'hui plusieurs populations cellulaires issues de voies d'ontogenèse distinctes (Fig. 9, page 36) (Schott *et al*, 2006). La voie myéloïde donne naissance, sous l'influence du *Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) et du  $TNF\alpha$ , aux cellules dendritiques dites conventionnelles ou myéloïdes: les cellules de Langherhans, situées au niveau des épithéliums stratifiés, et les cellules dendritiques interstitielles, situées dans les autres tissus. Ces deux populations expriment de nombreux marqueurs en commun, dont la molécule CD11c, mais diffèrent quant à l'expression d'autres marqueurs comme le CD1a (Caux *et al*, 1996). Les MoDC, apparentées aux cellules dendritiques myéloïdes et plus particulièrement à la population

des cellules dendritiques interstitielles, sont quant à elles dérivées de monocytes *in vitro*. Bien que les contributions relatives de ces sous-populations de cellules dendritiques au cours de la réponse immunitaire anti-tumorale ne soient pas clairement établies, leurs capacités à capturer puis présenter les antigènes aux cellules effectrices de l'immunité en font des acteurs centraux dans l'établissement d'une telle réponse (Banchereau *et al*, 2000). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont issues de la voie lymphoïde et leur localisation est généralement restreinte aux tissus lymphatiques et au sang périphérique. La principale caractéristique de ces cellules est qu'elles sont capables de produire d'importantes quantités d'IFN de type I suite à une infection virale (Siegal *et al*, 1999 ; Cella *et al*, 1999). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes ont été considérées comme étant impliquées quasi-exclusivement dans la réponse antivirale (Barchet *et al*, 2005 ; Liu *et al*, 2005). Cependant, une équipe a récemment démontré chez la souris que cette population de cellules dendritiques plasmacytoïdes était capable d'induire l'expansion de CTLs spécifiques d'antigènes *in vivo*, le rejet de tumeurs et d'agir en synergie avec les cellules dendritiques myéloïdes (Lou *et al*, 2007). Une autre population de cellules dendritiques a été identifiée récemment chez la souris : il s'agit des IKDC, ce sont des cellules dendritiques produisant de l'interféron et pouvant tuer les cellules cancéreuses par apoptose. (Chan *et al*, 2006 ; Taieb *et al*, 2006). Elles semblent jouer un rôle dans le cadre de l'immunité anti-tumorale mais celui-ci reste encore à préciser, notamment chez l'homme. Leur origine ontogénique n'est pas encore identifiée.



**Figure 9: Voies d'ontogénèse des cellules dendritiques.**  
(Schott *et al*, 2006)

Toutes ces populations mettent en évidence la diversité des cellules dendritiques rencontrées chez l'homme. L'existence de sous-populations complémentaires n'est pas exclue. En outre, bien qu'on commence à entrevoir certaines inter-relations existant entre différentes sous-populations de cellules dendritiques celles-ci restent encore largement méconnues.

### **II.2.2.b. Capacités de migration des cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques sont des sentinelles disséminées dans tout l'organisme. Le fait qu'elles soient capables de se déplacer leur permet de se diriger vers les tissus périphériques où elles internalisent des antigènes puis de transporter ces antigènes jusqu'aux lymphocytes situées dans les ganglions périphériques. Les cellules tumorales sécrètent des molécules dans leur environnement (Rollins *et al*, 2006). Or, les cellules dendritiques sont attirées par ces molécules au niveau du site tumoral. Par exemple, le CCL20 attire des cellules de Langherhans grâce à une interaction avec le récepteur de chimiokine 6 (CCR6) qu'elles expriment (Dieu-Nosjean *et al*, 2000). Arrivées sur le site tumoral, les cellules dendritiques peuvent prélever des antigènes. Les signaux qu'elles reçoivent dans cet environnement (voir plus loin) induiraient entre autre des modifications du profil de CCR qu'elles expriment, ce qui leur permettrait d'atteindre les ganglions lymphatiques (Dieu *et al* 1998 ; Sallusto *et al*, 1998 ; Sozzani *et al*, 1998). Les différentes sous-populations de cellules dendritiques ne possèdent pas les mêmes capacités de réponse vis-à-vis de certaines chimiokines car elles n'expriment pas par exemple les mêmes CCR fonctionnels (Penna *et al*, 2001). D'autres types de récepteurs, comme les CLR (Figdor *et al*, 2002), ou la capacité à sécréter des MMP (Ratzinger *et al*, 2002) sont aussi impliqués dans la migration des cellules dendritiques.

La migration des cellules dendritiques des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires se ferait principalement par les vaisseaux lymphatiques mais les mécanismes par lesquels les cellules dendritiques entrent dans ces vaisseaux puis migrent jusqu'aux ganglions sont loin d'être totalement élucidés (Randolph *et al*, 2005). De la même manière que dans l'attraction des cellules dendritiques vers les sites inflammatoires, les capacités des cellules dendritiques à retourner dans les ganglions lymphatiques reposent sur l'expression de molécules qui varient d'une sous-population de cellules dendritiques à l'autre. Par exemple, on a démontré que le CCR7 (Martin-Fontecha *et al*, 2003) était nécessaire à la migration des cellules dendritiques interstitielles et des cellules de Langherhans. En revanche, une autre étude a montré que si le CCR7 intervient effectivement dans les capacités de migration des MoDC, c'est en réalité le CCR8 qui a un rôle prépondérant pour cette population de cellules dendritiques (Qu *et al*, 2004).

### **II.2.2.c. Capture des antigènes et intégration des signaux environnementaux**

La nature du matériel antigénique prélevé par les cellules dendritiques est variée et comprend : des micro-organismes (virus et bactéries), des particules opsonisées, des protéines ou encore des cellules vivantes ou mortes. La capacité d'internalisation des cellules dendritiques repose sur les mécanismes d'endocytose, de phagocytose et de pinocytose qui se distinguent par les récepteurs utilisés, les mécanismes cellulaires mis en jeu, ainsi que par la nature du matériel internalisé. Les récepteurs intervenant dans la capture des antigènes assurent la reconnaissance des structures antigéniques, le recrutement des éléments du cytosquelette pour réaliser l'internalisation et la transduction de signaux en vue de moduler l'activité cellulaire.

Parmi ces récepteurs, certains appartiennent à la famille des lectines comme le DC-SIGN (CD209), le CD205, le MMR (CD206) (Geijtenbeek *et al*, 2004); des récepteur scavenger comme le CD36 (Peiser *et al*, 2002); ou encore des intégrines (CD11b, CD18). Les particules pathogènes opsonisées peuvent aussi être internalisées par des récepteurs au complément (Bajtaj *et al*, 2006). Ces récepteurs interviennent non seulement dans l'internalisation de pathogènes mais aussi dans celle de matériel du soi, comme des composants de cellules tumorales. Par exemple, les lectines permettent aux cellules dendritiques de reconnaître des motifs de glycosylation présents sur des structures antigéniques comme les glycoprotéines d'origine tumorale. Elles permettent leur internalisation (Figdor *et al*, 2002 ; Aarnoudse *et al*, 2006) et transmettent des signaux qui dépendent du récepteur impliqué (et plus particulièrement de son domaine intracellulaire) (Mahnke *et al*, 2003). Les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  et certains récepteurs du complément sont capables de reconnaître des composants spécifiques des cellules apoptotiques (Albert *et al*, 1998 ; Morelli *et al*, 2003 ; Nauta *et al*, 2004). Les récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines permettent quant à eux l'internalisation de complexes immuns et interviennent au niveau des mécanismes d'apprêtement de ces antigènes, en particulier sur le phénomène de présentation croisée (Dhodapkar *et al*, 2002 ; Cioca *et al*, 2006).

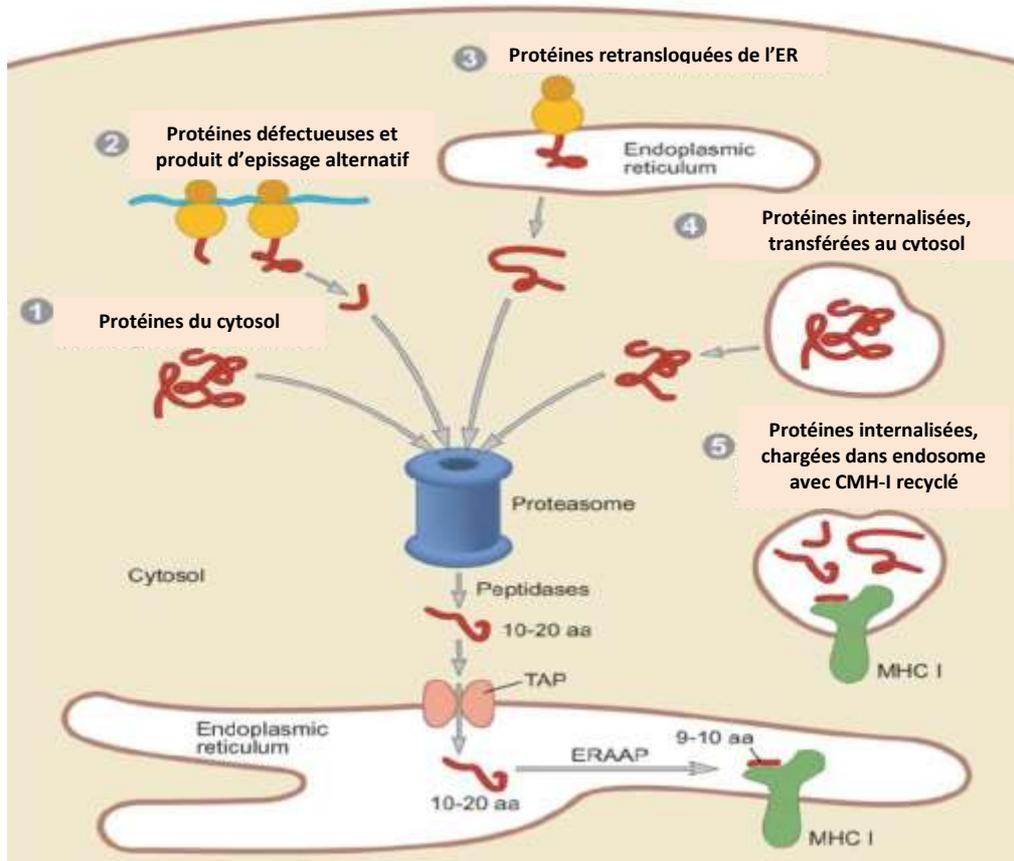
Tous ces exemples montrent à quel point la diversité des récepteurs exprimés à la surface des cellules dendritiques est importante. En outre, les différentes sous-populations de cellules dendritiques expriment des batteries de récepteurs qui sont différents. Toutes les cellules dendritiques ne présentent donc pas des capacités de capture antigénique équivalente dans la mesure où elles n'ont pas la même affinité pour les antigènes.

### **II.2.2.d. Apprêtement et présentation des antigènes internalisés**

Les cellules dendritiques présentent des antigènes peptidiques par les voies classiques des molécules de CMH de classe I et II mais effectuent aussi l'apprêtement de peptides exogènes

pour une présentation sur les molécules du CMH-I, c'est la présentation croisée. Les antigènes lipidiques sont présentés en association avec des molécules CD1.

Dans les voies classiques de présentation, les peptides endogènes sont dégradés par un complexe protéasique constitué de 28 sous-unités : le protéasome. (Janeway *et al*, 1997 ; Trombetta *et al*, 2005) (Fig. 10).



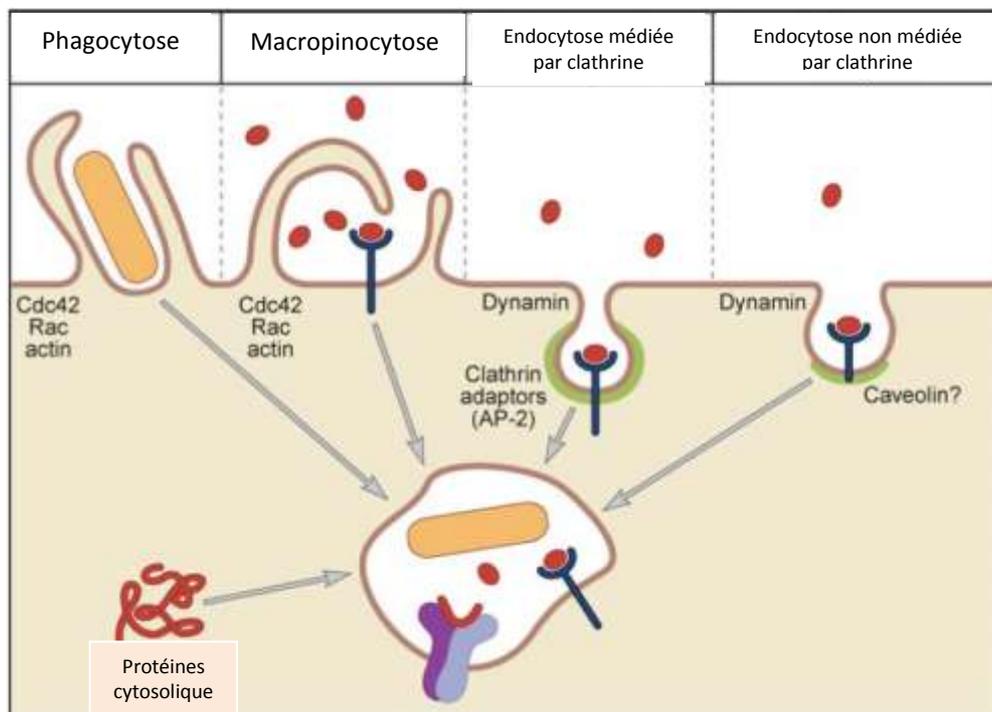
**Figure 10 : Origines possibles des peptides présentés sur les molécules du CMH - I.**

Il peut s'agir (1) de protéines du cytosol, (2) de produits d'épissage alternatif ou de protéines défectueuses, (3) protéines retrotransloquées du réticulum endoplasmique au cytosol. La présentation croisée permet de présenter sur le CMH-I (4) des protéines internalisées transférées au cytosol par une voie dépendant du transporteur TAP ou (5) d'une façon indépendante de TAP, directement dans les vésicules d'endocytose, dans lesquelles les molécules de CMH de classe I seraient recyclées à partir de la membrane plasmique. (Trombetta *et al*, 2005).

Les protéines destinées à être dégradées par le protéasome sont marquées par des multimères constitués de molécules d'ubiquitine (Nandi *et al*, 2006). Les peptides issus de la dégradation du peptide accèdent ensuite au réticulum endoplasmique via le transporteur TAP. Ils sont clivés en peptides de 8 à 10 acides aminés par la protéase ERAAP (*Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing*) puis apprêtés sur les molécules du CMH-I (Serwold *et al*, 2002). Les complexes p-CMH-I exportés à la surface de la cellule sont reconnus par les lymphocytes T CD8. Ce mécanisme est commun à toutes les cellules

de l'organisme qui présentent ainsi à leur surface un échantillon des protéines qu'elles synthétisent (protéines du cytosol, protéines anormales ou encore certaines protéines normalement destinées à être exprimées à la surface de la cellule ou à être exportées rétrotransloquées du reticulum endoplasmique vers le cytosol).

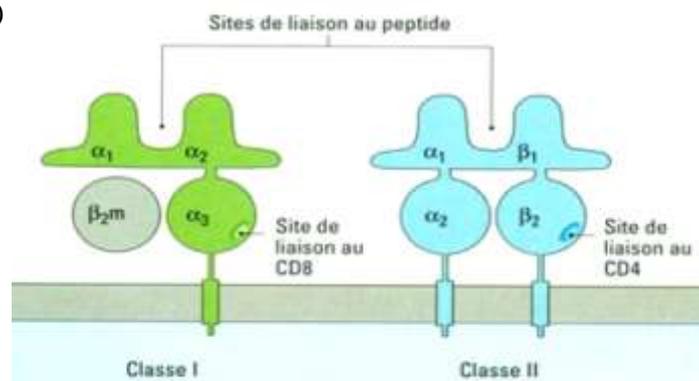
Certaines protéines, notamment les protéines se trouvant dans des vésicules intracellulaires suite à leur internalisation, ne sont pas prises en charge par le protéasome ce qui entraîne l'activation des protéases contenues dans ces vésicules qui s'acidifient progressivement car les protéases qu'elles contiennent ne sont actives qu'à pH bas. Les peptides générés sont pris en charge par les molécules du CMH de classe II (Neijssen *et al*, 2005) (Fig. 11). Néanmoins, certaines protéines endogènes cytosoliques ont aussi accès aux lysosomes et donc au chargement sur les molécules du CMH-II et la dichotomie initialement établie entre la présentation de protéines endogènes par les molécules du CMH-I et la présentation de protéines exogènes par les molécules du CMH-II n'est donc pas valable pour toutes les protéines. Les complexes pCMH-II servent à présenter des épitopes aux lymphocytes T CD4 et, tandis que toutes les cellules de l'organisme présentent des peptides en association avec leur CMH-I, seules les CPA qui interagissent avec des lymphocytes T CD4 possèdent ce mécanisme de présentation par les molécules du CMH-II (Germain *et al*, 1994).



**Figure 11: Origines des peptides présentés par le CMH-II.**

Les antigènes internalisés par les cellules dendritiques pourraient atteindre des compartiments lysosomiaux ou endosomiaux dans lesquels ils seraient pris en charge par des protéases et chargés sur les molécules du CMH-II. D'après Trombetta *et al*, 2005.

Les cellules dendritiques ont une particularité: elles sont capables de présenter des peptides exogènes internalisés par les molécules du CMH-I grâce au processus de présentation croisée (Albert *et al*, 1998). Les différents mécanismes permettant aux antigènes internalisés d'accéder au CMH-I ne sont pas tous identifiés. Les antigènes peuvent être transférés des vésicules d'endocytose vers le cytoplasme des cellules dendritiques (Inaba *et al*, 2005) ou transiter de cellules à cellules (Neijssen *et al*, 2005). Une fois dans le cytoplasme, ils suivent alors la voie classique protéasome / TAP / ER précédemment décrite (Fig. 11). Un autre processus repose sur la fusion des vésicules d'endocytose avec le réticulum endoplasmique (Guermontprez *et al*, 2003 ; Tewari *et al*, 2005), procurant ainsi aux antigènes internalisés toute la machinerie nécessaire pour le chargement sur les molécules de CMH-I. La contribution de cette voie dans le processus de présentation croisée reste controversée (Groothuis *et al*, 2005 ; Touret *et al*, 2005). D'autres modalités sont envisageables mais encore peu explicitées, comme l'échange d'exosomes (vésicules sécrétées par de nombreux types cellulaires dont les cellules tumorales) (Wolfers *et al*, 2001 ; Neijssen *et al*, 2005). Chez l'homme, les molécules du CMH sont dénommées HLA. Les molécules HLA de classe I et II sont constituées de deux sous-unités glycoprotéiques appartenant à la famille des immunoglobulines. Les molécules de classe I du HLA sont formées par l'association d'une chaîne lourde transmembranaire comprenant trois domaines d'immunoglobulines,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ , et d'une sous-unité soluble: la  $\beta_2$ -microglobuline (Fig. 12). Les molécules HLA de classe II sont constituées de deux chaînes transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$  associées de façon non covalente et comprenant chacune deux domaines immunoglobulines ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$ ) (Fig. 12). Les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  des molécules HLA de classe I et les domaines  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  des HLA de classe II forment un sillon dans lequel les peptides se nichent par l'intermédiaire de liaisons non-covalentes avec les acides aminés situés au bord et au fond de ce sillon. Les molécules HLA de classe I se lient avec des peptides de 8 à 10 acides aminés tandis que les molécules HLA de classe II se lient avec des peptides de 12 à 24 acides aminés. (Germain *et al*, 1994)



**Figure 12: Représentation schématique des molécules du CMH de classe I et II.**

Source : <http://www.kb.u-psud.fr/niveau2/enseignements/niveau3/etudmed/cours/immunologie/Figures/chap03-fig07.jpg> (03/07/2008).

Afin de lutter efficacement contre des agents pathogènes ou l'apparition de cellules tumorales, il est essentiel que les molécules du CMH présentent une gamme de peptides variés. Or, les molécules HLA sont extrêmement variables d'un individu à l'autre car elles sont polygéniques, c'est-à-dire qu'il existe plusieurs gènes codant pour les chaînes lourdes des molécules HLA de classe I (HLA-A, -B, -C etc.) ainsi que pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules de classe II (HLA-DP $\alpha$ , -DP $\beta$ , -DQ $\alpha$ , -DQ $\beta$ , -DR $\alpha$ , -DR $\beta$ , etc...). En outre, ces gènes sont pour la plupart polymorphes: plusieurs allèles codent pour les différents sous-types de molécules HLA (HLA-A\*0201, HLA-A\*0205 par exemple). Le principe de fixation du peptide est le même pour toutes les molécules HLA mais chaque sous-type s'associe préférentiellement à une série différente de peptides ayant des motifs communs (Doytchinova *et al*, 2004). Ces acides aminés, qui rentrent dans les poches du sillon des molécules HLA sont ceux qui sont responsables de l'ancrage des peptides (Matsumura *et al*, 1992 ; Parham *et al*, 1992 ; Rammensee *et al*, 1995). Parmi ces acides aminés d'ancrages, certains sont très importants et sont qualifiés de résidus d'ancrage dominants. D'autres ont un rôle plus modeste, ce sont les résidus d'ancrage secondaires et les résidus favorables à l'ancrage.

La majorité des molécules HLA de classe I possède deux sites de fixation pour des résidus d'ancrage dominants. Ces sites correspondent généralement aux poches où se fixent les résidus se situant en position 2 et 9 ou 10 du peptide. Ainsi, la Leucine en position 2 et la Valine en position 9 pour le HLA-A2 représentent des résidus d'ancrage dominants. Les motifs d'ancrage des peptides se liant à la molécule HLA-A\*0201, qui est un des allèles les plus fréquemment exprimés dans la population caucasienne, ont été largement étudiés et malgré quelques divergences dans les résultats, probablement dues aux techniques employées, ils sont maintenant bien caractérisés (Falk *et al*, 1991 ; Ruppert *et al*, 1993 ; Rammensee *et al*, 1995). Cela signifie que les séquences peptidiques des antigènes présentées sont variables et dépendent de la molécule de HLA à laquelle ils sont liés (Barouch *et al*, 1995). Les motifs d'ancrage pour une molécule HLA, lorsqu'ils sont connus, permettent de prédire la capacité d'un peptide à se lier ou non sur cette molécule. C'est ce principe qui est utilisé pour des bases de données comme SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>) et BIMAS ([http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)) afin de prédire l'affinité de la fixation d'un peptide sur une molécule HLA.

#### **II.2.2.f. Activation / maturation des cellules dendritiques**

Afin d'expliquer les différences de propriétés existant entre les cellules dendritiques, une hypothèse selon laquelle les cellules dendritiques existent sous deux états, immature et mature, a

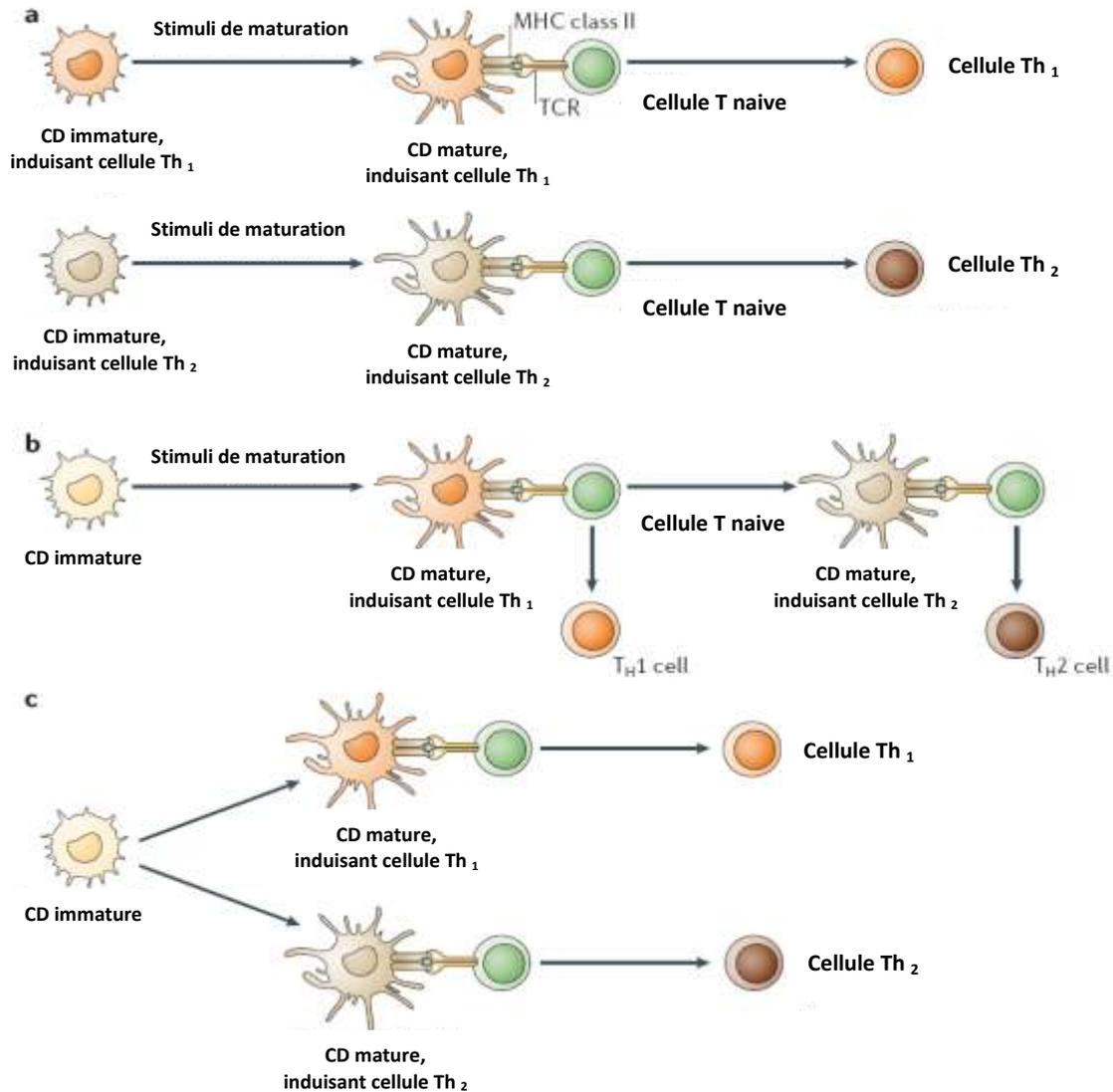
été proposée (Steinman *et al*, 1991) et a abouti au paradigme suivant : les cellules dendritiques immatures, résidant en périphérie, sont douées de capacité de phagocytose importante et reçoivent des signaux de maturation qui induisent leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi que l'acquisition de la capacité à stimuler les lymphocytes T naïfs. Selon ce modèle, de profonds changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels interviennent et expliquent les différences entre les cellules dendritiques immatures et matures. Comme nous venons de le voir, simultanément à l'internalisation des antigènes, la cellule dendritique immature perçoit des signaux du type cytokines inflammatoires ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ), produits microbiens, ARN double brin, motifs CpG) ou des signaux délivrés par des cellules du système immunitaire qui vont avoir une influence sur l'activation de la cellule dendritique. Tout d'abord, sur le plan morphologique, les cellules dendritiques subissent une réorganisation du cytosquelette, perdent leur capacité d'adhérence et acquièrent les longs prolongements cytoplasmiques qui leur confèrent une très forte mobilité. Sur le plan phénotypique, on assiste à une augmentation de l'expression des molécules de costimulation (CD80, CD86...) et des molécules d'adhérences telles que CD54, CD58. Les molécules du CMH de classe I et II sont également exprimées de manière plus importante à la surface des cellules dendritiques matures. Sur le plan fonctionnel, ces cellules dendritiques acquièrent une importante capacité de présentation de l'antigène, mais perdent leur potentiel de capture et d'apprêtement de l'antigène.

En résumé, on peut dire que les cellules dendritiques activées acquièrent les moyens de communiquer avec les autres effecteurs du système immunitaire en vue d'induire un certain type de réponse, allant du rejet des antigènes internalisés à l'induction d'une tolérance (Steinman *et al*, 2003).

### **II.2.2.g. Activation des effecteurs par les cellules dendritiques**

Du fait de leur rôle central dans le déclenchement de réponses immunes, les cellules dendritiques communiquent avec de nombreux types cellulaires de l'immunité, allant des effecteurs de l'immunité adaptative à ceux de l'immunité innée. Elles peuvent soit les stimuler de façon à induire une réaction de lutte contre les antigènes internalisés, soit au contraire fournir des signaux qui induisent une tolérance vis-à-vis de ces antigènes.

Comme décrit précédemment, l'induction d'une réponse lymphocytaire T par les cellules dendritiques nécessite un ensemble d'événements comportant la collecte et l'apprêtement d'antigènes, l'intégration du contexte environnemental, la migration vers les ganglions lymphatiques, l'acquisition de propriétés de stimulation accrues et la rencontre avec les lymphocytes. Une fois en contact avec les lymphocytes T spécifiques des épitopes qu'elles présentent, les cellules dendritiques sont capables de les activer efficacement. La seule reconnaissance d'un complexe formé par un épitope associé à une molécule du CMH ne suffit pas à activer les lymphocytes naïfs mais définit leur spécificité (par exemple, les lymphocytes T CD8 reconnaissent les pCMH-I et les lymphocytes T CD4 les pCMH-II). La cellule dendritique fournit en parallèle des signaux aux cellules effectrices afin d'induire leur activation (O'Neill *et al*, 2004 ; Friedl *et al*, 2005). Afin que la réponse CTL dirigée contre la tumeur soit optimale, les lymphocytes T CD8 doivent recevoir une coopération des lymphocytes T CD4 auxiliaires (LTh) (Baxevanis *et al*, 2000). Les cytokines les plus favorables au maintien de l'activité des CTL sont sécrétées par les lymphocytes T CD4 dits Th<sub>1</sub> (IL-12, INF $\gamma$ ...) alors que les lymphocytes Th<sub>2</sub>, sécréteurs d'IL-4 et d'IL-10 par exemple, favorisent le développement de réponses humorales en stimulant les lymphocytes B (Hung *et al*, 1998). Comme pour l'activation des lymphocytes T en CTL, l'activation des lymphocytes T CD4 auxiliaires nécessite des interactions intenses. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le recrutement de lymphocytes T CD4 avec un profil Th<sub>1</sub> ou Th<sub>2</sub> par les cellules dendritiques (Reis e Sousa *et al* 2006) (Fig. 13, page 45). Le modèle de la lignée stipule que chaque sous-population de cellules dendritiques est spécialisée, après activation, dans l'induction d'une immunité soit de type Th<sub>1</sub> soit de type Th<sub>2</sub> (Liu *et al*, 2001) (Fig. 13a, page 45). Le modèle temporel propose qu'une même cellule dendritique puisse induire successivement une polarisation Th<sub>1</sub> puis Th<sub>2</sub>, en fonction de ses propriétés de présentation et de stimulation qui diffèrent suivant son avancée dans son programme d'activation (Langenkamp *et al*, 2000) (Fig. 13b, page 45). Enfin, dans le modèle de la plasticité, les cellules dendritiques immatures peuvent donner naissance à des cellules capables d'orienter les lymphocytes vers une réponse de type Th<sub>1</sub> ou bien Th<sub>2</sub> (Kalinski *et al*, 1999 ; Vieira *et al*, 2000) (Fig. 13c, page 45). Il est probable que la capacité des cellules dendritiques à orienter une réponse de type Th<sub>1</sub> ou Th<sub>2</sub> tienne compte à la fois des propriétés intrinsèques de la cellules dendritiques et des signaux qu'elle a perçus ainsi que de son stade d'activation.



**Figure 13 : Théories de polarisation Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> par les cellules dendritiques.**

Le modèle de la lignée (a), le modèle temporel (b) et le modèle de la plasticité (c) font partie des modèles qui ont été proposés pour expliquer la capacité des cellules dendritiques à induire la polarisation de la réponse lymphocytaire vers un type Th<sub>1</sub> ou Th<sub>2</sub>. D'après Reis e Sousa *et al*, 2006.

Par le biais des lymphocytes T CD4 différenciés en lymphocytes Th<sub>2</sub>, les cellules dendritiques activent les lymphocytes B de manière indirecte. Cependant, les cellules dendritiques agissent directement sur divers aspects de la biologie des lymphocytes B: elles ont un impact sur leur survie, leur prolifération, ainsi que leur différenciation en plasmocytes. La communication entre ces deux types cellulaires se ferait soit par contact cellulaire via des récepteurs d'activation et de survie (Litinskiy *et al*, 2002 ; MacLennan *et al*, 2002 ; Balazs *et al*, 2002), soit par le biais de la sécrétion de cytokines (IFN de type I et IL-6) (Jego *et al*, 2003). L'essentiel de ces communications a été étudié dans le cadre de la réponse immunitaire contre

des agents infectieux mais il est probable que les cellules dendritiques interagissent aussi de cette manière avec les lymphocytes B dans le cadre d'une réponse anti-tumorale.

L'immunité anti-tumorale n'implique pas que des effecteurs de l'immunité adaptative et les cellules dendritiques communiquent aussi avec les effecteurs la branche innée de l'immunité. Les interactions entre cellules NK et cellules dendritiques ont été beaucoup étudiées. Nous avons déjà vu que ces deux types cellulaires pouvaient communiquer sur le site périphérique où l'organisme est agressé, ce qui aboutissait à l'activation ou à la lyse des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques activées, une fois arrivées dans les organes lymphoïdes secondaires, interagiraient avec les cellules NK résidant dans ces organes (Moretta *et al*, 2006). En effet, il a été montré que les cellules dendritiques peuvent activer les NK et induire chez ces dernières l'acquisition de mécanismes de cytotoxicité *in vitro* (Yu *et al*, 2001 ; Nishioka *et al*, 2001 ; Ferlazzo *et al*, 2002 ; Gerosa *et al*, 2002) et l'augmentation de leur activité anti-tumorale *in vivo* (Fernandez *et al*, 1999 ; Turner *et al*, 2001). Cette activation a lieu par le biais de la sécrétion de cytokines (IL-12, IL-18, IL-15 ou IFN de type I) (Borg *et al*, 2004 ; Walzer *et al*, 2005) ou par des contacts cellulaires *via* des interactions entre les molécules MICA/B exprimées par les cellules dendritiques et le récepteur activateur NKG2D par les NK (Jinushi *et al*, 2003). Les communications entre les cellules dendritiques et les cellules NK nécessitent même l'établissement d'une synapse (Borg *et al*, 2004)

### **II.2.3. Les autres cellules effectrices de l'immunité anti-tumorales**

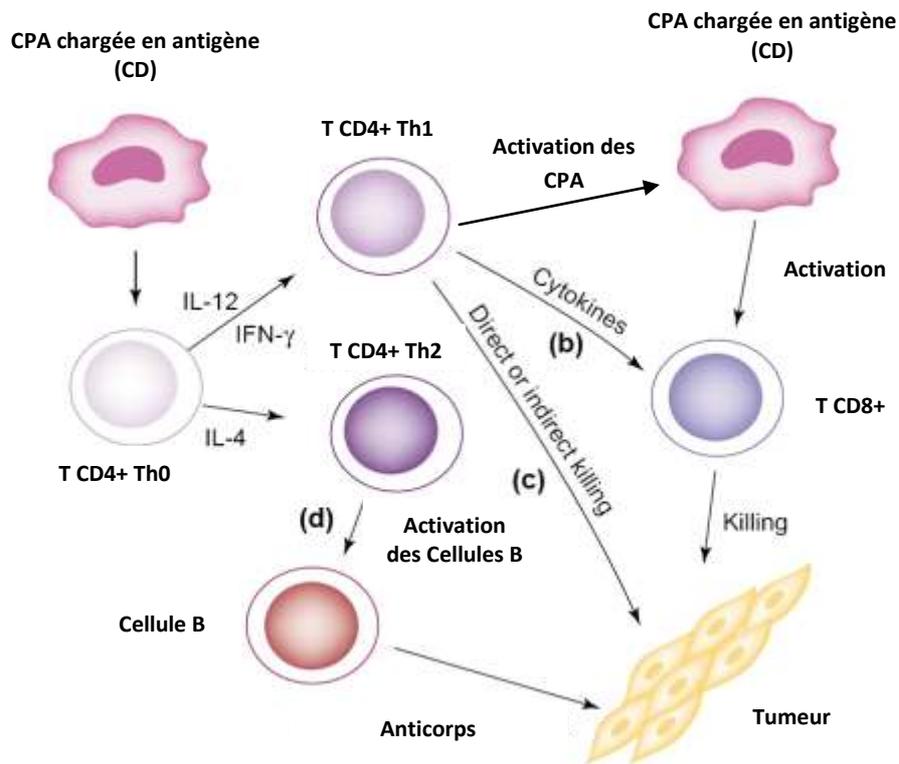
Outre les CTL et les cellules dendritiques, de nombreux autres types cellulaires interviennent dans la réponse anti-tumorale. Parmi ceux-ci, on retrouve des effecteurs de l'immunité acquise (lymphocytes B, lymphocytes T) comme innée (NK, macrophages...)

#### **II.2.3.a. Les lymphocytes T CD4**

De nombreuses études ont montré que, tout comme les CTL, les lymphocytes T CD4 ont un rôle très important dans l'établissement et le maintien d'une réponse anti-tumorale (Hung *et al*, 1998 ; Wang *et al*, 2001 ; Assudani *et al*, 2007). Les lymphocytes T CD4 naïfs s'activent de façon comparable aux lymphocytes T CD8 : parallèlement à la présentation d'un complexe pCMH-II, ils reçoivent des signaux de costimulation et d'orientation. Une fois activés, les cellules T CD4 se différencient en cellules T auxiliaires ayant une faible capacité cytotoxique, bien qu'il ait été décrit qu'ils pouvaient induire la lyse de cellules par les mécanismes suivants : TRAIL, FasL ou encore le système perforine / granzyme (Ju *et al*, 1994 ; Thomas *et al*, 1998 ;

Echchakir *et al*, 2000) (Fig. 14c). Cependant, dans la mesure où la plupart des tumeurs n'expriment pas de molécules de CMH-II à leur surface, il ne s'agit probablement pas du mécanisme d'action principal des lymphocytes T CD4.

Leur rôle consiste en réalité à orchestrer les différents effecteurs de la réponse immunitaire. Les lymphocytes T CD4 de type Th<sub>1</sub> produisent des cytokines favorables à l'activité des CTL (Fig. 14b) ou des macrophages (Hung *et al*, 1998). On a longtemps supposé que la capacité des lymphocytes T CD4 à induire la génération de CTL était médiée par la sécrétion de cytokines uniquement mais des études ont par la suite montré que les lymphocytes T CD4 pouvaient agir directement sur les cellules dendritiques, par l'intermédiaire de l'interaction CD40 / CD40 L (Schoenberger *et al*, 1998 ; Bennett *et al*, 1998 ; Ridge *et al*, 1998). Ce type de contact a pour effet d'activer la cellule dendritique à présenter des antigènes aux lymphocytes T CD8 et à les stimuler (Fig. 14a). Les lymphocytes Th<sub>2</sub> favorisent le développement de réponses humorales en stimulant les lymphocytes B (Fig. 14d). Ainsi, les lymphocytes T CD4, cellules spécialisées dans l'orientation de la réponse immunitaire, communiquent avec les différents effecteurs impliqués dans la réponse anti-tumorale.



**Figure 14 : Implication des lymphocytes T CD4 dans l'élimination des tumeurs.**

Les lymphocytes T CD4 jouent un rôle central dans l'induction de la réponse anti-tumorale (a) en fournissant aux CPA des signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T CD8 ; (b) en sécrétant des cytokines nécessaires à la fonction des lymphocytes T CD8 ; (c) en agissant de manière directe sur la tumeur ou encore (d) en stimulant les cellules B à produire des anticorps. D'après Wang *et al*, 2001.

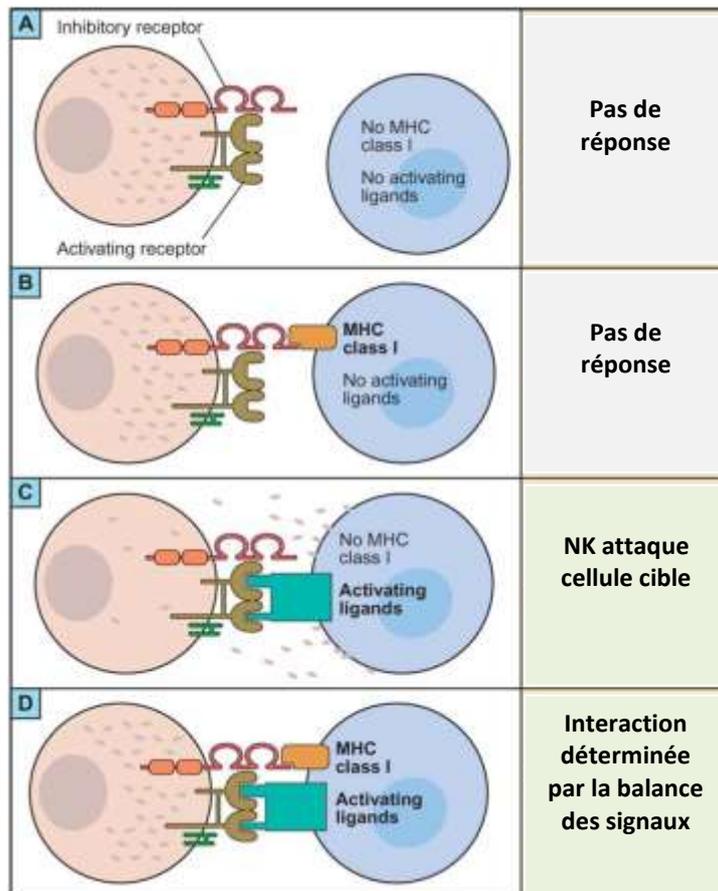
En plus des voies de différenciation Th<sub>1</sub> ou Th<sub>2</sub>, les lymphocytes T CD4 peuvent être activés en lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Treg ne jouent pas un rôle dans l'élimination des cellules tumorales, bien au contraire, puisqu'ils sont à l'origine d'un état de tolérance (Assudani *et al*, 2007). Nous reparlerons de cette population de lymphocytes T CD4 ultérieurement, dans le chapitre concernant les mécanismes d'échappement des tumeurs à la réponse immunitaire.

### II.2.3.b. Les cellules NK

Les cellules NK sont des cellules effectrices de l'immunité innée capables de reconnaître, et de répondre très rapidement à des agressions constituées par des agents pathogènes ou des cellules tumorales. Les cellules NK expriment à leur surface une panoplie de récepteurs activateurs et inhibiteurs (Lanier *et al*, 2005 ; Arnon *et al*, 2006) qui leur permettent de distinguer une cellule normale d'une cellule anormale, c'est-à-dire infectée par un virus ou ayant subi un processus de transformation maligne. Comme leur nom l'indique, les récepteurs activateurs, lorsqu'ils se lient à leur(s) ligand(s) exprimés seulement par des cellules anormales, transmettent des signaux d'activation qui aboutissent à une action cytotoxique de la cellule NK sur la cellule cible exprimant de tels ligands. Les récepteurs inhibiteurs, détectent des ligands de type CMH ou non, exprimés par les cellules normales, et préviennent une attaque des cellules saines via la transmission de signaux qui inhibent les cellules NK (Karre *et al*, 1986). Ainsi, les NK intègrent simultanément un grand nombre de signaux activateurs et inhibiteurs et en fonction de la « force » respective de ces signaux, ils vont être activés ou non (Fig. 15, page 49) (Lanier *et al*, 2005).

Nous avons vu précédemment que les interactions avec les autres types de cellules du système immunitaire étaient aussi prises en compte et pouvaient influencer sur le devenir des cellules NK. Une fois activées, les cellules NK sont capables de tuer une cellule cible :

- ✚ Par cytotoxicité naturelle, la cellule NK reconnaissant directement la cellule à tuer. La cytotoxicité des cellules NK est médiée par des mécanismes communs aux CTLs : exocytose de granules de perforines et granzymes ou interaction directe entre Fas-L (sur NK) / Fas (sur la cellule cible) par exemple.
- ✚ Par cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC), au cours de laquelle les cellules NK, exprimant la molécule CD16 capable de reconnaître les IgG, lysent les cellules recouvertes d'anticorps.
- ✚ Par la sécrétion de cytokines comme l'IFN $\gamma$ , les IFN de type I, le GM-CSF, etc...



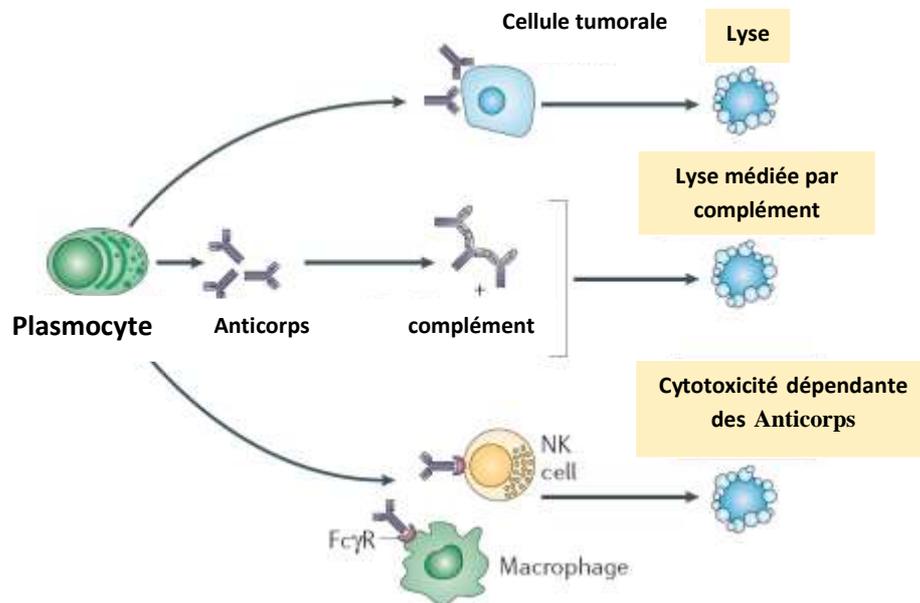
**Figure 15 : Activation des cellules NK par les cellules cibles.**

En l'absence de signaux activateurs (A et B), les cellules NK ne sont pas activées. (C) Dans le cas où seuls des signaux activateurs (et pas inhibiteurs) sont exprimés, la cellule NK exerce une action cytotoxique sur la cellule qu'elle reconnaît comme étant une cible. (D) Quand des signaux activateurs et inhibiteurs sont exprimés par la cellule avec laquelle la cellule NK interagit, l'issue de l'interaction dépend des forces respectives des deux types de signaux. D'après Lanier *et al*, 2005.

### II.2.3.c. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les effecteurs de la réponse immunitaire humorale. Une fois activés, ils sont en mesure de se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps dirigés contre des antigènes solubles ou portés par des agents pathogènes et des cellules cibles. Des anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes tumoraux ont été mis en évidence chez des patients porteurs de tumeurs, y compris dans le cas du MPM (Robinson *et al*, 1998 ; Ho *et al*, 2005). Ces anticorps permettent aux CPA de capter des antigènes de tumeur par l'intermédiaire de leur récepteur puis de présenter ces antigènes aux lymphocytes T. Les cellules tumorales recouvertes d'anticorps peuvent aussi être phagocytées par des CPA par opsonisation, lysées par des cellules NK et des macrophages par ADCC ou encore lysées par action du complément (Fig. 16, page 50). Cependant, l'importance de ces lymphocytes B spécifiques dans la réponse anti-tumorale n'a pas été clairement établie. Si la présence d'anticorps

dirigés contre des antigènes tumoraux est relativement fréquente dans les sérums de patients atteints de cancer, la corrélation avec une meilleure survie n'est pas évidente et on ne sait pas trop à quel point l'induction d'une réponse humorale est bénéfique pour le patient (Canevari *et al*, 1996 ; Gilboa *et al*, 1999).



**Figure 16: Implication des lymphocytes B dans l'immunité anti-tumorale.**

Les anticorps produits par les lymphocytes B pourraient être à l'origine de la lyse des cellules tumorales de plusieurs manières. (a) Ils peuvent avoir un effet direct sur la tumeur, faire intervenir le système du complément (b) ou bien des effecteurs comme les NK ou les macrophages (c). D'après Zitvogel *et al*, 2006.

### II.2.3.d. Les macrophages

Ces CPA ont une grande capacité à capturer et à présenter des antigènes en association avec des molécules du CMH-II aux lymphocytes T CD4 (Lesimple *et al*, 1998) qui produisent alors des cytokines et orientent la réponse immunitaire. Les macrophages activés par des cytokines inflammatoires peuvent provoquer la lyse de cellules tumorales directement par ADCC ou via la production de molécules à activité anti-tumorale comme le TNF $\alpha$  ou l'oxyde nitrique (NO). Ils peuvent aussi attirer d'autres cellules du système immunitaire sur le site par la sécrétion de molécules chimiotactiques (Maric *et al*, 1997) et du fait qu'ils peuvent phagocyter les cellules tumorales mortes, ils peuvent présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T sur le site tumoral (Lesimple *et al*, 1998). La présence de macrophages peut toutefois avoir un effet défavorable chez des patients atteints de tumeurs : la sécrétion de NO pourrait en effet avoir une action mutagène et faciliterait la prolifération et la dissémination des cellules tumorales (Lala *et al*, 1998).

## **II.3. Les antigènes de tumeurs**

Au cours de la transformation maligne, l'expression protéique est modifiée: les cellules tumorales expriment des protéines qui sont peu exprimées, voire pas du tout, pas les cellules normales. Ces protéines deviennent les sources de peptides antigéniques qui, lorsqu'ils sont associés aux molécules HLA de classe I, permettent aux lymphocytes T de distinguer les cellules tumorales des cellules normales. Nous avons déjà évoqué le principe du chargement des peptides sur les molécules du CMH-I dans le chapitre concernant l'apprêtement des antigènes par les cellules dendritiques. Des réponses immunitaires anti-tumorales ont été mises en évidence chez l'homme depuis les années 70. Cependant, il faudra attendre les années 90 pour identifier une structure exprimée par les cellules cancéreuses et reconnue par le système immunitaire.

### ***II.3.1. Les différentes techniques d'identification d'antigènes de tumeurs***

Des équipes ont entrepris d'identifier les antigènes de tumeur et les épitopes dérivés de ces antigènes. Ainsi, différentes techniques ont été développées et permettent de caractériser les structures reconnues par les lymphocytes T et B.

#### **II. 3.1.a. L'approche génétique**

Cette technique a permis d'identifier le premier antigène de tumeur humain, MAGE-1 (Van-der-Bruggen *et al*, 1991). Elle consiste à tester l'activation de CTL en réponse à une banque d'ADNc obtenue à partir de cellules tumorales reconnues par ces CTL et transfectée dans des cellules cibles exprimant l'allèle HLA approprié.

Plusieurs étapes sont nécessaires avant d'aboutir à l'identification d'un antigène. Tout d'abord, il faut obtenir un clone de CTL répondant spécifiquement à des cellules tumorales autologues (provenant du même patient). La restriction HLA des CTL peut être définie en testant la réactivité du clone en réponse à des cellules tumorales allogéniques exprimant certains allèles HLA de classe I en commun avec les cellules tumorales autologues et/ou en utilisant des anticorps dirigés contre certains allèles HLA de classe I. Une banque d'ADNc est constituée à partir des cellules tumorales autologues reconnues puis divisée en plusieurs groupes contenant chacun plusieurs ADNc. Chaque groupe est alors transfecté dans des cellules cibles exprimant l'allèle HLA de restriction mais pas l'antigène reconnu. Ces cellules cibles peuvent être un variant de la cellule tumorale autologue qui a perdu l'expression de l'antigène (Van-der-Bruggen *et al*, 1991) ou des cellules COS transfectées avec l'allèle HLA de restriction (Brichard *et al*, 1993). Les CTL sont alors mis en contact avec les cellules cibles transfectées et testés par analyse du relargage de TNF. Lorsque les CTL sont activés et qu'ils

ont produit du TNF, les ADNc contenus dans le groupe sont isolés et transfectés séparément dans les cellules cibles pour un nouveau test. L'ADNc responsable de l'activation des CTL est séquencé et c'est ainsi que l'antigène reconnu est identifié. L'épitope peptidique reconnu au sein de cet antigène reste encore à déterminer. Pour cela, plusieurs ADNc codant des parties distinctes de l'antigène sont transfectés dans les cellules cibles, ce qui permet de localiser la région de la protéine dans laquelle l'épitope se situe. Différents peptides de cette région sont ensuite synthétisés puis testés séparément pour leur capacité à induire une réponse des CTL par chargement sur cellules cibles. Les antigènes caractérisés de cette façon sont généralement reconnus par des CTL spécifiques mais certains peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD4, la méthode étant alors adaptée à ce type de cellules (Topalian *et al*, 1996).

### **II.3.1.b. L'approche biochimique**

C'est par cette technique qu'un épitope d'un antigène de mélanome a été caractérisé pour la première fois (Cox *et al*, 1994). Elle permet également d'identifier des structures reconnues par les CTL et les lymphocytes T CD4 (Halder *et al*, 1997). Comme dans l'approche précédente, des CTL répondant spécifiquement aux cellules tumorales autologues doivent être disponibles et il faut en déterminer la restriction HLA. Les molécules HLA obtenues à partir de lysats de cellules tumorales sont purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne grâce à des anticorps dirigés contre une classe de molécules HLA. Une élution acide permet ensuite de décrocher les peptides logés dans ces molécules HLA. Ces peptides sont ensuite purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance. Chaque fraction de peptide est testée pour sa capacité à activer les lymphocytes T spécifiques et ceux qui ont été à l'origine d'une réaction de ces lymphocytes T sont séquencés. Il faut ensuite tester séparément la capacité à stimuler les CTLs de chaque épitope ainsi identifié. Il reste encore à déterminer l'antigène d'où provient l'épitope. Pour cela, la séquence peptidique peut être comparée aux séquences de gènes stockés dans des bases de données. Il est aussi possible de préparer à partir de la séquence peptidique, un mélange d'oligonucléotides dégénérés qui servira à cribler une banque d'ADNc.

### **II.3.1.c. L'approche immunologique inverse**

Il n'est pas nécessaire dans ce cas de disposer des lignées tumorales et des CTL autologues. Le principe consiste à induire *in vitro* des lymphocytes T spécifiques d'une protéine dont on soupçonne qu'elle pourrait être antigénique. L'existence de bases de données de séquences génomiques complètes autorise une analyse encore plus systématique des cancers et permet

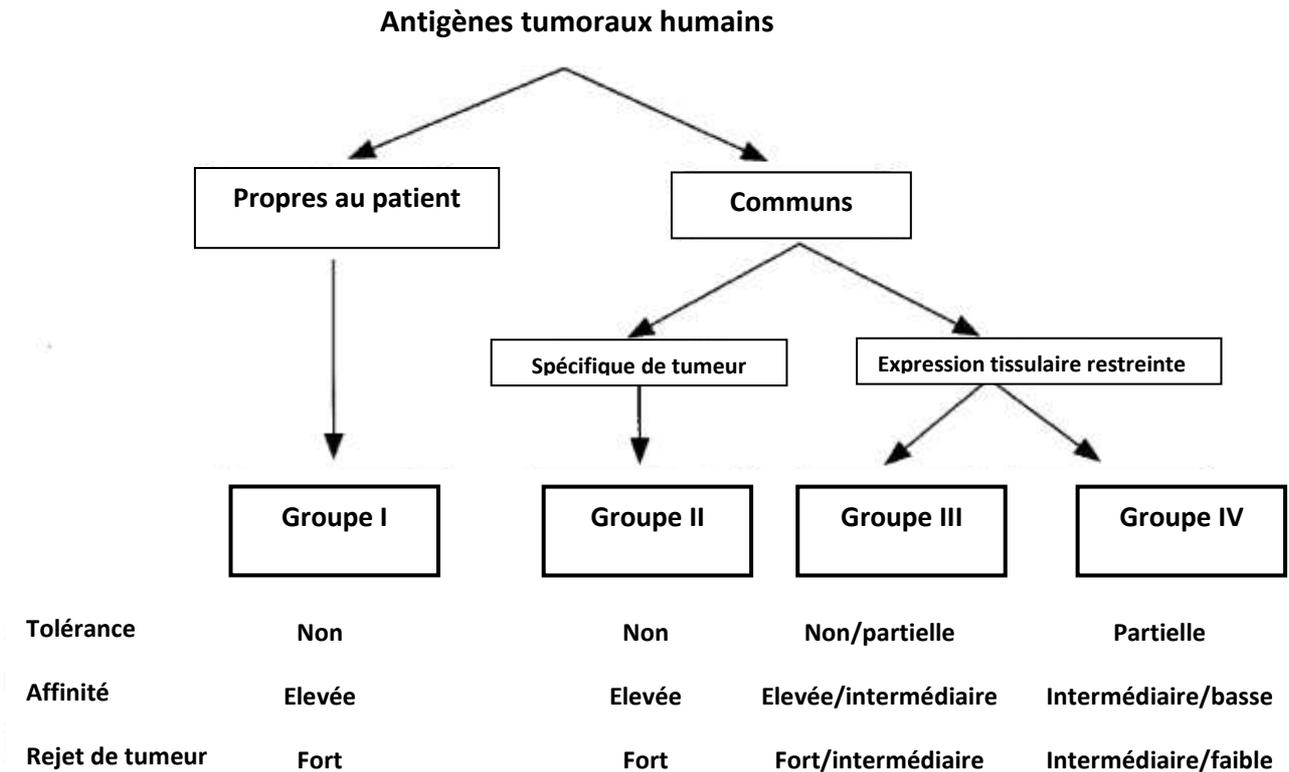
d'identifier des gènes préférentiellement exprimés par les tumeurs. Des approches de biologie moléculaire ou de protéomique permettent d'étudier simultanément l'expression de nombreux antigènes potentiels. Cependant, dans l'hypothèse où une protéine s'avèrerait être exprimée par une tumeur, sa pertinence en tant qu'antigène de tumeur resterait à vérifier. Pour ce faire, des CPA chargées avec cet antigène sont utilisées pour stimuler les lymphocytes T. Il existe plusieurs manières de charger les CPA : le gène correspondant à l'antigène peut être transfecté dans les CPA; il est aussi possible de charger directement des peptides sur les CPA. Ces peptides peuvent être isolés à partir des molécules HLA par élution ou bien sélectionnés à partir de l'antigène candidat par des logiciels de prédiction (Viatte *et al*, 2006).

#### **II.3.1.d. L'approche sérologique**

Cette approche permet l'identification d'antigènes exprimés par les cellules tumorales et reconnus par les anticorps produits par les lymphocytes B. La méthode SEREX (SERological identification of antigens by recombinant EXpression cloning) utilise ces anticorps pour identifier dans un système d'expression *in vitro* les gènes dont sont issus les antigènes (Sahin *et al*, 1995 ; Gunawardana *et al*, 2007). Néanmoins, pour chaque protéine identifiée, un important travail est encore nécessaire pour caractériser son profil d'expression et son intérêt potentiel en tant que cible d'une réponse anti-tumorale. Ce type d'approche a permis d'identifier des centaines d'antigènes de tumeurs (Preuss *et al*, 2002). En particulier, des anticorps dirigés contre la topoisomérase II $\beta$ , retrouvé dans un nombre important de patients atteints de mésothéliome (Robinson *et al*, 2000).

#### **II.3.2. Classification des antigènes**

Historiquement, les premiers antigènes de tumeurs identifiés étaient exprimés par les cellules de mélanome. Depuis, de nombreuses études ont été réalisées dans d'autres types de cancers et la liste des antigènes de tumeurs humains connus ne cesse de s'allonger (bases de données : <http://www.cancerimmunity.org/statics/databases.htm> (03.02.08)). Il est possible de classer les antigènes tumoraux de nombreuses façons, par exemple, en tenant compte de leur profil d'expression dans les tumeurs et les tissus (Fig. 17, page 54).



**Figure 17 : Classification des antigènes de tumeur reconnus par les CTL.**

D'après Gilboa et al, 1999.

### II.3.2.a. Les antigènes du groupe I propres aux patients

Ces antigènes sont issus de produits synthétisés à partir d'un gène ayant subi une mutation ponctuelle. Ils résultent des processus d'oncogenèse et plus particulièrement de l'instabilité génétique des cellules tumorales. De tels antigènes ne sont pas censés induire des phénomènes de tolérance et représentent donc des antigènes de rejet de tumeur intéressants d'un point de vue immunologique. Néanmoins, ils sont propres à un patient et c'est là leur limite: il n'est pas envisageable d'isoler et d'identifier de tels antigènes pour chaque patient.

### II.3.2.b. Les antigènes du groupe II spécifiques de tumeurs

Les antigènes appartenant à ce groupe sont caractérisés par le fait qu'ils sont exprimés uniquement par les tumeurs, contrairement aux autres tissus de l'organisme. En outre, les cellules tumorales de plusieurs patients différents expriment ces antigènes. A priori, de tels antigènes représentent de bons candidats pour l'immunothérapie car ils ne sont pas à l'origine d'une tolérance. Deux catégories peuvent être distinguées :

- 1) Les antigènes issus de mutations participant au processus oncogénique et donc susceptibles d'être partagés par plusieurs individus. Par exemple, des mutations affectant le gène codant pour la  $\beta$ -caténine, une protéine impliquée dans l'adhérence cellulaire et dans la voie de signalisation Wnt, sont décrites dans différents types de cancers humains (Ilyas *et al*, 1997 ; Morin *et al*, 1997 ; Rubinfeld *et al*, 1997). Les mutations décrites concernent des sites de phosphorylation et sont à l'origine d'une augmentation de la stabilité de la protéine mutée. Elle forme alors de manière constitutive des complexes avec des facteurs de transcription comme le TCF/LEF-1 (Eastman *et al*, 1999) et induisent la transcription de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et du développement tumoral (une liste de gènes cibles est disponible : <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html> (18.06.2008))
- 2) Les antigènes viraux dérivés des virus oncogènes. Ils constituent une autre catégorie d'antigènes de tumeurs potentiellement pertinents pour l'immunothérapie anti-tumorale. Un certain nombre d'antigènes viraux a été étudié en détail dans des modèles de tumeurs viro-induites chez la souris et ils se sont avérés pertinents dans le rejet tumoral (Plata *et al*, 1987 ; Kast *et al*, 1989 ; Klarnet *et al*, 1989 ; Kast *et al*, 1991). Chez l'homme, des CTL spécifiques de tumeur peuvent être induits *in vitro* via des sensibilisations de lymphocytes T CD8 naïfs par des peptides E7 du HPV16 (*Human PapillomaVirus*, présents dans la plupart des carcinomes cervicaux) présentés dans le contexte HLA-A2 (Ressing *et al*, 1995).

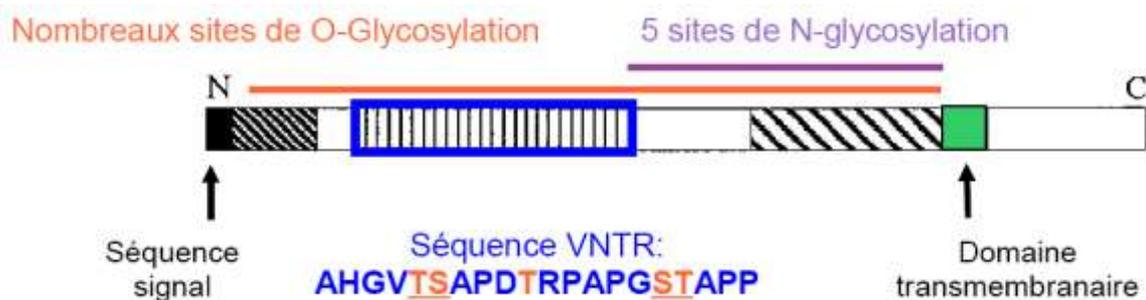
### **II.3.2.c. Les antigènes du groupe III partagés à expression tissulaire restreinte**

La famille des CTA (*Cancer Testis Antigens*), à laquelle appartiennent les antigènes codés par les familles multigéniques MAGE ou NY-ESO-1 par exemple, en sont les principaux représentants. Ces antigènes sont codés par des gènes silencieux dans les tissus sains, à l'exception des testicules et pour certains, du placenta, mais ré-exprimés dans de nombreux types de tumeurs (Scanlan *et al*, 2004). Dans la mesure où les cellules germinales testiculaires et les cellules du trophoblaste n'expriment pas de molécule du CMH-I (Haas *et al*, 1988), l'expression de ces antigènes peut être considérée comme spécifique de tumeur. L'activation des gènes de la famille MAGE résulte généralement d'une déméthylation de leurs promoteurs (De Smet *et al*, 1996 ; Serrano *et al*, 1996) et est partagée par différents types de tumeurs (mélanomes, carcinomes ovarien et rénal, cancer de la vessie). De plus, ces antigènes sont reconnus par les lymphocytes T CD4 et/ou CD8 dans des contextes HLA de classe I et II différents. Ainsi, ces antigènes représentent des cibles intéressantes en immunothérapie.

### II.3.2.d. Les antigènes du groupe IV différenciés et surexprimés

Les antigènes de différenciation sont exprimés par des tissus sains et par plusieurs types de tumeurs. La plupart des antigènes de différenciation ont été identifiés dans le mélanome (tyrosinase, gp100, Melan-1/MART1) mais il en existe un qui a été décrit dans le mésothéliome : il s'agit de la mésothéline (MSLN). L'expression tissulaire relativement limitée (plèvre, péricarde et péritoine) de cet antigène en fait une cible idéale pour l'immunothérapie. La MSLN est utilisée en tant que cible d'une immunotoxine, appelée SS1P. Il s'agit d'une molécule constituée d'une toxine bactérienne tronquée (l'exotoxine A de *Pseudomonas*) et d'un fragment variable d'un anticorps spécifique de la MSLN (Hassan *et al*, 2004). L'immunotoxine se fixe donc sur les cellules qui expriment la MSLN et permet à l'exotoxine d'exercer son action toxique sur ces cellules. L'activité de SS1P a été testée *in vivo* chez la souris (Fan *et al*, 2002) et *in vitro* sur des lignées tumorales humaines (cancer de l'ovaire et mésothéliome péritonéal) (Hassan *et al*, 2002 ; Li *et al*, 2004). De plus, un essai clinique est en cours chez l'homme. La MSLN est une protéine assez immunogène puisque des réponses humorales et cellulaires ont été détectées vis-à-vis de cet antigène chez des patients atteints de cancer. Ainsi, on a rapporté qu'environ 40% des patients atteints d'un mésothéliome ou d'un cancer de l'ovaire développent des réponses humorales contre cet antigène (Ho *et al*, 2005). De plus, au cours d'un essai de vaccination basé sur l'injection de lignées tumorales autologues sécrétant du GM-CSF réalisé sur des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique, une réponse immunologique a été détectée chez certains patients (Jaffee *et al*, 2001). L'étude des populations lymphocytaires de ces patients a par la suite permis d'établir que cette réponse était associée à une réponse CTL dirigée contre la protéine MSLN dans trois contextes HLA différents (HLA-A2, -A24 et -A3) (Thomas *et al*, 2004). Les CTL d'un des patients de cette étude ont même démontré leur capacité à lyser des lignées tumorales. Une autre équipe a réussi à générer des lignées de CTL à partir de PBMC de patients sains et de patients atteints de cancer (Yokokawa *et al*, 2005). Ces lignées sont dirigées contre l'épitope (447-456) de la MSLN et sont capables de lyser des lignées tumorales de diverses origines quand celles-ci sont HLA-A2 et expriment la MSLN. Enfin, une équipe a récemment induit une réponse CTL dirigés contre un épitope de la MSLN chez des souris transgéniques HLA-A2 en les vaccinant avec de l'ADN codant pour un trimère constitué de la  $\beta$ 2M, une molécule HLA-A2 et de l'épitope MSLN<sub>(540-549)</sub> (Hung *et al*, 2007). Ce protocole de vaccination a en outre conféré à des souris une protection vis-à-vis de cellules tumorales exprimant la molécule HLA-A2 et la MSLN. L'ensemble de ces études montre donc l'intérêt potentiel de cet antigène en immunothérapie.

La protéine MUC-1 est un exemple d'antigène surexprimé par les cellules tumorales qui appartient à la famille des mucines, caractérisée par le niveau extrêmement élevé de motifs glycaniques liés à la protéine par des liaisons O-glycosidiques (fixation sur la Tyrosine et la Sérine). Elle fait partie des mucines attachées à la membrane cellulaire et est constituée d'un domaine intracellulaire de 69 acides aminés ; d'un domaine transmembranaire et d'une région extracellulaire qui constitue la partie la plus importante de la protéine. Ce dernier contient une région appelée VNTR formée par un nombre élevé de répétitions (entre 20 et 120 selon les individus et les tissus dans lesquels la protéine est exprimée) d'une séquence de 20 acides aminés. (Fig. 18). (Taylor-Papadimitriou *et al*, 2002).



**Figure 18: Représentation schématique de la protéine MUC-1.**

La partie extracellulaire est la plus importante de la protéine, et dans cette partie, la région VNTR (en bleu) en constitue la plus grande part. La protéine présente de nombreux sites de O-glycosylation sur l'ensemble du domaine extracellulaire (en rouge) mais la fréquence la plus élevée de ces sites se situe dans la zone VNTR. 5 sites de N-glycosylation sont aussi répartis sur l'ensemble de la partie extracellulaire (en violet).

La protéine MUC-1 est responsable de l'induction de réponses humorales dans plusieurs types de cancers (Burchell *et al*, 1984 ; Kotera *et al*, 1994 ; Gourevitch *et al*, 1995 ; Von Mensdorff-Pouilly *et al*, 1996 ; Snijdwint *et al*, 1999). Les cellules tumorales présentent des modifications importantes de la glycosylation sur MUC-1 et certains de ces anticorps reconnaissent donc spécifiquement des formes dites « tumorales » de cette protéine (Wittel *et al*, 2001 ; Ten Berge *et al*, 2001). De nombreuses études sont réalisées sur des protocoles d'immunothérapie basés sur les réponses humorales. Les premières réponses CTL détectées contre la protéine MUC-1 étaient non restreinte à une molécule du CMH de classe I (Brand *et al*, 1989 ; Jérôme *et al*, 1993 ; Takahashi *et al*, 1994). Il est possible en effet que les TCR de ces CTL soient engagés de manière directe aux nombreuses répétitions du domaine VNTR présentes sur la partie extracellulaire de la protéine (Finn *et al*, 1995). Cependant une équipe a réussi, en 1995, à isoler des CTL spécifiques d'un épitope de MUC-1 restreint dans plusieurs contextes HLA (Domanech *et al*, 1995). Puis d'autres études réalisées sur des modèles de souris transgéniques (Carmon *et al*,

2000 ; Heukamp *et al*, 2001) ou chez l'homme (Brossart *et al*, 1999 ; Milazzo *et al*, 2003 ; Tsang *et al*, 2004) ont permis de générer des CTL spécifiques d'autres épitopes et les capacités de lyse de certains ont été testés sur des lignées tumorales *in vitro*. Il semble donc possible d'induire des réponses CTL efficaces contre plusieurs épitopes de MUC-1 et cela renforce l'intérêt de cette protéine en tant que cible d'une immunothérapie. Un des inconvénients de cette protéine réside dans le fait qu'elle est exprimée de façon relativement fréquente par les cellules de l'organisme qui présentent donc elles-aussi des complexes p-CMH contenant ces épitopes à leur surface.

## **II.4. Les mécanismes d'échappement à la réponse antitumorale**

Comme nous l'avons vu, l'organisme dispose de tout un arsenal afin de lutter contre les tumeurs, et pourtant, elles continuent à se développer. Ceci peut s'expliquer par l'induction d'une tolérance périphérique qui résulte de plusieurs mécanismes, tels que la production de cytokines comme IL-6, la délétion par les cellules tumorales elles-mêmes (expression de CD95L ou FasL), ou encore la stimulation des cellules Treg par la présentation d'Ag spécifiques qui bloquent ensuite la réponse.

La question est de comprendre pourquoi les tumeurs immunogènes continuent à se développer ? Grâce à l'expression d'antigènes spécifiques exprimés par les tumeurs, le système immunitaire a, en théorie, la propriété de reconnaître les cellules tumorales comme cellules du non-soi. Cependant, celles-ci peuvent neutraliser la réponse immunitaire et échapper ainsi à cette reconnaissance en esquivant les principaux systèmes de détection. Comme mentionné précédemment, la réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les cellules tumorales. Elle n'implique pas la reconnaissance spécifique de l'antigène et de ce fait elle ne nécessite pas de sensibilisation préalable. Les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK, les polynucléaires sont les principaux acteurs de cette première ligne de défense (Bancroft *et al*, 1993). Leur fonction est de répondre immédiatement afin de limiter la prolifération tumorale. Ces cellules identifiées par leurs capacités cytotoxiques sont également caractérisées par leur aptitude à sécréter de nombreuses cytokines et chémokines. *In vivo*, ces cellules reconnaissent et lysent de nombreux types de cellules tumorales (Trinchieri *et al*, 1989). Des observations cliniques chez l'Homme ont permis de mettre en évidence dans des modèles murins la capacité des cellules NK à détruire sans mécanisme spécifique des cellules tumorales injectées ou viro-induites (Wustrom & Zenner, 1985). Cependant, il est clairement admis que pour rejeter une tumeur, l'organisme doit faire appel à tous ses moyens de défense. Des travaux effectués chez la souris ont en effet montré que bien qu'indispensable au

rejet tumoral, l'immunité naturelle est une réponse précoce qui précède et prépare le développement de l'immunité adaptative via la mise en place d'un réseau cytokinique impliqué dans l'activation de nombreuses cellules immunitaires (Palucka & Banchereau, 1999). Ainsi il est possible de détecter et même d'amplifier des clones T CD8 spécifiques vis-à-vis de certains antigènes de tumeurs. Ainsi, grâce à l'utilisation de complexes CMH/peptide solubles, Lee *et al* ont pu démontrer la présence de lymphocytes T CD8 circulants, spécifiques d'antigènes tumoraux chez 60% de patients atteints de mélanome. En effet, cette étude a permis la détection de lymphocytes T anti-MART-1 et anti-tyrosinase avec des fréquences significatives de 0,16% et 2,2%, respectivement. L'analyse des lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TIL) révèle que 30% d'entre eux sont tout à fait capables de réagir contre des cellules cibles exprimant l'antigène en question avec l'élément de restriction approprié. De plus, il est possible de générer *in vitro* des CTL spécifiques de mélanome de forte affinité. Cependant, l'activité cytolytique détectée *in vitro*, issue de l'interaction des CTL avec leurs cibles spécifiques, ne reflète pas obligatoirement la réactivité anti-tumorale et l'activité cytotoxique *in vivo*. En outre, la présence de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeurs n'est pas toujours associée avec une régression et/ou un rejet de la tumeur. Ainsi, dans l'étude de Lee, le patient présentant la fréquence la plus importante d'effecteurs spécifiques d'antigènes de mélanome s'avérait insensible, *in vitro*, vis-à-vis de cellules exprimant ces antigènes de tumeurs (Lee *et al*, 1999) Ces résultats suggèrent que, même si des lymphocytes T spécifiques anti-tumoraux sont présents à des niveaux détectables chez des patients atteints de cancer, ils ne sont pas forcément compétents pour rejeter la tumeur.

#### **II.4.1. Phénomène de tolérance.**

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

tissulaires avec libération de protéines de stress (HSP)) favorise l'initiation d'une réponse immune. Si le même antigène est présenté dans un environnement dépourvu de signaux de danger, il y a induction d'un phénomène de tolérance (Matzinger, 2002)

#### ***II.4.2. Influence des facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales.***

La synthèse de facteurs solubles par la tumeur peut favoriser la croissance des cellules tumorales via un effet autocrine, mais peut également influencer la réponse immunitaire. Ainsi, la production de substances immunosuppressives telles l'IL-10 et/ou le TGF- $\beta$  par les cellules tumorales exerce un effet inhibiteur sur les CPA. Celles-ci diminuent, en effet, le niveau d'expression des molécules de CMH de classe II et bloquent la synthèse des cytokines responsables de l'activation des lymphocytes T comme l'IL-12. Par ailleurs, certaines cellules tumorales comme celles de cancer colorectal ont la propriété de sécréter des récepteurs solubles de type Decoy DC3 qui vont fixer et neutraliser les molécules FasL dans le milieu extracellulaire échappant ainsi à l'apoptose immuno-induite par les cellules effectrices du système immunitaire (Pitti *et al*, 1998).

#### ***II.4.3. Défaut d'activation des lymphocytes T***

L'activation des lymphocytes T aboutissant à la synthèse d'IL-2 nécessite à la fois un signal antigène spécifique fourni lors de la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le récepteur T à l'antigène (TCR) et un 2<sup>ème</sup> signal dit de co-stimulation. Une des sources pour ce second signal est donnée par la liaison de la molécule CD28 avec ses ligands B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86). L'engagement du TCR en l'absence d'un signal de co-stimulation empêche les lymphocytes T de se différencier en cellules effectrices et induit l'anergie des lymphocytes T spécifiques. Un défaut d'expression des molécules de co-stimulation B7.1 et B7.2 ainsi que des molécules d'adhésion LFA-3 et ICAM-1 à la surface des cellules tumorales contribue à la faible immunogénicité des cancers. De même, la diminution d'expression voire la perte de certains allèles codant pour les molécules de CMH est un mécanisme d'échappement tumoral largement rapporté dans des proliférations malignes de différentes origines. Par ailleurs, bien que les mécanismes précis impliqués dans l'initiation de l'anergie des lymphocytes T chez des patients atteints de tumeurs ne soient pas entièrement caractérisés, il apparaît que ceux-ci peuvent être également associés à un dysfonctionnement des voies de signalisation initiées par l'engagement du TCR via la diminution de l'expression de la chaîne  $\gamma$  du TCR et la perte d'expression de la protéine tyrosine kinase Syk chez les TIL (Calmels, 2004)

#### **II.4.4. Résistance à l'apoptose**

Le développement d'un clone tumoral traduit un déséquilibre entre les niveaux de prolifération et d'apoptose. L'échappement des cellules tumorales à l'apoptose exige des mécanismes qui empêchent la transmission des signaux de mort. Parmi les molécules impliquées dans l'apoptose, on distingue les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (de même que Bcl-XL, Mcl-1, et A1) et les protéines pro-apoptotiques de la famille Bax et Bak. C'est la régulation différentielle de ces deux familles de protéines qui va moduler la sensibilité des cellules à l'apoptose. Un grand nombre de cellules de tumorales humaines montrent une résistance à la mort cellulaire programmée en augmentant le rapport des protéines de la famille Bcl-2/Bcl-XL à celle de Bax/Bak . A titre d'exemple, la translocation t (14 ; 18) présente dans 80% des lymphomes aboutit à une augmentation significative de l'expression constitutive des protéines de la famille Bcl-2, contribuant à la survie *in vivo* des clones B malins (Weiss *et al*, 1987).

#### **II.4.5. Lymphocytes T régulateurs.**

Un autre mécanisme impliqué dans l'inhibition des réponses CTL contre les tumeurs peut être dû à la présence de lymphocytes T régulateurs au sein de la masse tumorale. En effet, les lymphocytes T CD4+CD25+ ont récemment été identifiés comme une population cellulaire dite « régulatrice » dont la déplétion conduit au développement de maladies auto-immunes. Des études plus récentes suggèrent que ces lymphocytes T CD4+CD25+ régulateurs soient également impliqués dans la prévention des réponses CTL anti-tumorales. Ainsi, il a été démontré que ce mécanisme d'échappement tumoral pouvait être contourné via la déplétion de ces lymphocytes T régulateurs sécrétant de TGF- $\beta$  suivie d'un transfert adoptif des lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeurs dans un modèle colorectal de rat (Ghiringhelli *et al*, 2004). De même, des études ont rapporté la faisabilité de traiter, avec un certain succès, des patients atteints de mélanome lorsque ces derniers reçoivent un traitement immunosuppresseur composé de cyclophosphamide et fludarabine, avant injections de populations cellulaires enrichies en lymphocytes T spécifiques de tumeurs issus de TIL. Cette stratégie de vaccination conduit à la fois à la régression des lésions de mélanome et au développement d'auto-immunité. Dans cette étude, la réponse anti-tumorale était associée au repeuplement persistant du compartiment cellulaire T, un phénomène qui n'a jamais été observé avec la simple administration des clones T anti-tumoraux amplifiés *in vitro*.

#### **II.4.6. Localisation des tumeurs.**

Enfin, un autre facteur pouvant contribuer à la l'échappement tumoral peut provenir de la localisation tumorale elle même. En effet, la tumeur n'est pas forcément accessible aux lymphocytes T circulants qui de ce fait ignorent sa présence.

### **III. Immunothérapie du mésothéliome**

De nouvelles perspectives thérapeutiques s'ouvrent actuellement pour le mésothéliome. En effet, un certain nombre d'éléments attestant du potentiel immunogénique de ce cancer suggèrent que les approches d'immunothérapie pourraient constituer une stratégie prometteuse. Ainsi, un cas de régression spontanée a été rapporté, associé à une infiltration intra-tumorale de cellules lymphocytaires et à une réponse sérologique anti-tumorale (Robinson et al, 2001). Chez la même patiente, la progression d'une autre zone tumorale sans infiltration lymphocytaire a été observée. De plus, des réponses humorales de type IgG spécifiques de plusieurs antigènes ont été rapportées dans un contexte de mésothéliome chez 28% (8/29) des malades testés (Robinson et al, 1998). Une étude clinique de phase II sur 22 patients, évaluant l'intérêt d'injections intra-pleurales d'interleukine 2 (IL-2), a donné un taux de réponse de 54% (réponses partielles et complètes). La réponse complète est définie par la disparition totale des signes micro et macroscopique alors qu'une réponse partielle correspond à une diminution d'au moins 50% de la masse tumorale. La médiane de survie de 28 mois (contre 8 mois pour le groupe-contrôle) (Astoul *et al*, 1998). Une étude italienne a également montré l'efficacité d'un traitement par IL-2 en injection intra-pleurale puis sous-cutanée. L'IL-12 est capable de polariser les lymphocytes T vers un phénotype de type Th1. De plus l'IL-12 est un médiateur de l'activité cytotoxicité des cellules T CD8 et des cellules NK. Ce protocole a obtenu une réponse objective de 22% et une médiane de survie de 15 mois (Castagneto *et al*, 2001). Dans un modèle murin de mésothéliome, la thérapie par IL-12 a montré un intérêt en terme de régression voire d'arrêt de la croissance tumorale (Caminschi *et al*, 1998). De même, une étude sur un modèle murin et une étude *ex vivo* chez l'homme ont montré le potentiel de la vaccination par des cellules dendritiques chargées en cellules tumorales apoptotiques sur le contrôle de la croissance tumorale dans le mésothéliome (Ebstein *et al*, 2004 ; Hegmans *et al*, 2005).

## **IV. Intérêt de l'utilisation de molécules hypométhylant l'ADN et d'inhibiteurs d'histone désacétylase**

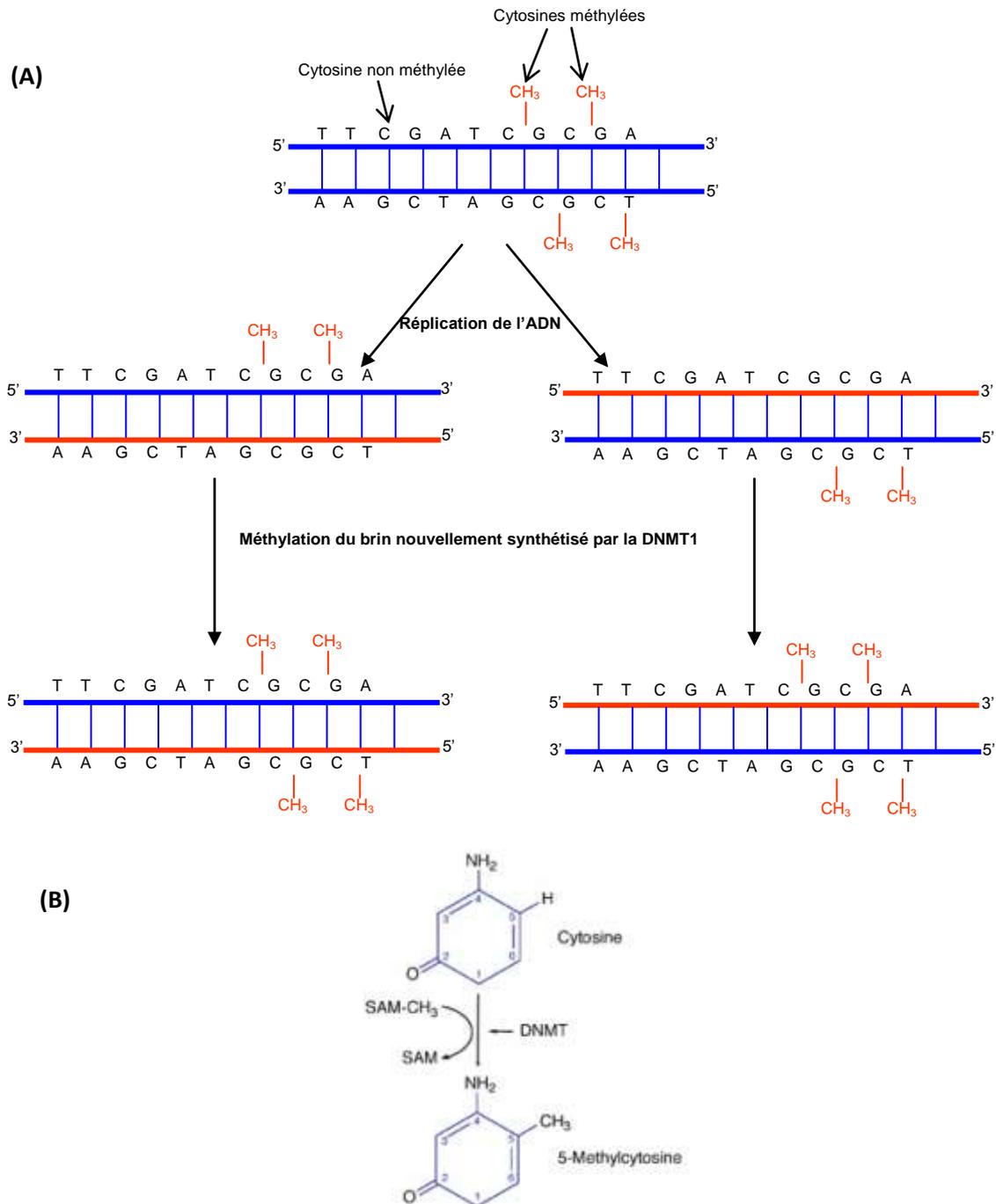
Le développement de stratégies d'immunothérapie spécifiques exige l'identification préalable d'antigènes associés au MPM ; or à l'heure actuelle, aucun n'a été identifié. L'absence d'antigènes communs partagés par les malades, l'hétérogénéité intra-tumorale de l'expression d'antigènes et/ou le faible taux d'expression de ces antigènes, imposent de définir de nouvelles stratégies afin de contourner ce problème. Or la surexpression d'antigènes tumoraux exprimés par différentes lignées tumorales (adénome carcinome, cancer du poumon, cancer du sein...) suite à l'hypométhylation de l'ADN ou à l'acétylation des histones a été démontrée (Weber *et al*, 1994 et Karpf, 2006). L'utilisation d'agents hypométhylants et d'inhibiteurs d'activité histone désacétylase (iHDAC) apparaît donc comme une stratégie intéressante.

### **IV. 1. Rôle et mécanisme de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones**

#### ***IV.1.1. La méthylation de l'ADN***

La méthylation (hypo- et hyper-méthylation) de l'ADN constitue une modification épigénétique engagée dans la régulation de l'expression de gènes. L'implication de ce mécanisme épigénétique a été démontrée dans l'initiation de la transformation néoplasique et le maintien du statut malin des cellules cancéreuses (Gaudet *et al*, 2003 - Nephew *et al*, 2003). L'ADN est méthylé par des méthyltransférases (DNA méthyltransférases ou DNMT) en position C5 (carbone 5) du cycle pyrimidine de la cytosine. Le profil de méthylation établi au cours du développement est conservé lors de la réplication de l'ADN grâce aux DNMT, et notamment la DNMT1 qui présente une forte affinité pour l'ADN hémiméthylé. Pendant la réplication, les DNMT forment un complexe intermédiaire entre une cytosine et un donneur de méthyle, le S-adénosyl-L-méthionine (SAM), qui va être incorporé dans l'ADN au niveau du C5 de la cytosine (Fig. 19, page 64). Dans le génome humain, la méthylation de l'ADN est restreinte aux dinucléotides CpG, à hauteur de 70 à 80% (Ehrlich *et al*, 1982). Cependant, le génome humain comporte de petites régions d'ADN, appelées îlots CpG, constituées de séquences hautement répétitives de dinucléotides CpG, et situées dans les régions promotrices d'environ 50% des gènes. Dans les cellules non tumorales, ces îlots ne sont pas méthylés et autorisent la transcription des gènes (Antequera *et al*, 1993). Dans certaines situations pathologiques comme le cancer, les îlots CpG à proximité du site d'initiation de la transcription peuvent être méthylés de façon excessive. L'expression du gène correspondant est alors inhibée. Ce phénomène est

médié par le recrutement de répresseurs de la transcription comme les protéines se liant à l'ADN méthylé, telles que les MBDs (*methyl-binding proteins*) ou par l'inhibition de la fixation de facteurs de transcription appropriés.



**Figure 19 : Maintien des profils de méthylation au cours des divisions cellulaires par la méthyltransférases DNMT1.**

(A) Mécanisme général

(B) Transfert d'un groupement méthyle du SAM (S-adénosyl-L-méthionine) vers la cytosine par la DNMT1

## **IV.1 2. L'acétylation des histones**

### **IV.1.2.a. Généralités**

Les histones forment le corps du nucléosome et donc de la chromatine. Les changements dans la structure ou dans la composition du corps du nucléosome se traduisent par un changement de la conformation de la chromatine. Les modifications post-traductionnelles des histones touchent majoritairement les queues N-terminales protubérantes des histones et jouent sur la structure des nucléosomes et par conséquent sur l'accessibilité de l'ADN au sein de la chromatine (Sims *et al*, 2003). Les principales modifications post-traductionnelles connues des histones sont : la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation et l'acétylation.

L'hyperacétylation des résidus lysines aux extrémités amino-terminales des histones a été proposée, il y a presque quarante ans, comme étant impliquée dans l'activation transcriptionnelle (Allfrey *et al*, 1964). Des découvertes plus récentes et la caractérisation de complexes qui peuvent ajouter ou retirer des groupements acétyls, ont permis une meilleure compréhension de cette modification covalente qui touche essentiellement les résidus lysines des extrémités amino-terminales des histones. Des études sur le taux global d'acétylation ont montré que pour un gène activement transcrit, sur les 30 résidus lysines présents dans un octamère d'histones, il peut y avoir jusqu'à 13 lysines acétylées (Roth *et al*, 2001). L'ajout d'un groupement acétyl neutralise la charge positive de l'extrémité des histones permettant de relâcher l'interaction ADN-histones et l'interaction entre les nucléosomes, conduisant ainsi à une chromatine plus flexible où l'ADN est plus accessible aux facteurs de transcription. A l'inverse, la désacétylation de l'histone entraîne un compactage de la chromatine et une atténuation de l'expression génique. A l'échelle cellulaire, le niveau d'acétylation délimite topographiquement l'euchromatine et l'hétérochromatine au moyen d'un gradient d'acétylation/désacétylation. Cette modification post-traductionnelle des histones joue aussi un rôle dans la progression cellulaire, la recombinaison et la réparation de l'ADN, ainsi que dans l'apoptose.

### **IV.1.2.b. Histones Acétyltransférase et Histone désacétylase**

Le niveau global d'acétylation des histones est maintenu par les actions antagonistes des histones acétyltransférases, les HAT, et des histones désacétylases, les HDAC. Ces enzymes régulent l'ajout et l'enlèvement d'un groupement acétyl sur les résidus lysines des histones et/ou d'autres protéines non-histones. Ces enzymes sont ciblées sur des promoteurs spécifiques, ce qui leur permet de réguler localement la structure d'histones et donc la transcription. Le ciblage peut se faire soit par l'interaction directe d'une HAT ou HDAC avec un facteur de transcription

séquence-spécifique soit par l'interaction avec un complexe multi-protéique. En effet, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) utilisant des anticorps spécifiques contre les histones acétylées ont permis de vérifier que l'augmentation du taux d'acétylation d'un promoteur proximal d'un gène est bien corrélée à un recrutement d'une HAT au niveau du promoteur et à une augmentation de l'expression du gène étudié (Carrozza *et al*, 2003). A l'inverse, l'hypoacétylation de certains promoteurs est liée à un recrutement des enzymes HDAC ainsi qu'à une répression des gènes (Khochbin *et al*, 2001).

## **IV.2. Modifications épigénétiques et oncogénèse**

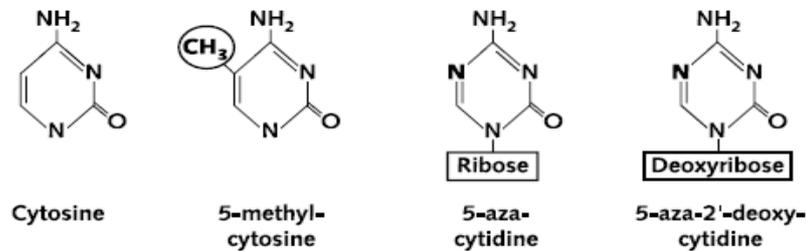
Les modifications épigénétiques représentent, aujourd'hui, une voie de recherche intéressante pour expliquer la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses présentent des aberrations dans l'expression de certains gènes. Ces aberrations ont plusieurs causes: génétique (mutations, perte de l'hétérozygotie, délétions homozygote...etc.), cytogénétique (monosomies, trisomies...etc.) et épigénétique. Deux mécanismes peuvent expliquer la répression de certains gènes. Le premier est l'hyperméthylation des îlots CpG localisés dans les régions promotrices des gènes, qui est suivie du recrutement des MBDs et des HDAC. Le deuxième mécanisme ne nécessite pas la méthylation de la région promotrice du gène, mais implique différents répresseurs transcriptionnels qui activent de manière aberrante les HDAC. Ceci provoquant l'hypoacétylation des histones. Ces deux mécanismes aboutissent donc à la répression du gène. Dans le cadre des pathologies cancéreuses, ce sont les gènes suppresseurs de tumeur qui vont être réprimés tel que P16INK4a (Villar-Garea *et al*, 2004).

## **IV. 3. Mécanisme d'action du 5-azacytidine, du 5-aza-2'-désoxycytidine et de l'acide valproïque**

### ***IV.3.1. Le 5-aza-2'-désoxycytidine et du 5-azacytidine***

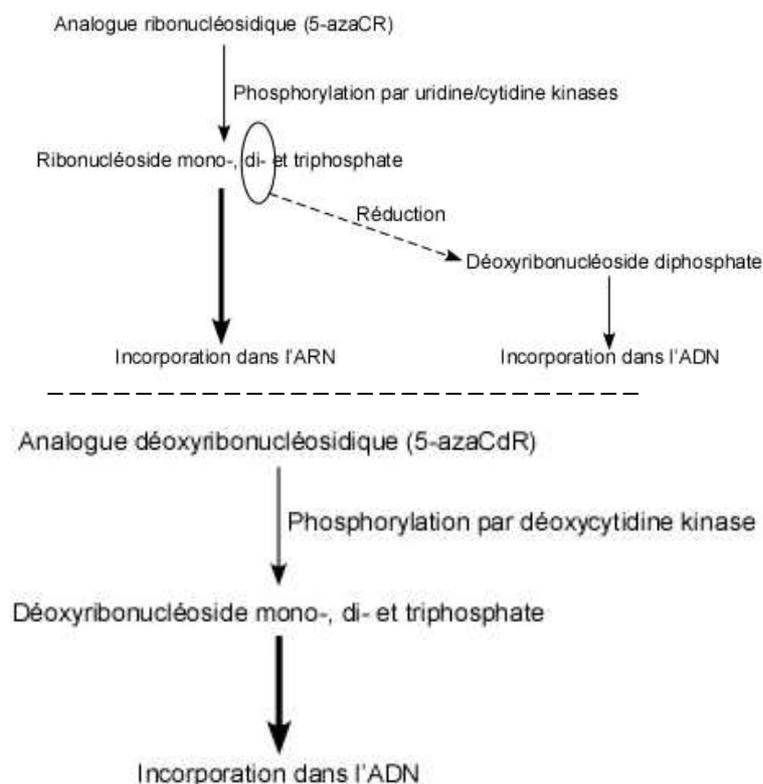
Les aberrations épigénétiques telles que l'hyperméthylation localisée de l'ADN sont potentiellement réversibles, permettant ainsi de restaurer un état cellulaire « normal » au sein de la population tumorale. Ainsi, l'hypométhylation de l'ADN peut être induite par l'utilisation d'agents pharmacologiques ; diverses molécules ont ainsi été développées, notamment des analogues de la cytidine. Parmi eux, le 5-azacytidine (5-azaCR) et le 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azaCdR) ont été largement étudiés et font l'objet de nombreuses études cliniques (Santini *et al*,

2001). Leur efficacité comme agents anticancéreux a été attribuée à la fois à une cytotoxicité directe et à l'induction d'une hypométhylation de l'ADN. Le 5-azaCR et le 5-azaCdR sont des analogues nucléosidiques comportant une cytosine modifiée en position 5, liée à un motif ribose ou désoxyribose, respectivement (Fig. 20).



**Figure 20 : Structure de la cytosine, de la 5-méthylcytosine et des agents hypométhylants 5-azacytidine et du 5-aza-2'-désoxycytidine.**

*In vivo*, leur métabolisation par des kinases permet leur conversion en nucléotides et leur incorporation dans l'ADN (Fig. 21). La modification de leur cytosine en position 5 induit la formation d'un complexe covalent avec la DNMT1 qui empêche le relargage de l'enzyme et provoque une diminution de l'activité méthyltransférase intracellulaire. Il en résulte une profonde hypométhylation de l'ADN après quelques cycles de division cellulaire (Yoo *et al*, 2006).



**Figure 21 : Métabolisation du 5-azacytidine (5-azaCR) et du 5-aza-2'-désoxycytidine (5-azaCdR)**

### IV.3.2. L'acide valproïque

L'acide valproïque (VPA) ou acide 2-propylpentanoïque (Fig. 22) est depuis longtemps utilisé en clinique. C'est un antiépileptique appartenant à la famille des anticonvulsivants non barbituriques, qui agit sur la transmission médiée par le GABA (acide gamma-aminobutyrique), un neurotransmetteur inhibiteur.

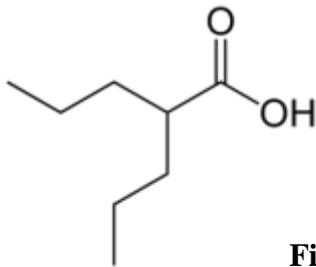


Figure 22 : Structure chimique de l'acide valproïque

De plus, il a été montré que le VPA provoque l'hyperméthylation des queues N-terminales des histones H3 et H4 *in vitro* et *in vivo* et qu'il peut inhiber directement l'activité enzymatique des HDAC à la concentration de 0,5 mM (Göttlicher et al, 2001). Le VPA appartient donc à la famille des inhibiteurs HDAC. Cette activité résulte de sa capacité à se fixer sur le site catalytique de l'enzyme et ainsi, bloquer son activité. Le VPA, en inhibant les HDAC, va empêcher l'hypoacétylation des histones et donc réactiver les gènes suppresseurs de tumeur, qui vont permettre de contrôler le développement tumoral. A l'heure actuelle, les inhibiteurs HDAC sont essentiellement indiqués dans les leucémies et les lymphomes mais aussi dans les tumeurs solides comme les tumeurs de la prostate, du colon et des reins (Kuendgen *et al*, 2007 ; Duenas-Gonzalez *et al*, 2008).

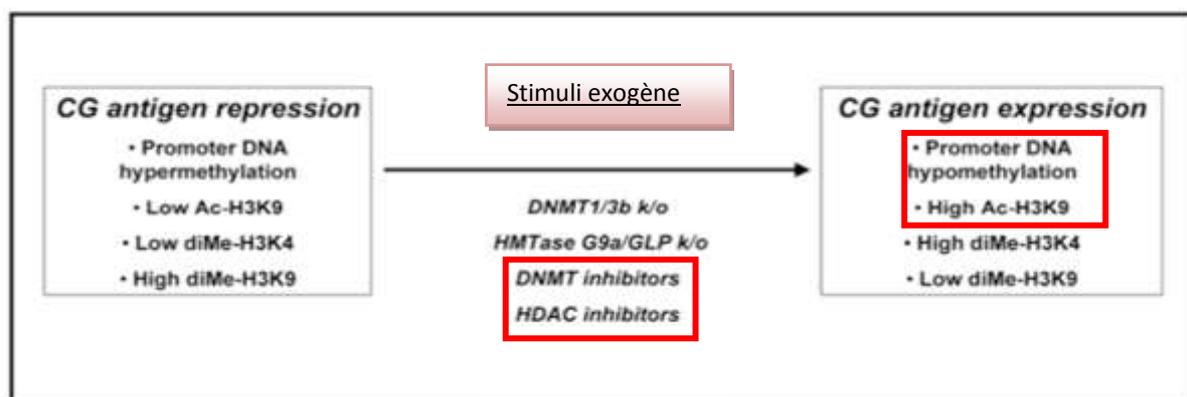
## IV. 4. Méthylation de l'ADN, acétylation des histones et expression d'antigènes tumoraux.

### IV.4.1. Généralités

La première preuve du rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression d'antigènes tumoraux a été établie pour les antigènes testiculaires du cancer (CTA) (Weber *et al*, 1994). Une corrélation entre l'hypométhylation des dinucléotides CpG dans les promoteurs des gènes MAGE et l'augmentation de l'expression antigénique a été observée dans des lignées tumorales (De Smet *et al*, 1996 ; 1999) et dans des tissus (Sigalotti *et al*, 2002). De plus, les

promoteurs de MAGE non méthylés contrôlent la transcription de gènes rapporteurs dans des cellules tumorales n'exprimant pas ce CTA. Ceci suggère que la disponibilité et la fonctionnalité des facteurs de transcription n'est pas impliquée dans l'expression des CTA ; la méthylation de l'ADN représente bien le principal mécanisme modulant leur expression (De Smet *et al*, 1996). Des expériences d'inactivation du gène DNMT1 dans des lignées de cancer colorectal ont démontré le rôle majeur de cette enzyme dans la régulation de l'expression des CTA (James *et al*, 2006). L'inhibition de l'expression de la DNMT1 par des oligonucléotides antisens provoque l'hypométhylation d'un transgène MAGE méthylé (lignée de mélanome), et conduit à une activation prolongée de l'expression de cet antigène tumoral (Loriot *et al*, 2006). Ces deux dernières études prouvent la corrélation entre l'hypométhylation des promoteurs des CTA et l'augmentation de leur expression.

L'implication de l'acétylation des histones dans l'expression des antigènes tumoraux est beaucoup moins étudiée. Cependant une étude réalisée par Shinkai *et al* en 2002, montre que l'expression de MAGE-2 est augmentée lors de l'inactivation du gène de l'enzyme histone méthyltransférase dans des cellules souches embryonnaires et que ceci est accompagnée de modifications dans la structure des histones de la région promotrice de MAGE-2 dont un fort niveau d'acétylation de la lysine 9 (Ac-H3K9). Ceci prouve la corrélation entre l'hyperacétylation des histones de la région promotrice de MAGE-2 et l'augmentation de son expression. La régulation épigénétique de l'expression des CTA (*CG antigen*) est résumée dans la Figure 23 qui montre la corrélation entre l'expression des CTA et l'hypométhylation de l'ADN ainsi que l'hyperacétylation des histones. Ceci montre également l'intérêt des inhibiteurs HDAC et DNMT dans l'expression des CTA.



**Figure 23 : Régulation épigénétique de l'expression des antigènes tumoraux de type testiculaires (CTA).**

D'après Adam R. Karpf, 2006

#### **IV.4.2. Molécules hypométhylantes et expression des antigènes tumoraux**

Diverses études ont démontré la capacité de l'agent hypométhylant 5-azaCdR à induire *de novo* ou à augmenter systématiquement l'expression de CTA dans différents modèles de tumeurs humaines *in vitro* (cultures primaires et lignées de carcinome rénal, mélanome, mésothéliome, gliome humain) (Weber *et al*, 1994 ; De Smet *et al*, 1996 ; Coral *et al*, 2002 ; Sigalotti *et al*, 2002 ; Sigalotti *et al*, 2004 ; Natsume *et al*, 2008), à la fois au niveau de l'ARNm et au niveau protéique. Une approche génomique par puce à ADNc a montré la capacité du 5-azaCdR à activer un large groupe de gènes codant pour des CTA, exclusivement dans les lignées tumorales (Karpf *et al*, 2003).

Une étude réalisée sur un modèle murin de métastases pulmonaires, a également montré que le 5-azaCdR permettait une induction de l'expression de la protéine P1A (équivalent murin des CTA humains) suffisante pour obtenir une reconnaissance et une lyse des cellules tumorales par des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques. Elle montre l'efficacité de la combinaison d'un traitement par le 5-azaCdR et d'une immunothérapie par transfert adoptif sur la réduction du nombre et de la taille des métastases dans ce modèle (Guo *et al*, 2006).

L'activité immunomodulatrice du 5-azaCdR a également été évaluée chez des souris ayant subi des xéno greffes de culture primaire de mélanome : une induction *de novo* ou une augmentation de l'expression de CTA a été constatée, associée à la production de protéines correspondantes fonctionnelles et capables d'induire des réponses humorales spécifiques (Coral *et al*, 2006). L'ensemble de ces études suggère la capacité du 5-azaCdR à générer des populations de cellules tumorales homogènes en termes d'expression des CTA.

La capacité des inhibiteurs HDAC à induire *de novo* ou à augmenter l'expression d'antigènes tumoraux a été peu étudiée en comparaison aux inhibiteurs de DNMT. Cependant, Wischnewski *et al* (2006) ont réalisé une étude sur 15 lignées de diverses tumeurs humaines. Ce travail portait sur la capacité du 5-azaCdR et de la Trichostatine A (TSA, chef de file des inhibiteurs HDAC), seul ou associés à induire l'expression des antigènes MAGE-A1, -A2, -A3 et -A12. Ils ont confirmé la capacité du 5-azaCdR à induire *de novo* ou à augmenter l'expression des antigènes MAGE et surtout, ils ont démontré pour la première fois que la TSA possédait également, dans une moindre mesure, cette propriété. Cependant, cette dernière présente une forte toxicité qui peut limiter son utilisation chez l'homme. C'est pourquoi, il est intéressant de tester d'autres inhibiteurs HDAC chimiquement différents, tel que le VPA.

Le 5-azaCdR et les inhibiteurs HDAC permettent donc de prévenir l'émergence de clones tumoraux CTA négatifs, capables d'échapper à la surveillance immunitaire. Ces deux éléments sont majeurs pour l'optimisation des stratégies d'immunothérapie en développement.

## **V. Choix des antigènes tumoraux étudiés**

Dans le cadre du développement d'une stratégie d'immunothérapie, le choix des antigènes à cibler s'avère capital. En effet, leur immunogénicité, c'est-à-dire leur capacité à générer des réponses cellulaires T cytotoxique et/ou humorale, doit être optimale.

### **V. 1. Les antigènes tumoraux de type testiculaire**

De par leur expression limitée dans les tissus sains (restreinte au placenta et aux cellules germinales mâles), et leur expression dans des tumeurs d'origine histologique variée, les CTA constituent des cibles particulièrement intéressantes pour l'immunothérapie. Parmi eux, NY-ESO-1 (New-York ESO-1), MAGE-1 et MAGE-3 ont montré dans de nombreuses études leur fort potentiel immunogénique et pour chacun d'entre eux, plusieurs épitopes ont déjà été identifiés.

NY-ESO-1 est une protéine cytosolique capable d'induire des réponses immunitaires humorale et à médiation cellulaire de façon simultanée ; les taux d'anticorps sériques anti-NY-ESO-1 varient avec la progression tumorale (Jäger *et al*, 1998 ; 2000). Il est considéré à l'heure actuelle comme le CTA le plus immunogène. De nombreux essais cliniques sont en cours afin d'évaluer l'efficacité des stratégies d'immunothérapie dirigées contre cet antigène (Gnjatic *et al*, 2006). De même, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* attestent de la faisabilité de l'immunothérapie ciblée sur des MAGE. Ces travaux montrent l'activation effective des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de MAGE, capables de reconnaître et de lyser différentes lignées tumorales (Celis *et al*, 1994 ; Mukherjee *et al*, 1995). Ces antigènes de tumeur constituent des cibles de choix pour le développement de stratégies d'immunothérapie.

Enfin, diverses études ont montré la capacité du 5-azaCdR à augmenter l'expression de MAGE-1, MAGE-3 et de NY-ESO-1 dans plusieurs lignées tumorales de carcinome pulmonaire non à petites cellules (Weiser *et al*, 2001) et dans le mésothéliome (Sigalotti *et al*, 2002).

## V.2. La mésothéline et la mucine-1

La mésothéline (MSLN) constitue, quant à elle, un antigène de différenciation de surface exprimé fortement dans les différents types de mésothéliomes (pleural, péritonéal et péricardiques), les cancers ovariens et pancréatiques, et peu dans les cellules mésothéliales non tumorales. De nombreux éléments prouvent son potentiel immunogénique. Ainsi, Ho *et al* (2005) ont montré que la MSLN est associée à une forte réponse humorale de type IgG. Cette observation concernait 53% (26/49) des patients atteints de mésothéliome exprimant la MSLN (par comparaison, 40 à 50% des malades avec des tumeurs exprimant NY-ESO-1 ont des anticorps sériques dirigés contre cet antigène). Dans un modèle murin de cancer ovarien, l'efficacité d'un transfert adoptif de lymphocytes T CD8 spécifiques d'un épitope de la MSLN murine a été démontrée : une diminution de la croissance tumorale et une prolongation de survie ont été observées (Hung *et al*, 2007). Un modèle de souris transgéniques HLA-A2 a montré la capacité d'un vaccin ADN de la MSLN à empêcher le développement de tumeurs chez 60% des souris lors de l'injection de cellules tumorales exprimant la MSLN. Différents épitopes de la MSLN humaine reconnus par des cellules T CD8 ont déjà été identifiés (Yokokawa *et al*, 2005). D'autre part, dans le cancer du pancréas, l'administration d'un vaccin constitué de plusieurs lignées tumorales allogéniques exprimant la MSLN a permis d'induire une réponse T CD8 efficace spécifique de la MSLN, via un mécanisme de présentation croisée (Thomas *et al*, 2004). Ainsi, la MSLN apparaît également comme une cible potentielle de l'immunothérapie, compte-tenu de sa capacité à induire des réponses immunitaires humorales ou à médiation cellulaire.

La mucine-1 (MUC-1 ou CD227) est une glycoprotéine membranaire exprimée par les cellules épithéliales. Elle est surexprimée et glycosylée de façon aberrante dans de nombreux cancers dont le MPM. De nombreux épitopes reconnus par des lymphocytes T CD8 ont été identifiés (Brossart *et al*, 1999). Dans différents types de tumeurs, plusieurs études précliniques et cliniques ont montré la capacité de cet antigène à générer de fortes réponses cellulaires T cytotoxiques. Des essais d'immunothérapie active (Wierecky *et al*, 2006) ou par transfert adoptif (Mukherjee *et al*, 2001) ciblant MUC-1 ont démontré une efficacité thérapeutique. Bien que cet antigène tumoral manque de spécificité tissulaire, ces résultats suggèrent son intérêt dans le développement de stratégies d'immunothérapie.

## **VI. Objectif de l'étude**

Des expériences préliminaires (Dr M. Grégoire, communication personnelle) de RT-PCR ont montré que l'ensemble des lignées de MPM, établies au laboratoire, expriment la mésothéline, que la majeure partie exprime la mucine-1 et qu'aucune d'entre elles n'exprime NY-ESO-1. Les antigènes MAGE-1 et MAGE-3 n'ont pas encore été étudiés. Compte-tenu de leur fort potentiel immunogène et de leur intérêt avéré en immunothérapie, notamment pour les MAGE dans le mélanome, ces antigènes tumoraux pourraient constituer des cibles intéressantes pour le développement de stratégies d'immunothérapie dans le MPM.

Ce travail a donc pour objectif de comparer l'effet de deux molécules hypométhylantes, le 5-azaCR et le 5-azaCdR, sur l'expression de divers antigènes tumoraux (NY-ESO-1, MAGE-3, MUC-1 et MSLN) sur des lignées de MPM établies au laboratoire. L'effet d'un inhibiteur HDAC, le VPA sur l'expression de ces mêmes antigènes sera également étudié, seul ou combiné avec un agent hypométhylant Ce travail s'inscrit dans la poursuite d'une étude amorcée sur la caractérisation d'antigènes tumoraux associés au MPM. Il s'agit d'un travail préliminaire visant à évaluer la capacité de ces molécules à augmenter l'immunogénicité des cellules de MPM, afin de développer des stratégies d'immunothérapie ou de chimio-immunothérapie plus efficaces.

Deuxième partie :  
**partie expérimentale**

# MATERIEL ET METHODES

## I. Patients

Les patients chez lesquels on a diagnostiqué un mésothéliome pleural malin (MPM) épithélioïde n'ont pas reçu de traitement anti-néoplasique avant prélèvement. Les épanchements pleuraux et les biopsies sont collectés par thoracocentèse et le diagnostic du MPM est établi par immunohistochimie selon les recommandations du groupe d'experts MESOPATH ([http://www.splf.org/rmr/pdfNR/Reco\\_SPLF\\_MPM\\_texte\\_court\\_23Jan06.pdf](http://www.splf.org/rmr/pdfNR/Reco_SPLF_MPM_texte_court_23Jan06.pdf)). Ce protocole a été soumis et accepté par le Comité de Protection des Personnes des Pays de La Loire (2003). Les patients ont été informés et ont signé un consentement éclairé.

## II. Lignées cellulaires

Les lignées humaines Méso 11, Méso 13, Méso 34, Méso 47, Méso 56 et Méso 122 (MPM), ont été établies dans le laboratoire d'accueil (INSERM U.892) à partir d'épanchements pleuraux de patients. Les lignées humaines de mélanome M117, M18 et M140 ont été gracieusement fournies par le Pr F. Jotereau (INSERM U892, Nantes). Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (30 minutes à 56 °C), 100 U/ml de pénicilline-0,1 mg/ml de streptomycine et 2 mM de L-Glutamine (Sigma-Aldrich). Elles sont maintenues dans un incubateur à 37 °C, sous atmosphère humide, avec 5% de CO<sub>2</sub>. Une fois à confluence, les cellules sont trypsinées pour être réensemencées à la densité voulue, après comptage sur cellule de Malassez.

## III. Traitement des cellules

### III.1. Préparation des solutions-mères

Les molécules testées, le 5-azaCdR et le VPA (Sigma-Aldrich) sont dissoutes dans du milieu complet puis filtrée stérilement. Les dilutions appropriées sont également préparées stérilement dans du milieu complet.

### III.2. Comparaison de l'efficacité du 5-azacytidine et du 5-aza-2'-désoxycytidine sur l'induction de l'expression d'antigènes tumoraux

Le mode de traitement appliqué est celui défini par Coral *et al* (1999) : une dose toutes les 12 heures pendant 48 heures puis 48 heures supplémentaires de culture (milieu sans agent

hypométhylant). Les cellules des lignées Meso 11 et Meso 13 sontensemencées en flasques T75, à une densité de  $2 \times 10^5$  cellules/mL. Douze heures plus tard, l'adhérence des cellules est vérifiée et les traitements sont initiés. Une première dose est délivrée avec le 5-azacytidine ou le 5-aza-2'-désoxycytidine à  $1 \mu\text{M}$  dans du RPMI complet. Trois autres doses sont ensuite réalisées à 12, 24 et 36. Soixante-douze heures après le début du traitement, les cellules sont replacées dans du milieu complet sans agent hypométhylant et conservées en culture 48 heures supplémentaires. Les contrôles correspondants sont effectués par un traitement équivalent avec du milieu complet sans molécule hypométhylante.

### **III.3. Choix du mode de traitement**

La deuxième étape a consisté à évaluer l'intérêt de réaliser une dose unique de 48 heures plutôt que 4 doses. L'étude a été réalisée sur la lignée cellulaire MeT-5Aensemencée en flasque T75, à une densité de  $1,5 \times 10^5$  cellules/mL. L'ensemencement est plus faible que précédemment car les cellules de cette lignée se multiplient plus rapidement. Douze heures plus tard (cellules adhérentes), le traitement est débuté avec une dose unique ou 4 doses toutes les 12 heures en suivant le protocole ci-dessus.

### **III.4. Test effet-dose du 5-aza-2'-désoxycytidine et de l'acide valproïque**

Les cellules sontensemencées à  $2,5 \times 10^5$  cellules/mL dans chacun des puits d'une plaque de 6 puits. Une fois les cellules adhérentes, le milieu est remplacé par du milieu complet contenant le 5-azaCdR à la concentration voulue (0 - 0,1 - 0,25 - 0,5 - 1 et  $2 \mu\text{M}$ ), ou le VPA à 5 mM. La concentration de ce dernier a été choisie d'après les données de la littérature (Colin *et al*, 2005). Les cellules sont ainsi cultivées pendant 48 heures. A la fin du traitement, les cellules sont conservées en culture pour 48 heures supplémentaires dans du milieu exempt de la molécule testée. Les cellules sont systématiquement dénombrées. La viabilité cellulaire est étudiée sur un aliquot de cellules pour chaque lignée et chaque concentration de 5-azaCdR testées et celle du VPA. Environ  $5 \times 10^4$  cellules pour chaque condition sont reprises dans  $100 \mu\text{L}$  de tampon phosphate (PBS) puis diluées au demi dans une solution de TO-PRO-3-iodide (Invitrogen) à  $1 \mu\text{M}$  et analysées immédiatement par cytométrie en flux (FacsCalibur, BD Biosciences), avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences). L'analyse des données est réalisée avec le logiciel FlowJo (Tree Star inc.). Les cellules viables n'incluent pas la TO-PRO-3.

## IV. Extraction des ARN totaux

Après trypsination, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS puis centrifugées. Les culots de cellules dont l'ARN n'est pas extrait extemporanément sont resuspendus dans du RNAlater (Ambion) et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'ARN total est extrait avec le RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Les ARN élués sont dosés par mesure de la densité optique à 230, 260 et 280 nm (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Les ARN utilisés doivent présenter un rapport 260/280 compris entre 1,8 et 2 et un rapport 260/230  $> 2$ , attestant de la pureté de l'échantillon. Dans le cas contraire, les échantillons sont précipités en ajoutant un dixième de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et un volume d'éthanol, à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une heure minimum. Ensuite, l'ARN est lavé à l'éthanol 70% puis repris dans de l'eau stérile. Enfin les échantillons sont dosés de nouveau par spectrophotométrie (NanoDrop 1000).

L'intégrité des ARN est vérifiée par la technologie *Lab-on-a-chip* d'Agilent Technologies (Total RNA 6000 Nano Series II), selon les instructions du fournisseur. En bref, les ARN sont séparés, en fonction de leur taille, sur un gel soumis à un courant de haut voltage. Au moment de leur passage dans le gel, les ARN se lient à un intercalant spécifique de l'ARN et fluorescent, préalablement introduit dans le gel. L'appareil mesure, en temps réel, l'intensité de la fluorescence émise en fonction du temps de rétention de l'échantillon au sein du microréseau. Ces données qualitatives (temps de rétention) et quantitatives (intensité de fluorescence) sont validées par rapport à un marqueur de poids moléculaire connu par le logiciel (2100 Expert). La qualité des échantillons est évaluée en fonction de l'intégrité des ARN ribosomiaux. La valeur optimale du ratio des pics d'intensité de fluorescence 28S/18S est de 2. Le logiciel fournit également un autre critère de qualité, le *RNA Integrity Number* (RIN), qui intègre l'ensemble du profil de séparation des ARN, et pas uniquement le ratio des pics ribosomiaux. Un RIN de 10 correspondant à un ARN de qualité parfaite.

## V. Traitement à la DNase et transcription inverse (RT)

Un traitement à la DNase I (Invitrogen) est effectué selon les instructions du fournisseur, afin d'éviter toute amplification ultérieure d'ADN génomique. La transcription inverse est réalisée sur 1  $\mu\text{g}$  d'ARN total traité à la DNase dans un volume réactionnel de 20  $\mu\text{l}$ . 1  $\mu\text{g}$  d'ARN total, 1  $\mu\text{l}$  d'amorces oligodT12-18 50  $\mu\text{M}$  (Invitrogen) et 1  $\mu\text{l}$  d'un mélange de dNTPs 10 mM chacun (Invitrogen) sont dénaturés 5 minutes à  $65^{\circ}\text{C}$ . La RT est réalisée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 50 minutes après ajout de 200 U de Transcriptase Inverse (M-MLV RT) (Invitrogen), 4  $\mu\text{l}$  de son tampon 5X, 2  $\mu\text{l}$  de dithiothréitol (DTT) 0,1 M (Invitrogen) et 40 U de RNase OUT

(Invitrogen). La réaction est arrêtée par 15 minutes de chauffage à 70°C et les ADNc sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

## VI. Réaction d'amplification génique (PCR)

Les amplifications sont réalisées sur 5% du produit de la RT (équivalent à 50 ng d'ARN total) ou 10 ng de plasmide NY-ESO-1 (témoin positif). Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume réactionnel de 25 µL contenant 2,5 µL de tampon 10X (Promega), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 800 nM d'un mélange de dNTP, 25 pmol d'amorce sens, 25 pmol d'amorce antisens (Sigma) (Tableau IV) et 1,25 U de Taq DNA polymérase (Promega). Le programme de température est réalisé dans un thermocycleur (Peltier, PTC 100). Pour *MSLN* (mésothéline), *MUC-1* (Mucine-1) et *NY-ESO-1*, les cycles suivants sont réalisés : 2 minutes de dénaturation à 94 °C puis 30 secondes à 94 °C, 30 secondes à la température d'hybridation appropriée (Tableau IV), 30 secondes à 72 °C (22, 24 ou 35 cycles respectivement). Une étape d'élongation finale est réalisée à 72 °C pendant 5 minutes. Pour *MAGE-1*, les cycles sont les suivants : 3 minutes de dénaturation à 94 °C puis 1 minute à 94 °C, 1 minute à 62 °C et 2 minutes à 72 °C (35 cycles), suivies de 5 minutes d'élongation finale à 72 °C ; pour *MAGE-3*, 2 minutes de dénaturation à 94 °C puis 1 minute à 94 °C et 3 minutes à 72 °C (35 cycles) suivies de 5 minutes d'élongation finale à 72 °C. L'amplification du gène de ménage β-actine est réalisée dans les mêmes conditions que celle du gène étudié. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% contenant 0,05 µg/mL de bromure d'éthidium (Merk). On dépose dans chaque puits 10 µL d'échantillon et 2 µL de tampon de charge 6X (Invitrogen). Les fragments amplifiés sont visualisés sous lumière UV. Toutes les réactions de PCR présentées ont été réalisées deux fois.

Gène	Amorce	Séquence	Température d'hybridation T <sub>m</sub>	Taille du fragment amplifié
<i>β-actine</i>	sens	ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC A	70°C	825 pb
	antisens	CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA T		
<i>MSLN</i>	sens	AAC GGC TAC CTG GTC CTA G	55°C	226 pb
	antisens	TTT ACT GAG CGC GAG TTC TC		
<i>MUC-1</i>	sens	TGA TGT GCC ATT TCC TTT CTC	55°C	342 pb
	antisens	TAC AAG TTG GCA GAA GTG GCT		
<i>NY-ESO-1</i>	sens	ATG GAT GCT GCA GAT GCG G	62°C	329 pb
	antisens	GGC TTA GCG CCT CTG CCC TG		
<i>MAGE-1</i>	sens (CHO14)	CGG CCG AAG GAA GGA ACC TGA C	62°C	421 pb
	antisens(CHO1)	GCT GGA ACC CTC ACT GGG		
<i>MAGE-3</i>	sens	TGG AGG ACC AGA GGC CCC C	72°C	725 pb
	antisens	GGA CGA TTA TCA GGA GGC CTG C		

**Tableau IV : Séquence, température d'hybridation et taille des fragments amplifiés pour les différentes paires d'amorces utilisées en PCR.**

## VII. PCR en temps-réel

La méthode réalisée pour la quantification de l'induction d'expression des antigènes sélectionnés est la PCR temps-réel utilisant la technologie « SYBR-Green™ ». Les réactions de qPCR sont réalisées dans des plaques de 96 puits compatibles avec le thermocycleur Mx4000® (Stratagene), dans un volume réactionnel final de 25 µl avec 12,5 µl de RT<sup>2</sup> Real-Time SYBRGreen/ROX PCR Mastermix (Superarray), 2,5 µl d'amorces 10X QuantiTect Primer Assays (Qiagen), 5 µl d'eau et 5 µl d'échantillon d'ADNc. Le fluorochrome carboxy-X-rhodamine (ROX) présent dans le mélange est un standard interne qui permet de corriger les variations de volume introduit dans les puits et de normaliser la fluorescence due au « SYBR-Green™ ».

Pour chaque transcrit étudié, une courbe standard est établie sur une gamme de dilutions en série, réalisée sur un mélange des échantillons étudiés. Sur cette même gamme est établie une courbe standard pour le gène de référence (RPLPO, codant pour une protéine ribosomale) qui permet de normaliser les quantités d'ADNc introduites. Le programme de température utilisé, réalisé dans un thermocycleur pour PCR quantitative Mx4000® multiplex, est le suivant : activation de l'enzyme/dénaturation initiale (10 minutes à 95 °C), puis 40 cycles d'amplification (30 secondes à 95 °C pour la dénaturation puis 1 minute à 60 °C pour l'hybridation et l'élongation) et enfin établissement de la courbe de dissociation (70 cycles de 30 secondes avec une augmentation progressive de la température de 0,5 °C par cycle).

Le cycle seuil "Ct" est défini comme le cycle à partir duquel la fluorescence est significativement supérieure au bruit de fond. Ce seuil est défini avec le logiciel Mx4000® v.4.2 (Stratagene). Les variations d'expression sont ensuite calculées avec la formule de Pfaffl (2001) :

$$R = [E_{\text{cible}} \Delta Ct_{\text{cible}} (\text{témoin} - \text{traité})] / [E_{\text{ref}} \Delta Ct_{\text{ref}} (\text{témoin} - \text{traité})]$$

- E cible est l'efficacité de la PCR en temps-réel pour le transcrit du gène étudié ; E ref correspond à l'efficacité pour le gène de référence. E est calculée selon la formule suivante :  $E = 10^{-1/\text{pente}}$  (pente de la courbe-standard).
- $\Delta Ct$  cible représente la différence de Ct entre le témoin et l'échantillon traité pour le transcrit du gène étudié ;  $\Delta Ct$  ref représente la différence de Ct entre le témoin et l'échantillon traité pour le transcrit du gène de référence.

## **VIII. Etude de la persistance d'expression des gènes induits par le traitement au 5-azaCdR**

Les lignées MeT-5A, Meso 11 et Meso 13 sont traitées selon les modalités définies à l'issue des tests préliminaires (48 heures de traitement avec le 5-azaCdR à 0,5  $\mu$ M) puis conservées en culture afin d'évaluer la capacité du traitement à induire une expression prolongée des antigènes tumoraux considérés. L'expression de *NY-ESO-1* a été analysée par PCR quantitative en temps réel, 2 jours, 14 jours et 28 jours après l'arrêt du traitement.

## **IX. Fixation de l'anticorps anti-NY-ESO-1**

Cette étude est réalisée sur les lignées de mélanome M117, M18 et M140 qui expriment à l'état basal la protéine NY-ESO-1. Après trypsination des cellules, celles-ci sont fixées avec du paraformaldehyde (PFA) 4% pendant 15 minutes à température ambiante. Cent mille cellules par puits sont ensuiteensemencées sur une plaque de 96 puits à fond conique et centrifugées 1 minute à 2000 rpm. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS/0.1% BSA/0.1% saponine, afin de perméabiliser la membrane. Puis on introduit l'anticorps primaire anti NY-ESO-1 à 2,5 ; 5 et 10  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich). La plaque est incubée 30 minutes à température ambiante, sous agitation. Après deux lavages avec du PBS/0.1% BSA/0.1% saponine, on introduit l'anticorps secondaire anti IgG1 de souris (Sigma-Aldrich) dilué au 1/100<sup>ième</sup>. La plaque est incubée 30 minutes à température ambiante, sous agitation. Après deux lavages, les cellules sont analysées au cytomètre (FacsCalibur, BD Biosciences), avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences).

## **X. Activation de la réponse immunitaire.**

### **X.I. Etude de la réponse immunitaire après traitement des cellules avec 5-azaCdR ou VPA**

Les cellules des lignées Méso 47 (HLA\*A2) sontensemencées à  $2 \times 10^5$  cellules dans chacun des puits d'une plaque de 6 puits. Après 48 heures, le milieu de culture est remplacé par du milieu complet contenant soit du 5-azaCdR 0,5  $\mu$ M, soit du VPA 5 mM. Les cellules sont ainsi cultivées pendant 48 heures. Ensuite,  $10^5$  cellules sont déposées dans deux plaques de 96 puits à fond V. Les cellules de l'une sont chargées en peptide à 10  $\mu$ M suivi d'1 heure d'incubation à 37 °C. Les cellules sont lavées 3 fois avec du RPMI. La répartition des clones T CD8 (HLA\*A2) spécifiques de NY-ESO-1 se fait selon le rapport E/T : 50.000/100.000 (E : clone M117.32 ; T : cellules tumorales) dans un volume de 200  $\mu$ l de RPMI par puits. On rajoute également de la BrefeldinA (Sigma-Aldrich) à 10  $\mu$ g/ml qui va empêcher le relargage des cytokines dont l'IFN- $\gamma$

dans le milieu de culture. A la fin de la répartition des cellules, une centrifugation rapide permet de mettre en contact les cellules. Les cellules sont incubées 5 heures à 37 °C. Ensuite, on réalise le marquage anti-CD8 APC (BD Pharmingen) dilué au 1/30<sup>ième</sup> dans du PBS/0,1% BSA. Après l'incubation de 30 mn à 4°C, on fixe avec PBS/4% PFA pendant 10 mn à température ambiante. Puis, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS. Enfin, on réalise le marquage anti-IFN- $\gamma$  PE (BD Pharmingen) dilué au 1/50<sup>ième</sup> dans du PBS/0,1% BSA/0,1% Saponine. Après 30 mn d'incubation à température ambiante et deux lavages avec du PBS, les cellules sont analysées au cytomètre (FacsCalibur, BD Biosciences), avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences).

## **X.II. Traitement des cellules avec 5-azaCdR et VPA**

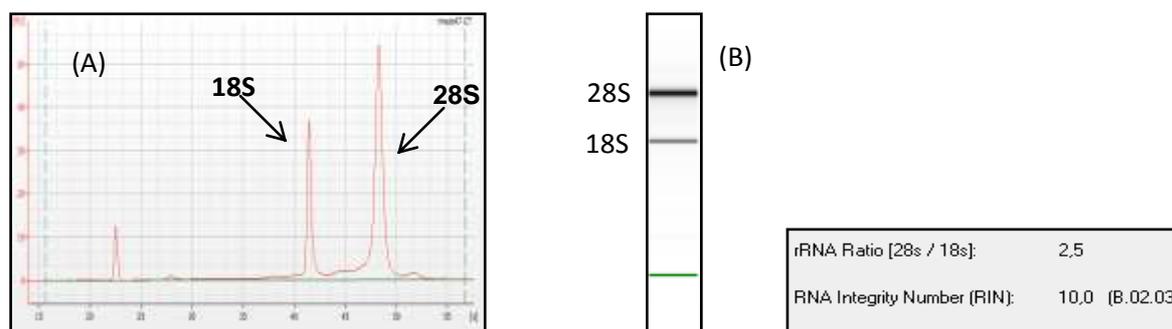
Cette étude a été réalisée sur une lignée de mélanome (M117) qui sert de témoin positif, une lignée de cellules non tumorales immortalisées (Met-5A), une lignée de mésothéliome non HLA\*A2 (Més0 13), et 4 lignées de mésothéliome HLA\*A2 (Més0 34, Més0 47, Més0 56 et Més0 122). Le principe de cette expérience est le même que précédemment, seul change le mode de traitement des cellules. En effet, en accord avec la littérature (Wischnewski *et al*, 2006) nous avons choisi d'utiliser un traitement séquentiel. C'est-à-dire que dans un premier temps, les cellules sont incubées en présence du 5-azaCdR puis du VPA.

Ainsi, les cellules des différentes lignées sontensemencées à  $2 \times 10^5$  cellules dans chacun des puits d'une plaque de 6 puits. Après 48 heures, le milieu de culture est remplacé par du milieu complet contenant 0,5  $\mu$ M de 5-azaCdR. Les cellules sont alors cultivées pendant 48 heures supplémentaires. Le milieu contenant le 5-azaCdR est remplacé par du milieu complet contenant 5 mM de VPA. Les cellules sont cultivées pendant 48 heures supplémentaires avant d'être transférées dans des puits d'une plaque de 96 puits à fond en V. La suite de la manipulation est strictement identique à celle réalisée précédemment (cf. X.I)

# RESULTATS

## I. Vérification de l'intégrité des ARN

L'intégrité de l'ensemble des ARN extraits est systématiquement vérifiée par la méthode des puces Agilent. La Figure 24 présente le profil de séparation caractéristique obtenu pour l'échantillon témoin Més0 47. Ce profil correspond à un ARN de très bonne qualité (rapport 28S/18S = 2,5 et RIN = 10) et est caractéristique des profils obtenus pour l'ensemble des échantillons.

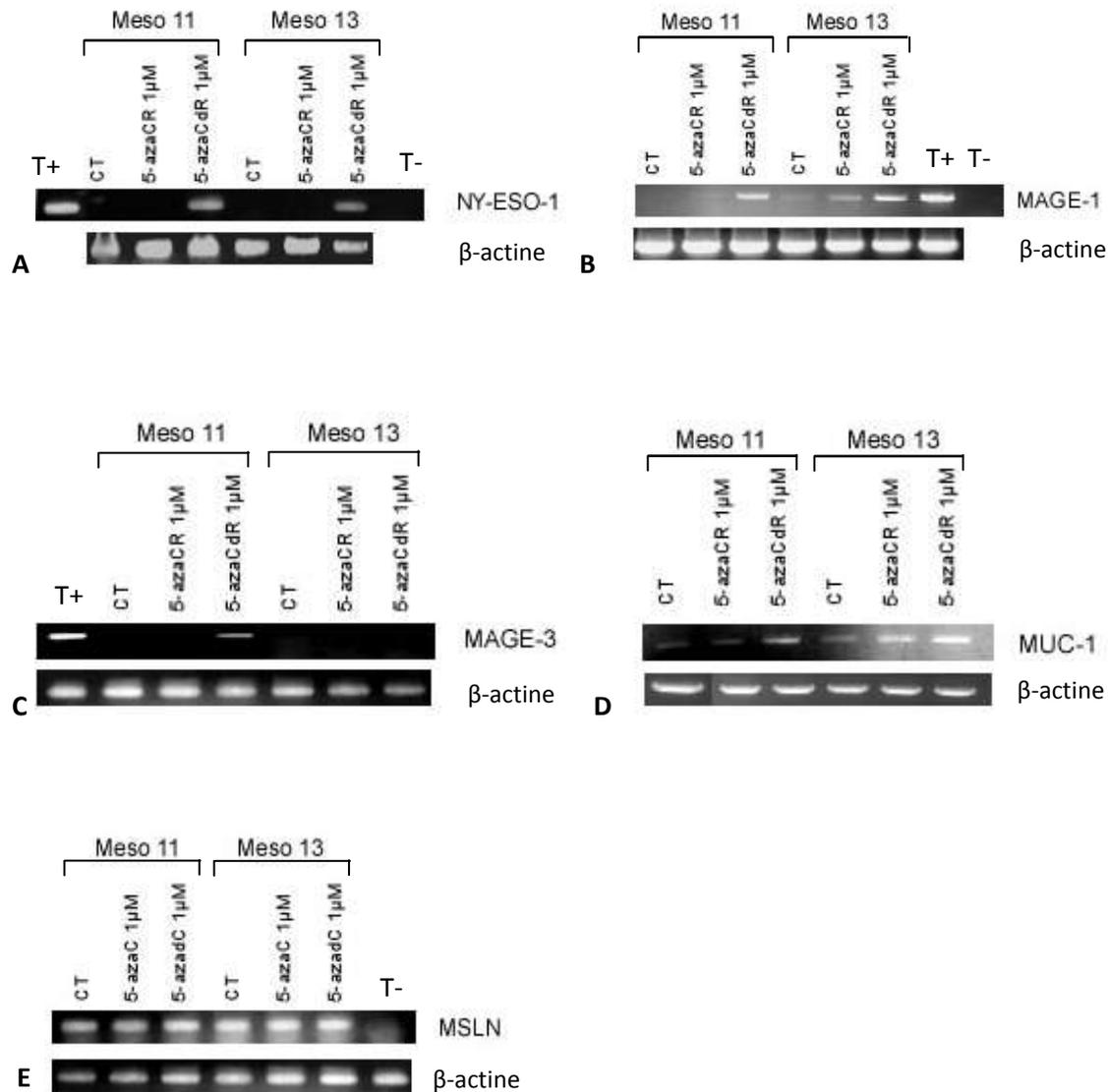


**Figure 24 : (A) Electrophorégramme obtenu par la méthode des puces Agilent, (B) Gel de migration correspondant**

La migration d'un échantillon d'ARN total est réalisée sur un gel comprenant un agent intercalant fluorescent spécifique de l'ARN, déposé sur une puce.

## II. Comparaison de l'efficacité du 5-azaCR et du 5-azaCdR sur l'induction de l'expression d'antigènes tumoraux (CTA et antigènes de différenciation)

Cette étude par RT-PCR montre l'efficacité supérieure du 5-azaCdR en termes d'induction d'expression de différents antigènes tumoraux dans deux lignées de MPM établies au laboratoire à partir de liquides pleuraux de malades (Meso 11 et Meso 13). Le traitement réalisé consistait en 4 doses de 5-azaCdR ou de 5-azaCR à 1  $\mu$ M sur 48 heures suivies de 48 heures de culture en l'absence d'agent hypométhylant. Ainsi, pour des antigènes de tumeur dont l'expression est faible ou indétectable à l'état basal dans le MPM, le 5-azaCdR est plus efficace en termes d'induction de l'expression de *NY-ESO-1*, *MAGE-1*, *MAGE-3* et *MUC-1* que le 5-azaCR, à concentrations égales. En ce qui concerne la *MSLN*, fortement exprimée à l'état basal dans les lignées de MPM étudiées, l'effet du 5-azaCdR est moins évident (Fig. 25, page 83).



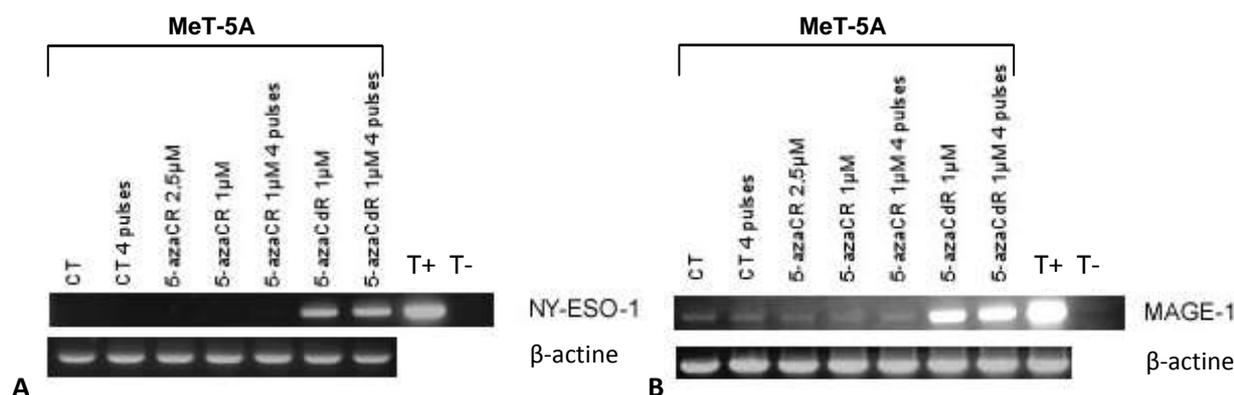
**Figure 25 : Electrophorégramme des produits de PCR (A : *MSLN*, B : *MUC-1*, C : *NY-ESO-1*, D : *MAGE-1* et E : *MAGE-3*) après traitement avec le 5-azaCR ou le 5-azaCdR.**

A- Témoin positif (T+) : plasmide NY-ESO-1 ; B – T- : lignée de mélanome DAGI ; C – T+ : lignée de mélanome M17. Un témoin négatif sans ADNc est systématiquement réalisé. 35 cycles d'amplification sont réalisés pour NY-ESO-1, MAGE-1 et 3, 24 cycles pour MUC-1 et 22 pour MSLN.

### III. Choix du mode de traitement

Le 5-azaCdR et le 5-azaCR étant instables en milieu aqueux (Notari *et al*, 1975 ; Lin *et al*, 1981), des tests ont été effectués afin d'évaluer l'intérêt de réaliser plusieurs doses de traitement (Coral *et al*, 1999) plutôt qu'une seule. L'étude par RT-PCR de l'expression de *NY-ESO-1* et de *MAGE-1* dans la lignée MeT-5A a montré que la réalisation de 4 doses de traitement sur 48 heures plutôt qu'une seule n'améliore pas l'efficacité du 5-azaCdR, ni celle du 5-azaCR (Fig.

26). C'est pourquoi les traitements réalisés par la suite ont consisté en 48 heures de traitement par le 5-azaCdR suivies par 48 heures supplémentaires de culture en l'absence de la molécule (afin d'avoir un nombre de divisions cellulaires suffisant pour atteindre une réduction marquée de l'activité enzymatique DNA Méthyltransférase 1). Il est important de noter que nous avons utilisé le même mode de traitement avec le VPA.



**Figure 26 : Electrophorogramme des produits de PCR (A : *NY-ESO-1* et B : *MAGE-1*) après traitement en une ou quatre doses de 5-azaCR ou de 5-azaCdR**

A – Témoin positif (T+) : plasmide NY-ESO-1 ; B – T négatif (T-) : lignée de mélanome DAGI. Un témoin négatif sans ADNc est systématiquement réalisé

## IV. Test effet-dose du 5-azaCdR et de l'acide valproïque

### IV.1. Etude de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules des différentes lignées traitées aux différentes concentrations de 5-azaCdR et de VPA est évaluée par un test à la TO-PRO-3, réalisé immédiatement ou 48 heures après la fin du traitement. Quelle que soit la dose utilisée, le 5-azaCdR ne semble pas avoir d'effet notable sur la viabilité des cellules des lignées étudiées. (Tableau V, page 85) contrairement au VPA. En effet, la viabilité des cellules, 48 heures après traitement avec du VPA à 5 mM, est d'environ 70% pour les 6 lignées examinées.

		Témoin non traité	5-azaCdR					VPA
Lignées	Condition		0,1 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M	5 mM
MeT-5A	T48h	100	97	98	96	95	97	71
	T48 + 48h	100	98	99	100	96	98	73
Mésos 13	T48h	100	96	97	98	95	97	69
	T48 + 48h	100	99	98	99	96	98	71
Meso 34	T48h	100	92	94	93	95	96	68
	T48 + 48h	100	93	94	95	96	93	72
Meso 47	T48h	100	92	94	95	92	94	71
	T48 + 48h	100	94	95	96	94	93	73
Meso 56	T48h	100	97	98	96	95	97	67
	T48 + 48h	100	98	99	100	96	98	69
Meso 122	T48h	100	91	92	94	91	93	67
	T48 + 48h	100	93	95	94	96	92	69

**Tableau V : Test effet-dose du 5-azaCdR et du VPA sur la viabilité de différentes lignées cellulaires tumorales**

La viabilité (exprimée en pourcentage) a été étudiée par cytométrie en flux, au bout de 48 heures de traitement (T48h) et 48 heures plus tard (T48 + 48h), par un test à la TO-PRO-3 (les cellules vivantes sont TO-PRO-3 négatives). Ces valeurs sont des moyennes de trois essais.

## IV.2. Etude de la prolifération cellulaire

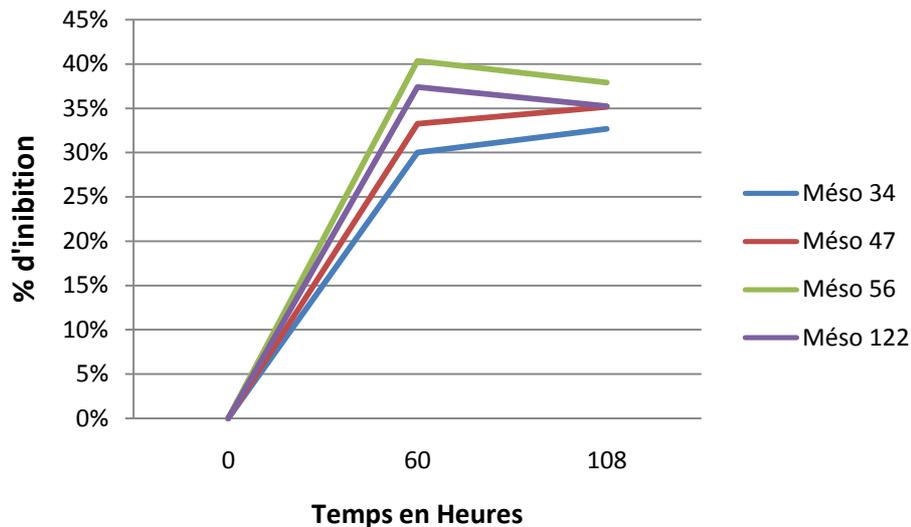
En parallèle, les cellules sont dénombrées sur une chambre de Malassez en présence de bleu de Trypan afin d'évaluer l'effet du traitement sur la prolifération cellulaire.

### IV.2.1. Effets du 5-azaCdR

Seule la lignée Mésos 47 semble présenter un ralentissement de la prolifération dès la dose de 0,1  $\mu$ M, par rapport aux témoins non traités. Concernant les autres lignées de mésothéliome testées (Mésos 13, Mésos 34, Mésos 56 et Mésos 122), le 5-azaCdR ne semble pas ralentir la prolifération cellulaire quelle que soit la dose utilisée (données non présentées).

### IV.2.2. Effets du VPA

Quelles que soient les lignées examinées, le VPA à 5 mM ralentit la prolifération cellulaire. En effet, le pourcentage d'inhibition de la prolifération 60 heures après traitement avec 5 mM de VPA varie entre 30% et 40% selon la lignée tumorale. Ensuite, ce pourcentage ne varie que faiblement puisque 108 heures après traitement, le pourcentage d'inhibition oscille entre 38% et 33% (Fig. 27).



**Figure 27 : Pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire des lignées Mésos 34, 47, 56 et 122, après traitement avec 5 mM de VPA**

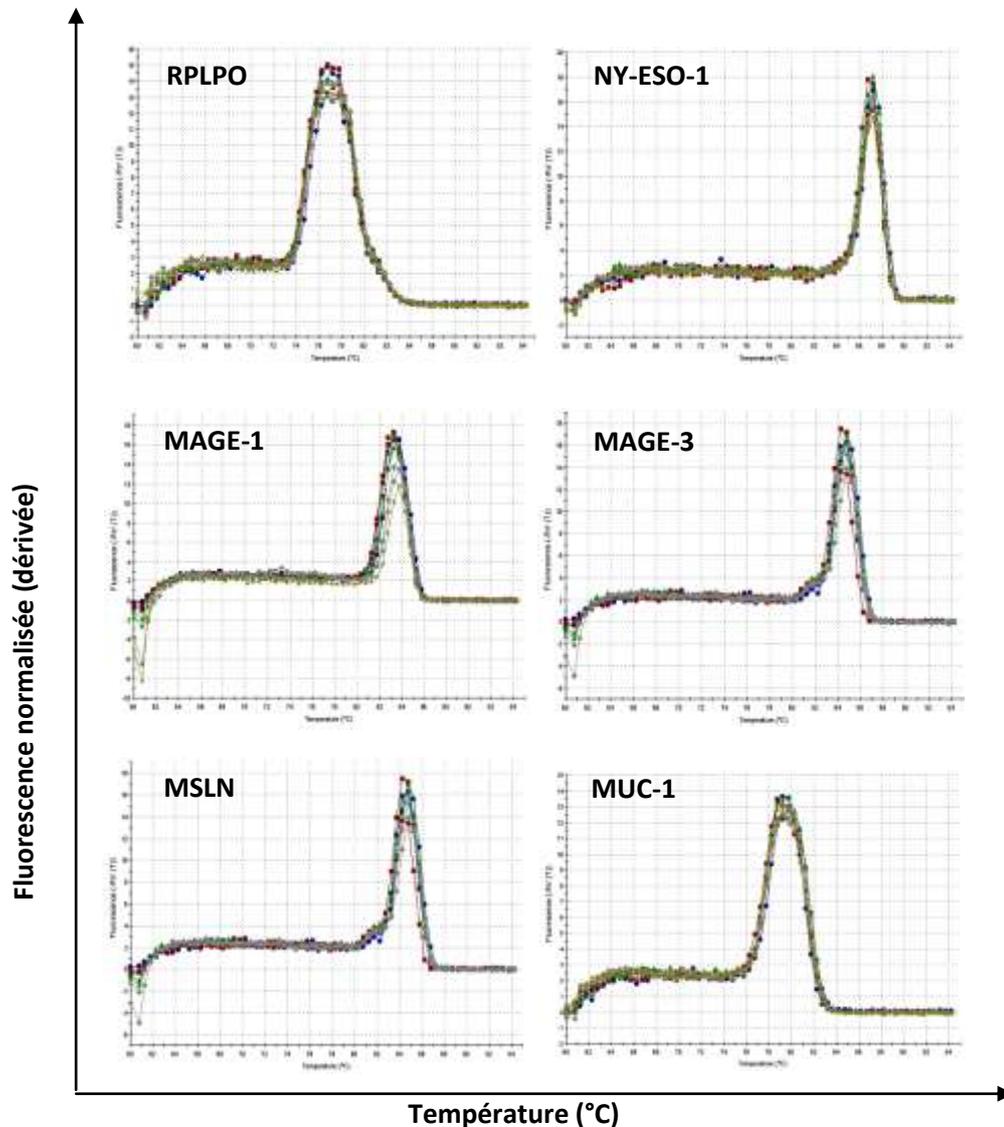
Les cellules sont traitées avec du VPA 5 mM et dénombrées sur cellule de Malassez en présence de bleu de Trypan. Cette étude a été réalisée qu'une fois.

## V. PCR quantitative en temps réel

### V.1. Mise au point de la qPCR

La première étape a consisté à vérifier la qualité des paramètres de la qPCR : intensité de fluorescence correcte, absence de formation de dimères d'amorces et spécificité d'amplification, efficacité de la qPCR. La courbe de dissociation établie à la fin des 40 cycles d'amplification permet de vérifier la qualité des amorces utilisées. Comme le montre la Figure 28 (page 87), qui présente la dérivée de la fluorescence normalisée en fonction de la température, on observe pour chaque couple d'amorces considéré un seul pic pour une température donnée (correspondant à la taille de l'amplicon). Ce profil atteste de la spécificité des amorces et de l'absence de dimères d'amorces dans les conditions utilisées. L'efficacité de la qPCR est calculée par le logiciel Stratagene MX4000, à partir de la courbe standard. Idéalement, elle doit être comprise entre 90

et 110%. Les efficacités de qPCR obtenues avec *RPLPO*, *NY-ESO-1*, *MAGE-3*, *MUC-1* et *MSLN* sont optimales (respectivement 103,7% ; 93% ; 95% ; 97%, 91,5%).



**Figure 28 : Courbes de dissociation pour les différents transcrits étudiés en qPCR « SYBR-Green ».**

A la fin des cycles d'amplification de la qPCR, une augmentation progressive de température (0,5°C par cycle de 30 secondes) est réalisée afin d'établir la courbe de dissociation. Elle permet de vérifier la spécificité de l'amplification et l'absence de dimères d'amorces.

## V.2. Induction de l'expression du transcrit *NY-ESO-1*

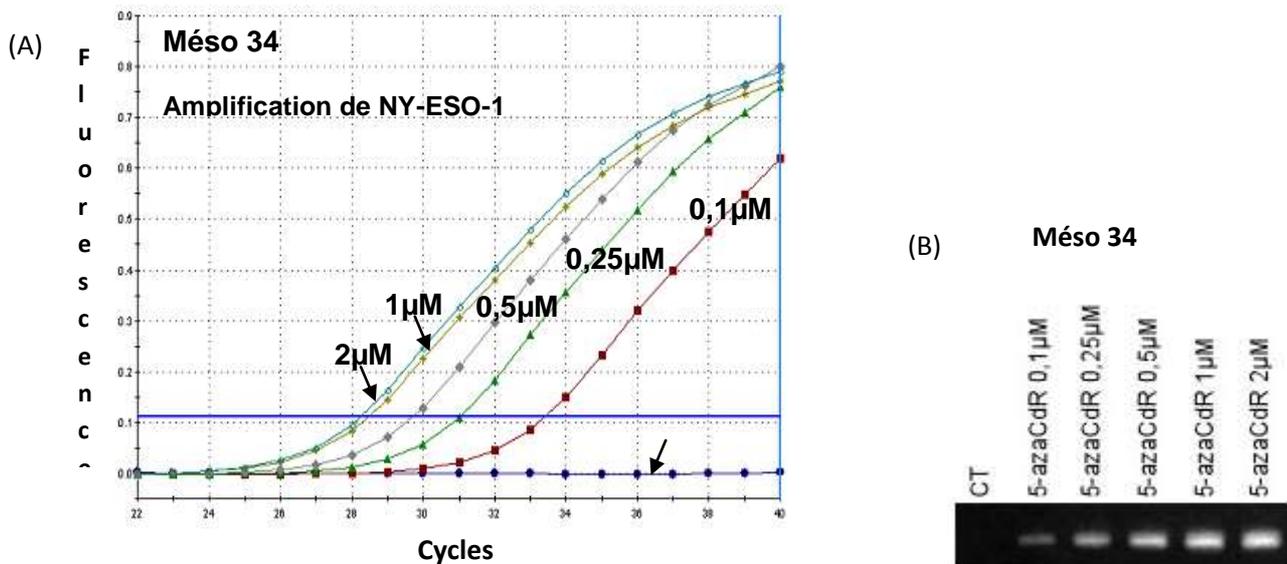
Un test effet-dose est réalisé afin de déterminer la dose de 5-azaCdR efficace susceptible d'induire l'expression d'antigènes tumoraux. Pour cela, l'expression de *NY-ESO-1* est étudiée par qPCR, sur 4 lignées de MPM (Mésos 34, Mésos 47, Mésos 56, Mésos 122), une lignée non

tumorale de cellules mésothéliales (MeT-5A) et une lignée d'adénocarcinome pulmonaire (ADK 3), à la suite d'un traitement de 48 heures par 5 doses croissantes de 5-azaCdR (0,1 - 0,25 - 05 - 1 et 2  $\mu\text{M}$ ). L'absence d'expression de *NY-ESO-1* par les cellules non traitées rend impossible la définition d'un cycle-seuil pour les conditions témoins, comme le montre la Figure 29 (résultats obtenus avec la lignée Més0 34). La quantification de l'induction d'expression de *NY-ESO-1* par rapport aux témoins non traités n'est donc pas réalisable. Une comparaison du niveau d'expression de *NY-ESO-1* a été réalisée après normalisation par rapport au *RPLPO* (gène de référence). Le ratio calculé correspond au nombre de copies de *NY-ESO-1* sur le nombre de copies de *RPLPO* (estimé par rapport à la courbe standard), pour chaque condition (Fig. 30, page 89).

Les différentes lignées, quelle que soit leur type (lignée mésothéliale immortalisée, mésothéliome et adénocarcinome), répondent au traitement mais elles se divisent en deux groupes distincts en fonction de leur sensibilité au 5-azaCdR (Fig. 28, page suivante) :

- ✚ Pour les lignées ADK 3, Més0 34 et Més0 122, le niveau d'expression maximal de *NY-ESO-1* est atteint pour des concentrations inférieures à 2  $\mu\text{M}$  (respectivement 0,25 ; 0,5 et 1  $\mu\text{M}$ ).
- ✚ Les lignées MeT-5A, Meso 47 et 56 sont plus sensibles à l'augmentation des doses de 5-azaCdR.

Ainsi, au vu de ces résultats, la concentration choisie pour le 5-azaCdR est de 0,5  $\mu\text{M}$ , concentration qui permet d'obtenir une augmentation de l'expression des transcrits étudiés sans altérer la viabilité, ni la prolifération cellulaire.

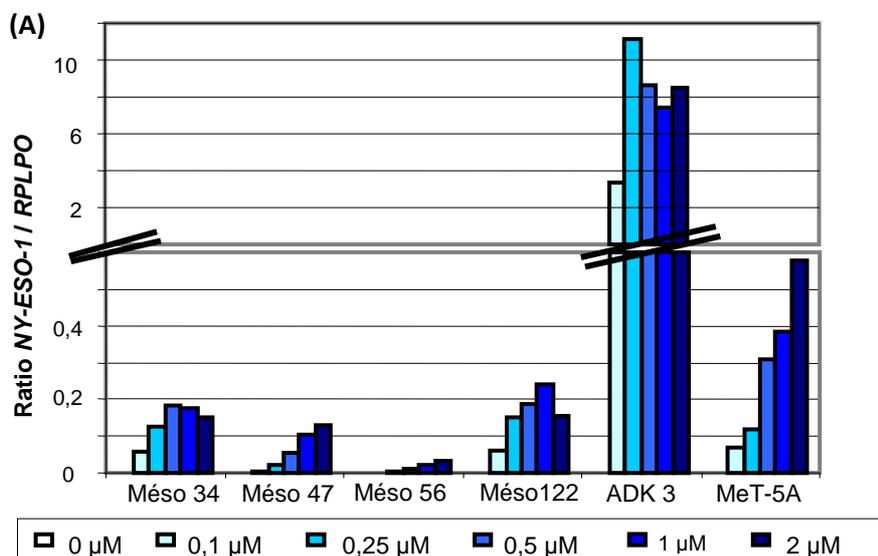


**Figure 29 : Test effet-dose**

**A- Courbes d'amplification de NY-ESO-1** obtenues par qPCR SYBR-Green pour des doses croissantes de 5-azaCdR sur la lignée Méso 34.

En ordonnée, la fluorescence est normalisée par rapport au standard interne ROX. La fluorescence obtenue pour les concentrations 1 et 2  $\mu\text{M}$  dépasse le bruit de fond à un cycle-seuil plus précoce que les autres concentrations. Cela traduit la présence dans l'échantillon d'une quantité de transcrits plus importante et donc une efficacité supérieure du traitement.

**B- Electrophorégramme des produits de la qPCR (NY-ESO-1).**



(B)

Cycles-seuil Ct	0 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$
Meso 34	ND	28,84
Meso 47	ND	32,81
Meso 56	ND	36,39
Meso 122	ND	28,64
ADK 3	ND	21,41
MeT-5A	ND	29,07

**Figure 30 : Variation de l'expression du transcrit NY-ESO-1 pour différentes lignées cellulaires, en fonction de la concentration en 5-azaCdR**

(A) Aucune des lignées testées n'exprime NY-ESO-1 de façon constitutive. Les barres d'histogramme représentent l'expression relative du transcrit NY-ESO-1 par rapport au transcrit RPLPO (pris comme référence car son expression n'est pas modifiée par le traitement) pour chacune des concentrations testées (0 - 0,1 - 0,25 - 0,5 - 1 et 2  $\mu\text{M}$ ). Le ratio a été établi à partir du nombre de copies de chaque cible (NY-ESO-1 et RPLPO), extrapolé à partir de la courbe standard.

(B) La détermination du cycle-seuil est impossible pour les lignées non traitées (ND : non déterminé). Le niveau d'expression de NY-ESO-1 pour les cellules traitées à 0,1 $\mu\text{M}$  de 5-azaCdR est variable (élevé pour ADK 3, moyen pour MeT-5A, Méso 34 et 122, et faible pour Méso 47 et 56). Le niveau d'expression de RPLPO est équivalent pour les différentes lignées (Ct proche de 18).

## VI. Induction de l'expression de différents antigènes de tumeur par le 5-azaCdR et le VPA.

L'expression du gène de référence choisi, *RPLPO*, n'est pas modifiée par le traitement au 5-azaCdR ou au VPA ; il a donc été conservé pour l'ensemble des expériences de qPCR réalisées. Dans toutes les lignées traitées, le 5-azaCdR induit systématiquement l'expression des CTA étudiés lorsque ceux-ci ne sont pas exprimés constitutivement (*NY-ESO-1*, *MAGE-1* et *MAGE-3*) (Tableau VI).

Transcrit étudié	<i>RPLPO</i>			<i>MUC-1</i>			<i>MSLN</i>		
	CT	5-azaCdR 0,5 µM	VPA 5 mM	CT	5-azaCdR 0,5 µM	VPA 5 mM	CT	5-azaCdR 0,5 µM	VPA 5 mM
Méso 13	+++	+++ (1)	+++ (1)	+++	+++ (1,12)	++ (0,8)	++	++ (1,12)	++ (0,98)
Méso 34	+++	+++ (1)	+++ (1)	+++	+++ (1,1)	++ (0,9)	+++	+++ (0,95)	+++ (0,96)
Méso 47	+++	+++ (1)	+++ (1)	+++	++ (0,8)	++ (0,7)	++	++ (1)	++ (0,95)
Méso 56	+++	+++ (1)	+++ (1)	++	++ (1,1)	+ (0,8)	++	++ (1,05)	++ (1,02)
Méso 122	+++	+++ (1)	+++ (1)	++	+++ (1,2)	++ (0,9)	++	++ (1,08)	++ (1,01)
MeT-5A	+++	+++ (1)	+++ (1)	++	++ (1,24)	++ (1)	+	+	+
ADK 3	+++	+++ (1)	+++ (1)	++	++ (1,03)	++ (0,9)	+	+	+

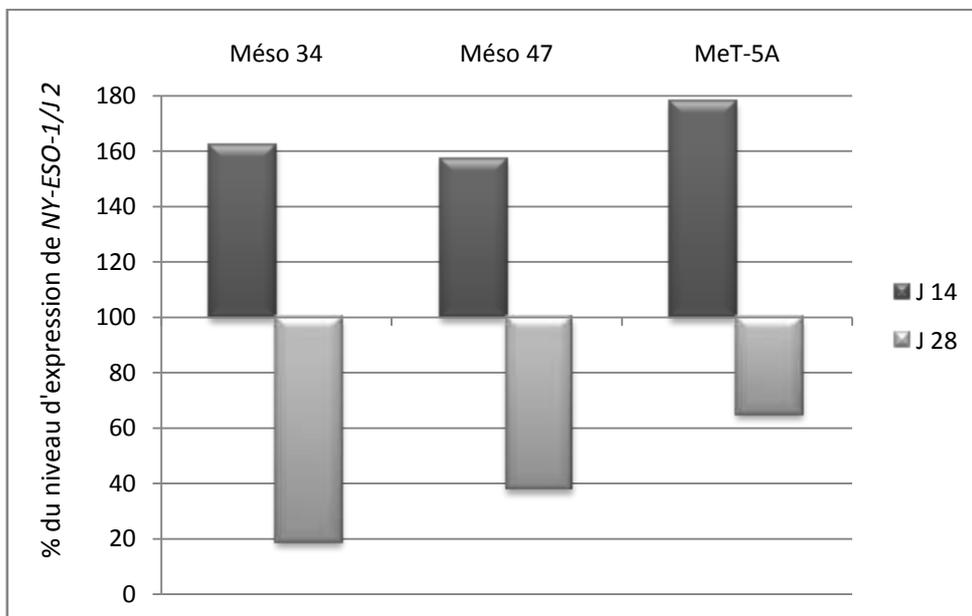
Transcrit étudié	<i>MAGE-1</i>			<i>MAGE-3</i>			<i>NY-ESO-1</i>		
	CT	5-azaCdR 0,5 µM	VPA 5 mM	CT	5-azaCdR 0,5 µM	VPA 5 mM	CT	5-azaCdR 0,5 µM	VPA 5 mM
Méso 13	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Méso 34	-	++	+	-	+	+	-	++	-
Méso 47	-	+	+	+	++ (2,39)	++ (3,16)	-	++	-
Méso 56	+	++ (1,27)	++ (1,19)	+	++ (1,29)	++ (1,18)	-	++	-
Méso 122	-	++	+	-	++	+	-	++	-
MeT-5A	-	+	+	+	++ (1,7)	++ (1,9)	-	++	-
ADK 3	-	+	+	+	++ (1,9)	++ (1,8)	-	+++	-

**Tableau VI : Intensité d'expression des produits de qRT-PCR (*RPLPO*, *MUC-1*, *MSLN*, *MAGE-1*, *MAGE-3* et *NY-ESO-1*) en fonction du traitement 5-azaCdR 0,5µM ou VPA 5 mM**  
 Ct = cycle-seuil ; +++ : 20<Ct≤ 25 ; ++ : 25<Ct≤30 ; + : 30<Ct≤35 ; - non détectable (détermination du Ct impossible). Quand ils sont calculables, les facteurs d'induction d'expression des transcrits sont indiqués entre parenthèses.

En revanche, l'expression des antigènes tumoraux de différenciation *MSLN* et *MUC-1* est peu ou pas augmentée par le traitement au 5-azaCdR ou au VPA. Le VPA permet d'induire ou d'augmenter l'expression des transcrits *MAGE-1* et *MAGE-3*, néanmoins les transcrits *NY-ESO-1* ne sont pas détectables après le traitement avec le VPA.

## VII. Etude de la persistance d'expression des gènes induits par le traitement au 5-azaCdR

L'expression de *NY-ESO-1* a été analysée par PCR quantitative en temps réel, 2 jours, 14 jours et 28 jours après l'arrêt du traitement. L'expression semble être augmentée J14 après l'arrêt du traitement pour les 3 lignées. L'expression persiste à J28 mais elle est très nettement diminuée (Fig. 31).



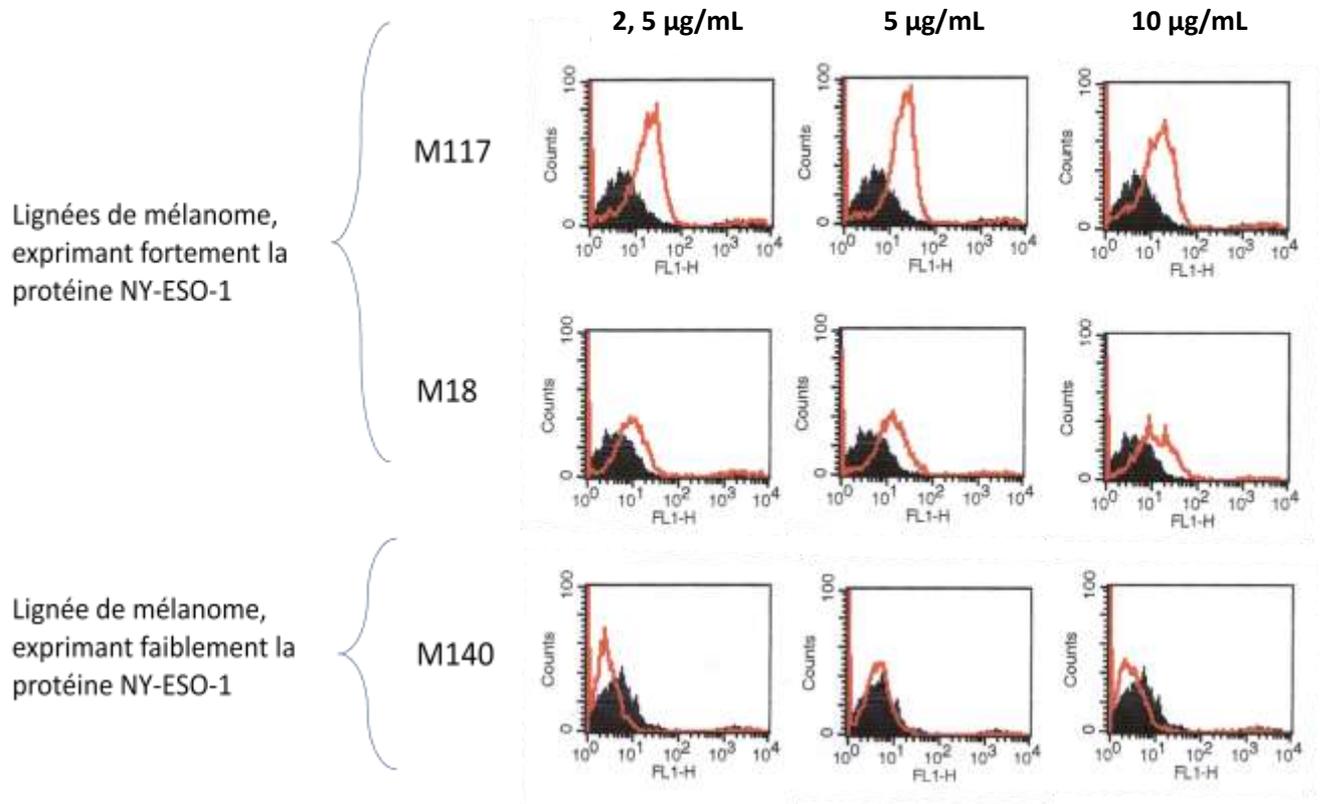
**Figure 31 : Etude de la persistance d'expression de *NY-ESO-1* après traitement avec 0,5  $\mu$ M de 5-azaCdR.**

L'expression de *NY-ESO-1* par les lignées Meso 34, Meso 47 et MeT-5A est quantifiée par qRT-PCR 2 (J 2), 14 (J14) et 28 (J28) jours après l'arrêt du traitement. En ordonnée figure le % du niveau d'expression du transcrit *NY-ESO-1* par rapport à celui observé à J 2. 100% correspond au niveau d'expression de *NY-ESO-1* à J 2

## VIII. Fixation de l'anticorps anti-*NY-ESO-1*

Ce test a été réalisé sur des lignées de mélanome qui expriment la protéine *NY-ESO-1* (témoin positif). Ainsi, nous avons travaillé avec les lignées M117 et M18 qui sont reconnues pour exprimer fortement la protéine et la lignée M140 qui, elle, ne l'exprime que faiblement. On

observe pour les lignées M117 et M18, un faible décalage de la fluorescence par rapport à l'anticorps témoin isotypique (Fig. 32) et les résultats obtenus avec la lignée M140 sont négatifs.



**Figure 32 : Fixation de l'anticorps anti NY-ESO-1 à différentes concentrations (2,5 ; 5 et 10 µg/ml) sur les lignées de mélanome M117, M18 et M140.**

La quantité de protéine NY-ESO-1 synthétisée par les cellules de mélanome est déterminée par un double marquage intracellulaire suivi d'une analyse au cytomètre. Le tracé en noir correspond à l'anticorps témoin isotypique. Celui en rouge correspond à l'échantillon étudié.

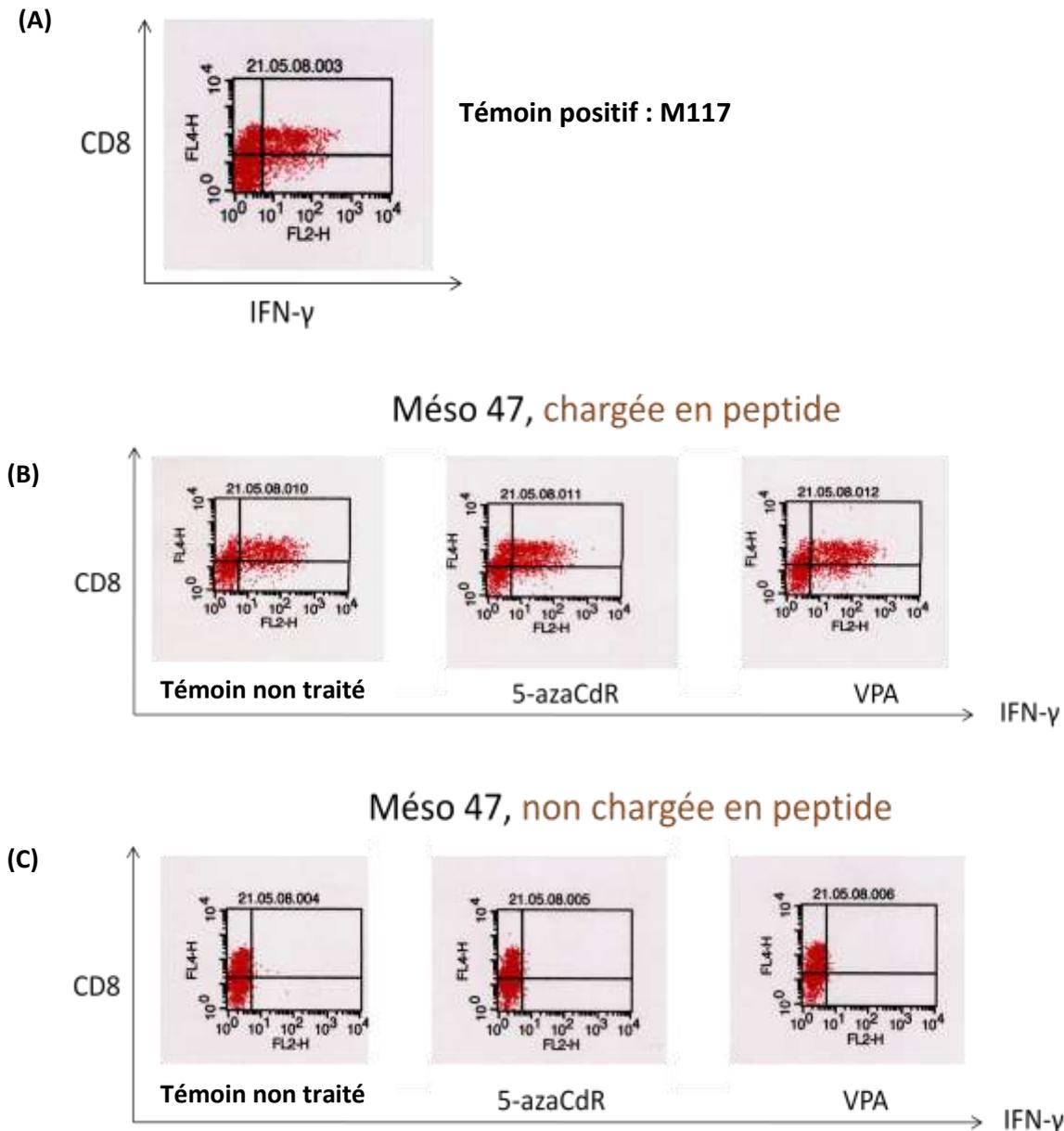
## IX. Activation de la réponse immunitaire

### IX.1. Traitement des cellules avec 5-azaCdR ou VPA

En partant du principe que les cellules de mésothéliome synthétisent, après traitement avec du 5-azaCdR ou du VPA, la protéine NY-ESO-1, on a voulu tester leur capacité à présenter le peptide à des clones T CD8 spécifiques de NY-ESO-1 et à les activer.

La lignée de mélanome M117 nous sert de témoin positif car elle est reconnue pour exprimer fortement à l'état basal la protéine NY-ESO-1. Cette lignée répond très bien au clone puisqu'on constate une forte libération d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8, conséquence de la présentation du peptide NY-ESO-1 aux lymphocytes T CD8 spécifiques et de leur activation

(Fig. 33a). En revanche, pour la lignée Més0 47, on n'observe pas une telle réponse (Fig. 33c). Cependant, lorsque les cellules sont chargées en peptide NY-ESO-1 (Fig. 33b), on constate une forte libération d'IFN- $\gamma$ , traduisant l'activation des clones T CD8. Par conséquent, les cellules de cette lignée de mésothéliome sont capables de présenter le peptide NY-ESO-1 au système immunitaire mais le traitement avec du 5-azaCdR ou du VPA seul ne permet pas d'induire une activation de la réponse immunitaire.



**Figure 33 : Réponse du clone anti NY-ESO-1 après traitement avec 5-azaCdR ou VPA**

L'activation de la réponse immunitaire après traitement est déterminée par un double marquage CD8 en ordonnée et IFN- $\gamma$  en abscisse, suivi d'une analyse au cytomètre.

(A) témoin positif : lignée de mélanome M117.

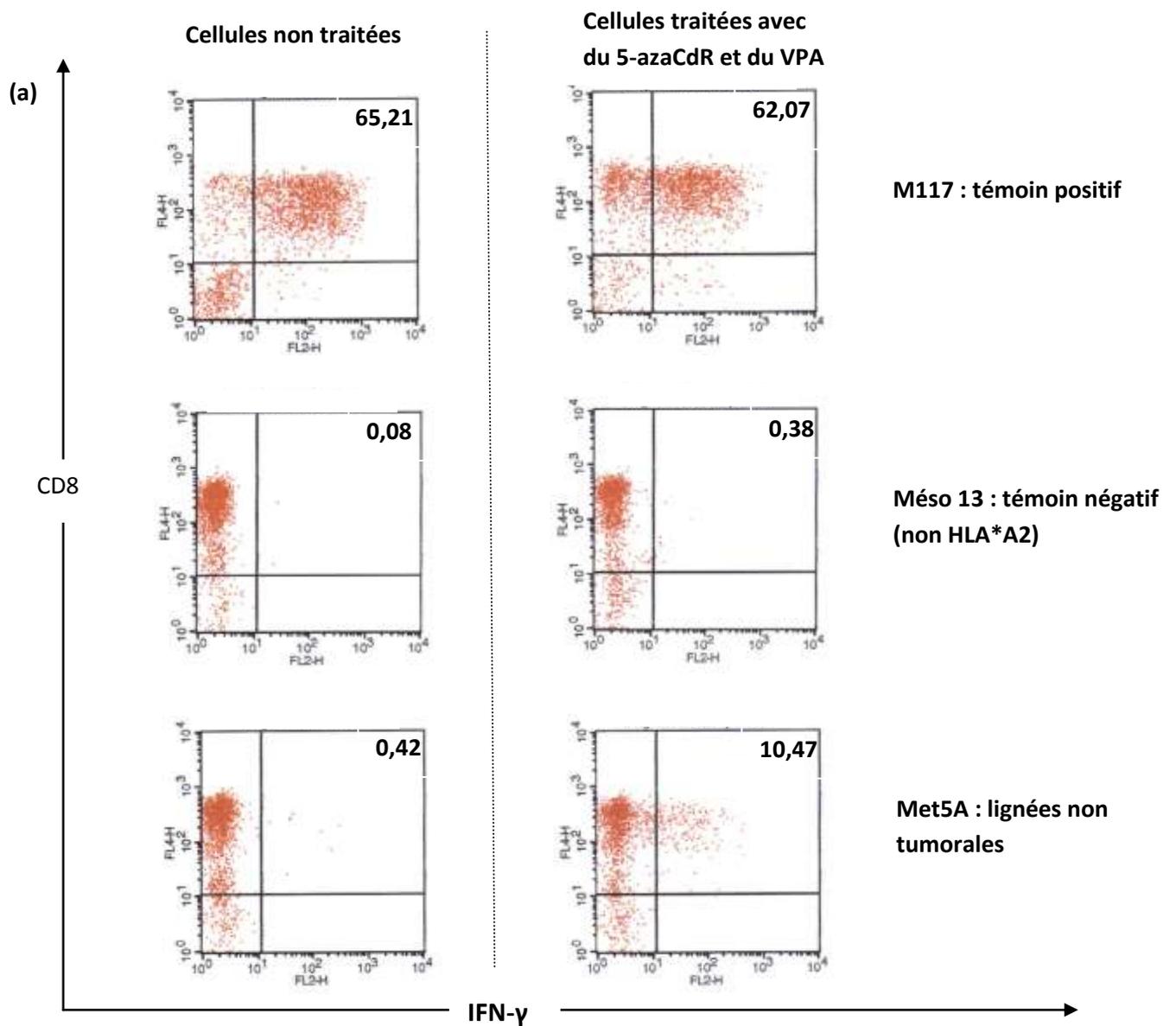
(B) Lignée Més0 47, traitée avec du 5-azaCdR 0,5 $\mu$ M ou du VPA 5 mM, chargée en peptide NY-ESO-1.

(C) Lignée Més0 47, traitée avec du 5-azaCdR 0,5 $\mu$ M ou du VPA 5 mM, non chargée en peptide.

## **IX.2. Traitement des cellules avec combinaison de 5-azaCdR et de VPA**

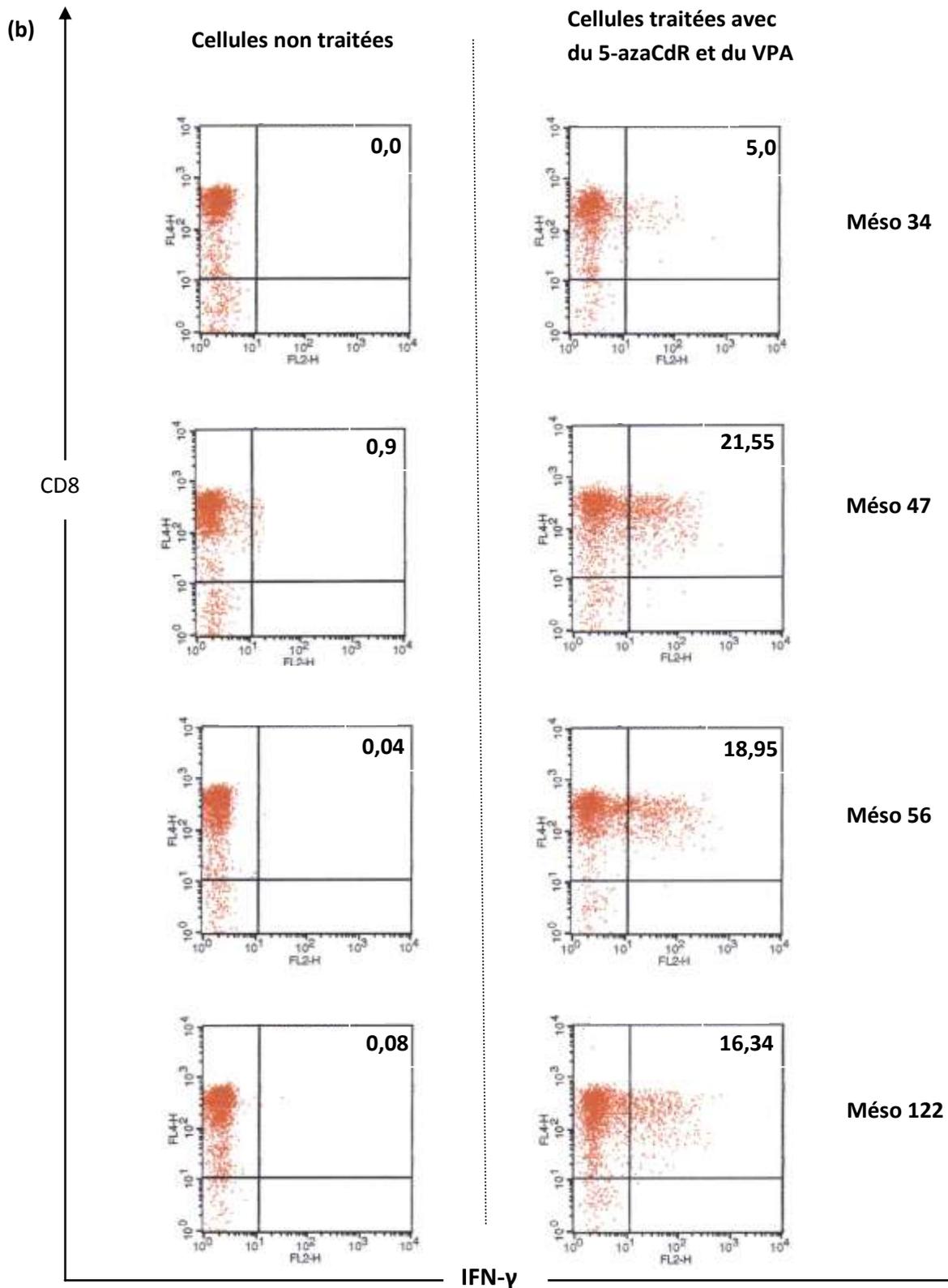
Afin d'améliorer l'activation de la réponse immunitaire, nous avons voulu combiner l'agent hypométhylant avec l'inhibiteur HDAC. Nous avons donc réalisé un traitement séquentiel, avec le 5-azaCdR dans un premier temps, puis avec le VPA. La lignée M117 (témoin positif), répond très bien au clone T CD8 puisqu'on constate une forte libération d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8. Les résultats obtenus avec les cellules traitées ou non ne diffèrent pas significativement. (Fig. 34a, page 95). Avec la lignée Mésos 13, qui n'est pas HLA\*A2 (témoin négatif), les résultats sont négatifs même après le traitement séquentiel. Ceci s'explique par le fait que les cellules de cette lignée ne peuvent pas présenter le peptide aux clones T CD8 à cause de l'incompatibilité du HLA. La lignée Met-5A non traitée ne permet pas d'activer les clones T. En revanche, après traitement, on observe une activation de ces clones T de 10,47 %.

Les lignées de Mésothéliome HLA\*A2 non traitées n'activent pas les lymphocytes T CD8 (Fig. 34b, page 96). En revanche, après traitement, on observe une libération d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8. Cette libération d'IFN- $\gamma$  est faible avec la lignée Mésos 34 (5%), et importante avec les autres lignées avec une moyenne de 19%. Ainsi, le traitement séquentiel permet de faire exprimer la protéine NY-ESO-1 par les cellules de mésothéliome. Ces dernières sont ensuite capables de présenter le bon peptide aux lymphocytes T CD8 spécifiques de NY-ESO-1 et de les activer.



**Figure 34a : Réponse du clone anti NY-ESO-1 après traitement avec 5-azaCdR et VPA : témoins positifs et négatifs**

L'activation de la réponse immunitaire après traitement est déterminée par un double marquage CD8 en ordonnée et IFN- $\gamma$  en abscisse, suivi d'une analyse au cytomètre. Le pourcentage d'activation du clone T CD8 spécifique de NY-ESO-1, pour chaque condition est représenté en haut à droite des graphes.



**Figure 34b : Réponse du clone anti NY-ESO-1 après traitement avec 5-azaCdR et VPA : lignées de mésothéliomes HLA\*A201.**

L'activation de la réponse immunitaire après traitement est déterminée par un double marquage CD8 en ordonnée et IFN- $\gamma$  en abscisse, suivi d'une analyse au cytomètre. Le pourcentage d'activation du clone T CD8 spécifique de NY-ESO-1, pour chaque condition est représenté en haut à droite des graphes.

## DISCUSSION

Le mésothéliome pleural malin (MPM) ne dispose à l'heure actuelle d'aucun traitement efficace et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques s'impose. L'immunothérapie offre des perspectives intéressantes (Grégoire & Ebstein, 2007), mais le développement d'une telle stratégie est freiné par l'absence d'antigènes de tumeur spécifiques identifiés. L'utilisation d'agents hypométhylants et/ou d'inhibiteurs HDAC pourrait présenter un moyen efficace pour induire une réponse immunitaire spécifique, en permettant l'induction *de novo* et/ou la surexpression d'antigènes tumoraux, comme des *Cancer Testis Antigens* (CTA).

Lors de cette étude, une série de tests préliminaires a permis de définir des conditions de traitement hypométhylant et d'inhibiteur d'histone désacétylase permettant d'obtenir une augmentation d'expression d'un grand nombre d'antigènes tumoraux étudiés et pour cinq lignées de MPM testées. Le 5-azacytidine (5-azaCR) et le 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azaCdR) ont deux effets distincts : hypométhylation de l'ADN et effet cytostatique/cytotoxique. L'objectif de cette étude étant d'évaluer exclusivement l'effet de l'hypométhylation et de l'acétylation des histones sur l'expression antigénique, il était donc important de se placer à une concentration qui altère le moins possible la prolifération et la viabilité cellulaire. C'est pourquoi la vitesse de prolifération et la viabilité cellulaire ont été étudiées en parallèle. Au vu de nos résultats, la concentration de 0,5  $\mu\text{M}$  a été choisie pour le 5-azaCdR et de 5 mM pour le VPA. A cette dose, le VPA ralentit quand même la prolifération et diminue la viabilité cellulaire. Ceci s'explique par le fait que le VPA est un inhibiteur HDAC peu puissant. Ainsi, afin d'obtenir une bonne inhibition de l'enzyme, et donc une action sur l'expression des antigènes tumoraux, il est nécessaire d'utiliser des doses importantes qui sont toxiques pour les cellules.

Nos résultats de RT-PCR montrent que le 5-azaCR est moins efficace que le 5-azaCdR pour induire l'expression des antigènes étudiés. Ceci est très net avec les antigènes qui nous intéressent le plus, c'est-à-dire ceux qui ne sont pas exprimés à l'état basal comme les CTA. La différence d'efficacité très nette observée entre le 5-azaCR et le 5-azaCdR, en termes d'induction de l'expression d'antigènes tumoraux, dans les lignées de MPM étudiées, peut s'expliquer par leurs mécanismes d'action différents. En effet, l'activité hypométhylante de ces molécules est imputée à leur incorporation dans l'ADN. Les effets de l'incorporation dans l'ARN sont encore méconnus. Les analogues désoxyribonucléosidiques comme le 5-azaCdR sont phosphorylés par une désoxycytidine kinase et incorporés directement dans l'ADN. En revanche, les analogues ribonucléosidiques comme le 5-azaCR sont incorporés essentiellement dans l'ARN après

phosphorylation. Seule une partie du 5-azaCR diphosphate formé est réduit en deoxy-diphosphate et peut alors être incorporé dans l'ADN. Cette réaction limitante permet d'expliquer l'efficacité inférieure du 5-azaCR. C'est pourquoi nous avons choisi de conserver uniquement le 5-aza-2'-deoxycytidine pour la suite de l'étude.

Afin d'évaluer l'action du 5-azaCdR et du VPA sur l'expression d'antigènes tumoraux au niveau transcriptomique, nous avons étudié par qRT-PCR, l'expression de trois CTA (MAGE-1, MAGE-3 et NY-ESO-1) et celle de MSLN et MUC-1, antigènes exprimés par les cellules de MPM, avant et après traitement avec le 5-azaCdR et le VPA. Les trois CTA (NY-ESO-1, MAGE-1 et MAGE-3) ont été sélectionnés car de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* attestent de la faisabilité de l'immunothérapie ciblée sur ces antigènes de tumeurs. NY-ESO-1 est considéré à l'heure actuelle comme le CTA le plus immunogène. De nombreux essais cliniques sont en cours afin d'évaluer l'efficacité des stratégies d'immunothérapie dirigées contre cet antigène (Gnjatic *et al*, 2006). De même, des travaux montrent l'activation effective de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de MAGE, capables de reconnaître et de lyser différentes lignées tumorales (Celis *et al*, 1994 - Mukherjee *et al*, 1995). Ces antigènes de tumeur constituent donc des cibles de choix pour le développement de stratégies d'immunothérapie.

Nos résultats montrent la capacité du 5-azaCdR à induire *de novo* ou à augmenter l'expression des transcrits *MAGE-1*, *MAGE-3* et *NY-ESO-1*, peu ou pas exprimés constitutivement par les lignées de MPM testées. Le VPA permet également d'induire *de novo* ou d'augmenter l'expression de *MAGE-1* et *MAGE-3* mais il n'a pas d'effet sur l'expression de *NY-ESO-1*. Enfin les transcrits fortement exprimés par les lignées étudiées, comme *MSLN* et *MUC-1*, ne présentent pas de différences significatives d'expression après traitement avec le 5-azaCdR ou le VPA.

Ainsi, la capacité du 5-azaCdR et du VPA à augmenter l'expression d'antigènes tumoraux dans le MPM est variable : elle semble dépendre du niveau d'expression basal de l'antigène considéré. L'absence, ou la faible expression des transcrits *NY-ESO-1*, *MAGE-1* et *MAGE-3* dans les cellules témoins de MPM et leur induction ou l'augmentation de leur expression dans les cellules traitées avec le 5-azaCdR ou le VPA suggèrent que la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones de la région promotrice sont impliquées dans la régulation de la transcription des lignées cellulaires étudiées). L'augmentation variable de l'expression des gènes étudiés, après traitement avec le 5-azaCdR, pourrait donc être corrélée au degré de méthylation du promoteur. Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer le profil de méthylation des promoteurs des gènes étudiés, par un séquençage au bisulfite de sodium (Frommer *et al*, 1992)

ou par une technique PCR quantitative multiplex spécifique de la méthylation (QM-MSP) (Fackler *et al*, 2004), afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. De même, l'augmentation variable de l'expression des gènes étudiés, après traitement avec le VPA pourrait être corrélée au niveau d'acétylation des histones. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'accumulation des histones hyper-acétylés H3 et H4, principales cibles des inhibiteurs HDAC (Göttlicher *et al*, 2001). Cette étude protéique pourrait se faire par immuno empreinte.

D'autre part, l'étude de l'expression de NY-ESO-1 jusqu'à un mois après l'arrêt du traitement par le 5-azaCdR a montré que l'induction était persistante. Ce résultat a déjà été observé dans le MPM (Sigalotti *et al*, 2002). Plus précisément, l'expression 14 jours après l'arrêt du traitement (J14) est plus forte qu'à J2. Elle est fortement diminuée à J28. Une étude cinétique devra être réalisée afin de déterminer précisément le moment où l'expression est maximale.

Après l'analyse transcriptomique, nous avons réalisé une étude protéique ciblée sur la protéine NY-ESO-1. Ceci afin de s'assurer que l'induction ou l'augmentation de l'expression des antigènes tumoraux au niveau de l'ARN étaient bien suivies de la synthèse protéique correspondante. Dans un premier temps, et disposant d'un anticorps anti NY-ESO-1, nous avons réalisé une étude par cytométrie. Nous avons d'abord travaillé sur des lignées de mélanome dont le niveau d'expression protéique de NY-ESO-1 est bien connu. Cependant les résultats obtenus montrent que l'utilisation de cette technique est envisageable seulement si l'expression protéique est conséquente. En revanche, elle n'est pas assez sensible pour détecter l'expression de NY-ESO-1 dans les cellules de la lignée de mélanome qui exprime faiblement la protéine ainsi que dans nos cellules de mésothéliome après traitement avec 5-azaCdR ou VPA. Cette faible sensibilité peut s'expliquer par le fait que l'anticorps n'est pas spécifié pour être utilisé en cytométrie et il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'anticorps commerciaux anti-NY-ESO-1 utilisable en cytométrie. C'est pourquoi, nous avons entrepris des études préliminaires dans l'optique de réaliser l'analyse protéique par immuno-empreinte.

Ensuite, nous avons voulu tester la réponse immunitaire. En effet, en prenant en compte l'hypothèse que l'induction ou l'augmentation des transcrits des antigènes tumoraux après traitement avec l'agent hypométhylant ou l'inhibiteur HDAC étaient bien suivies de la synthèse de la protéine NY-ESO-1, nous avons voulu vérifier que les cellules tumorales traitées étaient capables de présenter le peptide adéquat aux cellules immunitaires et plus particulièrement aux lymphocytes T CD8 spécifiques et que cette présentation était suivie de l'activation de ces derniers comme l'ont démontré certaines études sur d'autres types de tumeurs, comme le gliome (Natsume *et al*, 2008). D'après nos résultats, les cellules de MPM chargées en peptide sont

capables d'activer les clones T CD8 spécifiques de NY-ESO-1, activation qui se traduit par une forte libération d'IFN- $\gamma$ . En revanche, lorsque les cellules tumorales ne sont pas chargées en peptides, quel que soit le traitement (5-azaCdR ou VPA), stimulées ou non par de l'IFN- $\gamma$ , les clones T CD8 ne sont pas activés. Nos résultats suggèrent donc que les cellules de MPM sont aptes à présenter le peptide aux clones T CD8 mais que le traitement avec du 5-azaCdR ou du VPA n'était pas suffisant pour déclencher une bonne réponse immunitaire. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Tout d'abord, bien qu'on retrouve une induction ou une augmentation de l'expression du transcrit *NY-ESO-1* après traitement, on ne sait pas si les cellules synthétisent la protéine correspondante. Ensuite, il se peut qu'il n'y ait pas une présentation du peptide efficace ou que la quantité de protéines synthétisées ne soit pas suffisante.

En considérant cette dernière hypothèse, nous avons essayé d'optimiser le traitement afin d'augmenter la synthèse protéique. Ainsi, nous avons réalisé un traitement combinant le 5-azaCdR et le VPA. En effet, à l'heure actuelle, les stratégies visant à augmenter l'expression de gènes, tendent à associer en traitement séquentiel un agent hypométhylant (souvent le 5-azaCdR) et un inhibiteur HDAC. L'effet synergique de la déméthylation de l'ADN (par le 5-azaCdR) et de l'inhibition d'activité histone désacétylase (par la TSA) sur la ré-expression de gènes « éteints » dans les cellules tumorales a été démontré (Cameron *et al*, 1999). De même, une étude associant le 5-azaCdR et la TSA a montré l'effet synergique de ces deux molécules vis-à-vis de l'augmentation de l'expression des CTA de la famille MAGE (Wischniewski *et al*, 2006). Néanmoins, la TSA présente une toxicité importante et de nouvelles molécules permettant une meilleure tolérance ont été développées. Ainsi, une étude a montré que l'association du depsipeptide FR901228 et du 5-azaCdR favorise la surexpression de NY-ESO-1 par rapport à chacune des molécules utilisées seules, dans diverses lignées tumorales, dont le MPM. Cette induction d'expression est associée à la reconnaissance des cellules tumorales par des clones T CD8 spécifiques de NY-ESO-1 (Weiser *et al*, 2001). Ces données suggèrent donc l'intérêt de combiner le 5-azaCdR et un inhibiteur HDAC pour augmenter l'immunogénicité des cellules de MPM, via l'induction *de novo* et la surexpression de multiples CTA.

Nos résultats confirment la littérature puisque les cellules des lignées de mésothéliome HLA\*A2, traitées avec du 5-azaCdR et du VPA en séquentiel, sont capables de présenter le bon peptide aux lymphocytes T CD8 spécifiques de NY-ESO-1 et de les activer, contrairement aux cellules de mésothéliome traitées soit avec du 5-azaCdR, soit avec du VPA. Ainsi, le traitement séquentiel avec du 5-azaCdR et du VPA permet d'activer une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales de mésothéliome.

Un élément problématique pour l'interprétation des expériences réalisées est représenté par le choix du témoin non tumoral. La lignée MeT-5A, utilisée au cours de ce travail, est une lignée de cellules mésothéliales isolées à partir d'épanchements pleuraux d'individus non atteints de cancer et immortalisée par le virus SV40. La vitesse de prolifération de cette lignée non tumorale est similaire ou supérieure à celle des lignées tumorales utilisées dans cette étude. Le 5-azaCdR agissant lors de la réplication de l'ADN, son effet est d'autant plus marqué que la vitesse de division cellulaire est élevée. Ainsi, l'induction de l'expression d'antigènes tumoraux par le 5-azaCdR est observée de la même façon dans la lignée MeT-5A et dans les lignées tumorales. La MeT-5A ne constitue donc pas un bon témoin non tumoral dans le cadre de notre étude.

A ce jour, peu d'études se sont intéressées à l'effet du 5-azaCdR et du VPA sur les tissus normaux. Néanmoins, des travaux ont montré que le 5-azaCdR pourrait induire l'expression de CTA de façon préférentielle dans les cellules tumorales. Ainsi, dans une étude de Karpf *et al* (2004), le 5-azaCdR induit l'expression d'antigènes tumoraux de type CTA exclusivement dans les lignées tumorales testées contrairement aux cellules normales (3 lignées de cancer colorectal versus une lignée HMEC « Human Mammary Epithelial Cells » et 4 lignées de mélanome versus 4 cultures primaires de cellules mélanocytaires). De même, une étude a montré que le 5-azaCdR induit l'expression de CTA dans des cellules de cancer de la vessie et non dans les fibroblastes normaux (Liang *et al*, 2002). Le 5-azaCdR pourrait ainsi agir sur les cellules tumorales sans affecter de façon inappropriée le profil de méthylation des cellules normales.

Ainsi, il est évident que d'autres tests devront être réalisés afin d'étudier l'influence du 5-azaCdR et du VPA sur des cellules qui prolifèrent plus lentement. Des démarches ont été effectuées afin de disposer d'échantillons de tissu pleural sain. Des tests sur les cultures primaires établies à partir des fragments tissulaires seront réalisés.

## PERSPECTIVES

Nos résultats de qRT-PCR attestent de la capacité du 5-azaCdR et du VPA à induire ou augmenter l'expression de divers antigènes tumoraux, et notamment des CTA, au niveau de l'ARNm. Il reste néanmoins à vérifier que l'expression des protéines correspondantes est également augmentée. En effet, l'augmentation du nombre de transcrits dans la cellule n'est pas forcément associée à une traduction accrue en protéine. L'étude de l'expression protéique sera réalisée pour chacun des antigènes étudiés, par immuno-empreinte.

Ensuite, il serait intéressant d'optimiser le traitement en testant d'autres inhibiteurs HDAC. En effet, le VPA possède une très faible affinité pour son enzyme cible et donc une faible efficacité. Nous pourrions également travailler sur la pharmacomodulation de cette molécule afin de synthétiser des agents dont le but serait d'augmenter l'expression d'antigènes tumoraux. Ainsi il serait intéressant, de tester le 5-azaCdR combiné à ces nouveaux inhibiteurs HDAC.

Une autre approche consisterait à utiliser des biopolymères pouvant cibler très spécifiquement les tumeurs. Ainsi, il est envisagé de produire des complexes formés par un inhibiteurs HDAC et un de ces biopolymères. Ces derniers joueraient le rôle de vecteur, c'est-à-dire qu'ils devraient transporter les inhibiteurs HDAC directement au sein de la tumeur. De cette manière, dans le cadre d'une thérapie humaine, on pourrait s'affranchir d'une injection intrapleurale au profit d'une injection dans le sang périphérique.

Ceci fait le lien avec la suite de cette étude qui consistera à étudier l'expression des antigènes tumoraux, après traitement, dans un modèle *in vivo*. Dans ce cadre là, le laboratoire d'accueil dispose de 2 lignées de mésothéliome murin, AK7 (C57BL/6) et AB1 (BALB/c). Le laboratoire dispose également d'une lignée de mésothéliome pleural de rat 37-5 (Fischer). Les premiers essais montrent que l'injection de 5 millions de cellules AK7 par une intra-péritonéale provoque l'apparition d'une tumeur agressive au bout d'un mois (Dr M. Grégoire, communication personnelle). Ainsi, il serait intéressant, dans un premier temps, d'étudier l'activation immunitaire chez des souris porteuses de mésothéliome, après administration d'agents hypométhylants et d'inhibiteurs HDAC ; puis d'étudier cette même activation immunitaire après traitement et après présentation par des cellules dendritiques chargées en cellules tumorales apoptotiques. A terme, on pourrait réaliser ces mêmes études en utilisant les complexes « HDAC-biopolymère » directement injectés dans le sang périphérique.

## CONCLUSION

Le mésothéliome n'est pas reconnu comme étant une tumeur très antigénique du fait de l'absence ou de la faible expression d'antigènes tumoraux. L'administration du 5-azaCdR et/ou du VPA aux patients pourrait résoudre ce problème. De plus, la capacité du 5-azaCdR et du VPA à induire simultanément des niveaux d'expression élevés de différents CTA, dans une population de cellules de MPM donnée, suggère la possibilité d'établir des stratégies d'immunothérapie multi-ciblée sur ces CTA pour le traitement des malades. Cela permettrait d'éviter l'émergence de clones tumoraux CTA négatifs et l'échappement immunitaire de la tumeur.

Le potentiel immunogénique des cellules tumorales ne dépend pas exclusivement de leur niveau d'expression en antigènes tumoraux. La reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques dépend à la fois de la présence et du niveau d'expression des antigènes HLA de classe I, des molécules de co-stimulation et des antigènes associés à la tumeur. En plus de sa capacité à induire ou augmenter l'expression de CTA, le 5-azaCdR est capable d'augmenter l'expression de molécules HLA de classe I et de molécules de co-stimulation dans des lignées de mélanome, et ce, de façon persistante (jusqu'à près de 30 jours après l'arrêt du traitement) (Coral *et al*, 2006). Ce résultat suggère l'intérêt majeur de cette molécule pour l'optimisation des stratégies d'immunothérapie passives et/ou actives.

Ainsi, le 5-azaCdR et le VPA apparaissent parfaitement adaptés pour augmenter l'immunogénicité des cellules de MPM. Des études *in vitro* et *in vivo* devront être réalisées mais cette nouvelle approche consistant à associer la chimiothérapie et l'immunothérapie pourrait compléter de manière avantageuse l'arsenal thérapeutique actuel.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aarnoudse C.A., Garcia Vallejo J.J., Saeland E. and Van Kooyk Y.** 2006. Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* 18: 105-111.
- Alatas F, alatas O, Metintas M, Colak O, Harmanci E, and Demir S.** 2001. Diagnostic value of CEA, CA 15-3, CA 19-9, CYFRA 21-1, NSE and TSA assay in pleural effusions. *Lung Cancer* 31: 9-16.
- Albert M.L., Jegathesan M. and Darnell R.B.** 2001. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2: 1010-7.
- Albert M.L., Pearce S.F., Francisco L.M., Sauter B., Roy P., Silverstein R.L. and Bhardwaj N.** 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1359-68.
- Albert M.L., Sauter B. and Bhardwaj N.** 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-89.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E.** 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 51: 786-79.
- Andersen M.H., Schrama D., Thor Straten P. and Becker J.C.** 2006. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 126: 32-41.
- Antequera, F., Bird, A.** 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11995-9.
- Aparicio, A., Eads, C.A., Leong, L.A., Laird, P.W., Newman, E.M., Synold, T.W., Baker, S.D., Zhao, M., and Weber, J.S.** 2003. Phase I trial of continuous infusion 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol* 51: 231-9.
- Arnon T.I., Markel G. and Mandelboim O.** 2006. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Semin Cancer Biol* 16: 348-358.
- Assudani D.P., Horton R.B.V., Mathieu M.G., McArdle S.E.B. and Rees R.C.** 2007. The role of CD4+ T cell help in cancer immunity and the formulation of novel cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 56: 70-80.
- Astoul, P., Picat-Joossen, D., Viallat, J.R. and Boutin, C.** 1998. Intrapleural administration of interleukin-2 for the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma : a phase II study. *Cancer* 83: 2099-2104.
- Astoul, P., Brochard, P., Rolland, P. and Pairon, J-C.** 2005. Mésothéliome pleural. *Elsevier* 54 :259-68.
- Ault J.G., Cole R.W., Jensen C.G., Jensen L.C., Bachert L.A. and Rieder C.L.** 1995. Behavior of crocidolite asbestos during mitosis in living vertebrate lung epithelial cells. *Cancer Res* 55: 792-798.
- Bajtay Z., Csomor E., Sandor N. and Erdei A.** 2006. Expression and role of Fc- and complement- receptors on human dendritic cells. *Immunol Lett* 104 : 46-52.

- Balazs M., Martin F., Zhou T. and Kearney J.** 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17: 341-352.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B. and Palucka K.** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
- Bard, M., Debrosse, D., Caliandro, R., Girard, P., Grunenwald, D. and Ruffié, P.** 2002. Actualités dans le mésothéliome pleural malin. *Bull Cancer* 89 : 67-74.
- Barchet W., Cella M. and Colonna M.** 2005. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* 17: 253-261.
- Barnd D.L., Lan M.S., Metzgar R.S. and Finn O.J.** 1989. Specific, major histocompatibility complex- unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7159-7163.
- Barouch, D;Friede, T;Stevanovic, S;Tussey, L;Smith, K;Rowland-Jones, S;Braud, V; McMichael, A. and Rammensee, H G.** 1995. HLA-A2 subtypes are functionally distinct in peptide binding and presentation. *J Exp Med* 182: 1847-1856.
- Baxevanis C.N., Voutsas I.F., Tsitsilonis O.E., Gritzapis A.D., Sotiriadou R. and Papamichail M.** 2000. Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol* 164: 3902-12.
- Bennett S.R., Carbone F.R., Karamalis F., Flavell R.A., Miller J.F. and Heath W.R.** 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393: 478-480.
- Berken A., Abel J. and Unfried K.** 2003. Beta1-integrin mediates asbestos-induced phosphorylation of AKT and ERK1/2 in a rat pleural mesothelial cell line. *Oncogene* 22: 8524-28.
- Bocchetta M., Di Resta I., Powers A., Fresco R., Tosolini A., Testa J.R., Pass H.I., Rizzo P. and Carbone M.** 2000. Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10214-19.
- Borg C., Jalil A., Laderach D., Maruyama K., Wakasugi H., Charrier S., Ryffel B., Cambi A., Figdor C., Vainchenker W., Galy A., Caignard A. and Zitvogel L.** 2004. NK cell activation by dendritic cells requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in cellules dendritiques. *Blood* 104: 3267-3275.
- Brenner J., Sordillo P.P., Magill G.B. and Golbey R.B.** 1982. Malignant mesothelioma of the pleura: review of 123 patient. *Cancer* 49: 2431-2435.
- Brigl M. and Brenner M.B.** 2004. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22: 817-890.
- Brichard, V;Van Pel, A;Wölfel, T;Wölfel, C;De Plaen, E;Lethé, B;Coulie, P. and Boon, T.** 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 178: 489-495.
- Brossart P., Heinrich K.S., Stuhler G., Behnke L., Reichardt V.L., Stevanovic S., Muhm A., Rammensee H.G., Kanz L. and Brugger W.** 1999. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC-1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93 4309-4317.

- Bryceson Y.T., March M.E., Ljunggren H. and Long E.O.** 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214: 73-91.
- Buard A., Vivo C., Monnet I., Boutin C., Pilatte Y. and Jaurand M.C.** 1998. Human malignant mesothelioma cell growth: activation of janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 1alpha for inhibition by interferon-gamma. *Cancer Res* 58: 840-847.
- Burchell J., Wang D. and Taylor-Papadimitriou J.** 1984. Detection of the tumour-associated antigens recognized by the monoclonal antibodies HMFG-1 and 2 in serum from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 34: 763-768.
- Burnet F.** 1957. Cancer- a biological approach. *Brit Med J* 1: 841-847.
- Burnet F.M.** 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13: 1-27.
- Calmaels B.** 2004. Immunologie et cancer : mécanismes d'échappement tumoraux. *Oncologie* 6: 525-533
- Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myöhänen, S., Herman, J.G. and Baylin, S.B.** 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21: 103-107.
- Caminschi, I., Venetsanakos, E., Leong, C.C., Garlepp, M.J., Scott, B. and Robinson, B.W.S.** 1998. Interleukin-12 induces an effective antitumor response in malignant mesothelioma. *Am J Respir Cell and Mol Biol* 19: 738-746.
- Canevari, S ; Pupa, S.M. and Ménard, S.** 1996. 1975-1995 revised anti-cancer serological response: biological significance and clinical implications. *Ann Oncol* 7: 227-232
- Castagneto, B., Zai, S., Mutti, L., Lazzaro, A., Ridolfi, R., Piccolini, E., Ardizzoni, A., Fumagalli, L., Valsuani, G. and Botta, M.** 2001. Palliative and therapeutic activity of IL-2 immunotherapy in unresectable malignant pleural mesothelioma with pleural effusion : results of a phase II study on 31 consecutive patients. *Lung Cancer* 31: 303-310.
- Carbone M., Burck C., Rdzanek M., Rudzinski J., Cutrone R. and Bocchetta M.** 2003. Different susceptibility of human mesothelial cells to polyomavirus infection and malignant transformation. *Cancer Res* 63: 6125-6129.
- Carbone M., Pass H.I., Miele L. and Bocchetta M.** 2003. New developments about the association of SV40 with human mesothelioma. *Oncogene* 22: 5173-5180.
- Carbone M., Rizzo P., Grimley P.M., Procopio A., Mew D.J., Shridhar V., de Bartolomeis A., Esposito V., Giuliano M.T., Steinberg S.M., Levine A.S., Giordano A. and Pass H.I.** 1997. Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesothelioma. *Nat Med* 3: 908-12.
- Carmon L., El-Shami K.M., Paz A., Pascolo S., Tzehoval E., Tirosh B., Koren R., Feldman M., Fridkin M., Lemonnier F.A. and Eisenbach L.** 2000. Novel breast-tumor-associated MUC-1-derived peptides: characterization in DB-/- x beta2 microglobulin (beta2m) null mice transgenic for a chimeric HLA-A2.1/DB-beta2 microglobulin single chain. *Int J Cancer* 85: 391-97.

**Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L., and Cote, J.** 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* 19: 321-329.

**Caux C., Vanbervliet B., Massacrier C., Dezutter-Dambuyant C., de Saint-Vis B., Jacquet C., Yoneda K., Imamura S., Schmitt D. and Banchereau J.** 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 184: 695-706.

**Celis, E., Tsai, V., Crimi, C., DeMars, R., Wentworth, PA., Chesnut, R.W., Grey H.M., Sette, A. and Serra, H.M.** 1994. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2105-09.

**Chan C.W., Crafton E., Fan H., Flook J., Yoshimura K., Skarica M., Brockstedt D., Dubensky T.W., Stins M.F., Lanier L.L., Pardoll D.M. and Housseau F.** 2006. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 12: 207-213.

**Chang K. and Pastan I.** 1996. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:136-140.

**Chapman S.J., Cookson W.O.C., Musk A.W. and Lee Y.C.G.** 2003. Benign asbestos pleural diseases. *Curr Opin Pulm Med* 9: 266-271.

**Chatterjee S.K. and Zetter B.R.** 2005. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol* 1: 37-50.

**Cheng J.Q., Jhanwar S.C., Klein W.M., Bell D.W., Lee W.C., Altomare D.A., Nobori T., Olopade O.I., Buckler A.J. and Testa J.R.** 1994. P16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 54: 5547-5551.

**Cicala C., Pompetti F. and Carbone M.** 1993. SV40 induces mesotheliomas in hamsters. *Am J Pathol* 142: 1524-1533.

**Cioca D.P., Deak E., Cioca F. and Paunescu V.** 2006. Monoclonal antibodies targeted against melanoma and ovarian tumors enhance dendritic cell-mediated cross-presentation of tumor-associated antigens and efficiently cross-prime CD8+ T cells. *J Immunother* 29: 41-52.

**Clark W.H.J., Elder D.E., Guerry D.4., Braitman L.E., Trock B.J., Schultz D., Synnestvedt M. and Halpern A.C.** Model predicting survival in stage in melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81: 1893-1904.

**Clayton A., Turkes A., Navabi H., Mason M.D. and Tabi Z.** Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* 118: 3631-3638.

**Clemente C.G., Mihm M.C.J., Bufalino R., Zurrida S., Collini P. and Cascinelli N.** 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77: 1303-1310.

**Colonna M.** 1995. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5: 919-923

- Comar, M., Rizzardi, C., Renata de Zotti, Melato, Bovenzi M., Butel R., and Campello, C.** 2007. SV40 Multiple Tissue Infection and Asbestos Exposure in a Hyperendemic Area for Malignant mesothelioma. *Cancer Research* 67: 8456-59.
- Coral, S., Sigalotti, L., altomonte, M., Engelsberg, A., Colizzi, F., Cattarossi, I., Maraskovsky, E., Jäger, E., Seliger, B. and Maio, M.** 2002. 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigen in human renal cell carcinoma : immunotherapeutic implications. *Clin Cancer Res* 8: 2690-95.
- Coral, S., Sigalotti, L., Colizzi, F., Spessotto, A., Nardi, G., Cortini, E., Pezzani, L., Fratta, E., Fonsatti, E., Di Giacomo, A.M., Nicotra, M.R., Natali, P.G., altomonte, M. and Maio, M.** 2006. Phenotypic and functional changes of human melanoma xenografts induced by DNA hypomethylation: immunotherapeutic implications. *J Cell Physiol* 207: 58-66.
- Cox A.L., Skipper J., Chen Y., Henderson R.A., Darrow T.L., Shabanowitz J., Engelhard V.H., Hunt D.F. and Slingluff C.L.J.** 1994. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264: 716-719.
- Croft M.** 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?. *Nat Rev Immunol* 3: 609-620.
- Cugell D.W. and Kamp D.W.** 2004. Asbestos and the pleura: a review. *Chest* 125: 1103-1117.
- Curtsinger J.M., Schmidt C.S., Mondino A., Lins D.C., Kedl R.M., Jenkins M.K. and Mescher M.F.** 1999. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 162: 3256-3262.
- Curtsinger J.M., Valenzuela J.O., Agarwal P., Lins D. and Mescher M.F.** 2005. Type I IFN provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J.Immunol* 174: 4465-4469.
- Dazzi H., Hasleton P.S., Thatcher N., Wilkes S., Swindell R. and Chatterjee A.K.** 1990. Malignant pleural mesothelioma and epidermal growth factor receptor (EGFR). Relationship of EGFR with histology and survival using fixed paraffin embedded tissue and the F4, monoclonal antibody. *Br J Cancer* 61: 924-926.
- De Libero G. and Mori L.** Mechanisms of lipid-antigen generation and presentation to T cells. *Trends Immunol* 27: 485-492.
- De Libero G. and Mori L.** 2005. Recognition of lipid antigens by T cells. *Nat Rev Immunol* 5: 485-496.
- De Plaen E., Lurquin C., Lethe B., van der Bruggen P., Brichard V., Renault J.C., Coulie P., Van Pel A. and Boon T.** 1997. Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods* 12: 125-142.
- De Smedt T., Pajak B., Muraille E., Lespagnard L., Heinen E., De Baetselier P., Urbain J., Leo O. and Moser M.** 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. *J Exp Med* 184: 1413-1424.

- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. and Boon, T.** 1996. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7149-53.
- De Smet, C., Lurquin, C., Lethé, B., Martelange, V. and Boon, T.** 1999. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ-line and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol* 19: 7327-35.
- Delneste Y., Beauvillain C. and Jeannin P.** 2007. Innate immunity: structure and function of TLRs. *Med Sci (Paris)* 23: 67-74.
- Dhaene K., Wauters J., Weyn B., Timmermans J.P. and van Marck E.** 2000. Expression profile of telomerase subunits in human pleural mesothelioma. *J Pathol* 190: 80-85.
- Dhodapkar K.M., Krasovsky J., Williamson B. and Dhodapkar M.V.** 2002. Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J Exp Med* 195: 125-133.
- Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S. and Reis e Sousa C.** 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded MA. *Science* 303: 1529-1531.
- Dieli F., Caccamo N., Meraviglia S., Ivanyi J., Sireci G., Bonanno C.T., Ferlazzo V. La Mendola C. and Salerno A.** 2004. Reciprocal stimulation of gammadelta T cells and dendritic cells during the anti-mycobacterial immune response. *Eur J Immunol* 34: 3227-35.
- Dieu M.C., Vanbervliet B., Vicari A., Bridon J.M., Oldham E., Ait-Yahia S., Briere F., Zlotnik A., Lebecque S. and Caux C.** 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188: 373-386.
- Dieu-Nosjean M.C., Massacrier C., Homey B., Vanbervliet B., Pin J.J., Vicari A., Lebecque S., Dezutter-Dambuyant C., Schmitt D., Zlotnik A. and Caux C.** 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: 705-718.
- Dodson R.F., Atkinson M.A.L. and Levin J.L.** 2003. Asbestos fiber length as related to potential pathogenicity: a critical review. *Am J Ind Med* 44: 291-297.
- Dogan A.U., Baris Y.I., Dogan M., Emri S., Steele I., Elmishad A.G. and Carbone M.** 2006. Genetic predisposition to fiber carcinogenesis causes a mesothelioma epidemic in turkey. *Cancer Res* 66: 5063-5068.
- Doménech, N; Henderson, R.A; and Finn, O.J.** 1995. Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin. *J Immunol* 155: 4766-74.
- Dong, H; Buard, A; Renier, A; Lévy, F; Saint-Etienne, L. and Jaurand, M C.** 1994. Role of oxygen derivatives in the cytotoxicity and DNA damage produced by asbestos on rat pleural mesothelial cells in vitro. *Carcinogenesis* 15: 1251-55.
- Doytchinova I.A., Guan P. and Flower D.R.** 2004. Quantitative structure-activity relationships and the prediction of MHC supermotifs. *Methods* 34: 444-453.

- Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, and Herrera F.** 2008. Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev* 34:206-22
- Duffy M.J.** 2006. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin Chem* 52: 345-351.
- Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J. and Schreiber R.D.** 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3: 991-998.
- Dunn G.P., Bruce A.T., Sheehan K.C.F., Shankaran V., Uppaluri R., Bui J.D., Diamond M.S., Koebel C.M., Arthur C., White J.M. and Schreiber R.D.** 2005. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* 6: 722-729.
- Dunn G.P., Old L.J. and Schreiber R.D.** 2004. The three es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22: 329-360.
- Dunn G.P., Old L.J. and Schreiber R.D.** 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137-148.
- Eastman Q. and Grosschedl R.** 1999. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by WNT and other signals. *Curr Opin Cell Biol* 11: 233-240.
- Ebstein, F., Sapede, C., Royer, P-J., Marcq, M., Ligeza-Poisson, C., Barbieux, I., Cellerin, L., Dabouis, G. and Gregoire, M.** 2004. Cytotoxic T cell responses against mesothelioma by apoptotic cell-pulsed dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 15: 1322-30.
- Edwards J.G., Abrams K.R., Leverment J.N., Spyt T.J., Waller D.A. and O'Byrne K.J.** 2000. Prognostic factors for malignant mesothelioma in 142 patients: validation of CALGB and EORTC prognostic scoring systems. *Thorax* 55: 731-735.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A. and Gehrke, C.** 1982. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucl Ac Res* 10: 2709-21
- Ehrlich P.** 1909. Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 5: 273-290.
- Echchakir, H;Bagot, M;Dorothee, G;Martinvalet, D;Le Gouvello,S;Boumsell, L;Chouaib, S;Bensussan, A. and Mami-Chouaib, F.** 2000. Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a FAS-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J Invest Dermatol* 115: 74-80.
- Euvrard S., Kanitakis J. and Claudy A.** 2003. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 348: 1681-1691.
- Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, Blum MA, Lange J, Lapidis A, Garrett E, Argani P. and Sukumar S.** 2004. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res* 64: 4442-52.
- Falk, K; Röttschke, O; Stevanovi, S; Jung, G. and Rammensee, H.G.** 1991. allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351: 290-296.

**Fan D., Yano S., Shinohara H., Solorzano C., Van Arsdall M., Bucana C.D., Pathak S., Kruzel E., Herbst R.S., Onn A., Roach J.S., Onda M., Wang Q., Pastan I. and Fidler I.J.** 2002. Targeted therapy against human lung cancer in nude mice by high-affinity recombinant antimesothelin single-chain Fv immunotoxin. *Mol Cancer Ther* 1: 595-600.

**Fedarko N.S., Jain A., Karadag A., Van Eman M.R. and Fisher L.W.** Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res* 7: 4060-4066.

**Fernandez N.C., Lozier A., Flament C., Ricciardi-Castagnoli P., Bellet D., Suter M., Perricaudet M., Tursz T., Maraskovsky E. and Zitvogel L.** 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses *in vivo*. *Nat Med* 5: 405-411.

**Ferlazzo, G.; Tsang, M. ; Moretta G, Lorenzo, J ; Melioli, D; Giovanni ; Steinman, Ralph M. and Ménez, C.** 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKP30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195: 343-351.

**Figdor C.G., van Kooyk Y. and Adema G.J.** 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2: 77-84.

**Finn O.J., Jerome K.R., Henderson R.A., Pecher G., Domenech N., Magarian-Blander J. and Barratt-Boyes S.M.** 1995. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev* 145: 61-89.

**Fitzpatrick D.R., Bielefeldt-Ohmann H., Himbeck R.P., Jarnicki A.G., Marzo A.L. and Robinson B.W.** 1994. Transforming growth factor-beta: antisense MA-mediated inhibition affects anchorage-independent growth, tumorigenicity and tumor-infiltrating T-cells in malignant mesothelioma. *Growth Factors* 11: 29-44.

**Foddis R., De Rienzo A., Broccoli D., Bocchetta M., Stekala E., Rizzo P., Tosolini A., Grobely J.V., Jhanwar S.C., Pass H.I., Testa J.R. and Carbone M.** 2002. SV40 infection induces telomerase activity in human mesothelial cells. *Oncogene* 21: 1434-42.

**Fonteneau J.F., Larsson M., Somersan S., Sanders C., Munz C., Kwok W.W., Bhardwaj N. and Jotereau F.** 2001. Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4+ and CD8+ T cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *J Immunol Methods* 258: 111-126.

**Friedl P., den Boer A.T. and Gunzer M.** 2005. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 5: 532-545.

**Frommer, M, McDonald, LE, Millar, DS, Collis, CM, Watt, F, Grigg, GW, Molloy, PL, and Paul, CL.** 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1827-3

**Froom P., Lahat N., Kristal-Boneh E., Cohen C., Lerman Y. and Ribak J.** 2000. Circulating natural killer cells in retired asbestos cement workers. *J Occup Environ Med* 42: 19-24.

**Fuhrman C., Duche J.C., Chouaid C., Abd alsamad I., Atassi K., Monnet I., Tillement J.P. and Housset B.** 2000. Use of tumor markers for differential diagnosis of mesothelioma and secondary pleural malignancies. *Clin Biochem* 33: 405-410.

- Galfy G., Mohammed K.A., Dowling P.A., Nasreen N., Ward M.J. and Antony V.B.** 1999. Interleukin 8: an autocrine growth factor for malignant mesothelioma. *Cancer Res* 59: 367-371.
- Gaudet, F, Hodgson, JG, Eden, A, Jackson-Grusby, L, Dausman, J, Gray, JW, Leonhardt, H, Jaenisch, R.** 2003. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300: 489-92.
- Gazdar A.F., Butel J.S. and Carbone M.** 2002. SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* 2: 957-964.
- Geijtenbeek T.B.H., van Vliet S.J., Engering A., 't Hart B.A. and Van Kooyk Y.** 2004. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 22: 33-54.
- Germain R.N.** 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76: 287-299.
- Gerosa F., Baldani-Guerra B., Nisii C., Marchesini V., Carra G. and Trinchieri G.** 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195: 327-333.
- Gilboa E.** 1999. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* 11: 263-270.
- Girardi M., Glusac E., Filler R.B., Roberts S.J., Propperova I., Lewis J. and Tigelaar R.E.** 2003. The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR) gammadelta+ and TCRalpha beta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J Exp Med* 198: 747-55
- Gnjatic, S., Nishikawa, H., Jungbluth, A.A., Güre, A.O., Ritter, G., Jäger, E., Knuth, A., Chen, Y-T and Old, L.J.** 2006. NY-ESO-1: a review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res* 95: 1-30.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG. and Heinzl, T.** 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 24: 6969-78.
- Gourevitch M.M., von Mensdorff-Pouilly S., Litvinov S.V., Kenemans P., van Kamp G.J., Verstraeten A.A. and Hilgers J.** 1995. Polymorphic epithelial mucin (MUC-1) containing circulating immune complexes in carcinoma patients. *Br J Cancer* 72: 934-938.
- Gregoire, M and Ebstein, F.** 2007. Immunotherapy and malignant Mesothelioma: clinical perspectives *Bull Cancer* 94: 23-31.
- Groothuis T.A.M. and Neefjes J.** 2005. The many roads to cross-presentation. *J Exp Med* : 202: pp. 1313-1318.
- Gross-Goupil, M. and Ruffié, P.** 1999. Malignant pleural mesothelioma. *Bull Cancer* Suppl 3: 43-54.
- Guermonprez P., Saveanu L., Kleijmeer M., Davoust J., Van Endert P. and Amigorena S.** 2003. ER- phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425: 397-402.

- Gunawardana C.G. and Diamandis E.P.** 2007. High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens. *Cancer Lett* 249: 110-9
- Guo, Z.S., Hong, J.A., Irvine, K.R., Chen, G.A., Spiess, P.J., Liu, Y., Zeng, G., Wunderlich, J.R., Nguyen, D.M., Restifo, P. and Schrump, D.S.** 2006. De novo induction of a cancer/testis antigen by 5-aza-2'-deoxycytidine augments adoptive immunotherapy in a murin tumor model. *Cancer Res* 66: 1105-13
- Haas G.G.J., D'Cruz O.J. and De Bault L.E.** 1988. Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 18: 47-51.
- Halder T., Pawelec G., Kirkin A.F., Zeuthen J., Meyer H.E., Kun L. and Kalbacher H.** 1997. Isolation of novel HLA-DR restricted potential tumor-associated antigens from the melanoma cell line fm3. *Cancer Res* 57: 3238-3244.
- Hanahan D. and Weinberg R.A.** 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hanisch F.** 2005. Design of a MUC-1-based cancer vaccine. *Biochem Soc Trans* 33: 705-708.
- Harvey P., Clark I.M., Jaurand M.C., Warn R.M. and Edwards D.R.** 2000. Hepatocyte growth factor/scatter factor enhances the invasion of mesothelioma cell lines and the expression of matrix metalloproteinases. *Br J Cancer* 83: 1147-1153.
- Hassan R., Bera T. and Pastan I.** 2004. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res* 10: 3937-3942.
- Hassan R., Lerner M.R., Benbrook D., Lightfoot S.A., Brackett D.J., Wang Q. and Pastan I.** 2002. Antitumor activity of SS(DSFv)PE38 and SS1(DSFv)PE38, recombinant antimesothelin immunotoxins against human gynecologic cancers grown in organotypic culture in vitro. *Clin Cancer Res* 8: 3520-3526.
- Hassan R., Remaley A.T., Sampson M.L., Zhang J., Cox D.D., Pingpank J., alexander R., Willingham M., Pastan I. and Onda M.** 2006. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 12: 447-453.
- Hava D.L., Brigl M., van den Elzen P., Zajonc D.M., Wilson I.A. and Brenner M.B.** 2005. CD1 assembly and the formation of CD1-antigen complexes. *Curr Opin Immunol* 17: 88-94.
- Hegmans, J.P.J.J., Hemmes, A., Aerts, J.G., Hoogsteden, H.C. and Lambrecht, B.N.** 2005. Immunotherapy of murine malignant Mesothelioma using tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Am Journal Respir Crit Care Med* 171: 1168-77.
- Heukamp L.C., van der Burg S.H., Drijfhout J.W., Melief C.J., Taylor-Papadimitriou J. and Offringa R.** 2001. Identification of three non-VNTR MUC-1-derived HLA-A\*0201-restricted T-cell epitopes that induce protective anti-tumor immunity in HLA-A2/k(b)-transgenic mice. *Int J Cancer* 91: 385-392.
- Hiltbold E.M., alter M.D., Ciborowski P. and Finn O.J.** 1999. Presentation of MUC-1 tumor antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken up by dendritic cells. *Cell Immunol* 194: 143-149.
- Hirao T., Bueno R., Chen C., Gordon G.J., Heilig E. and Kelsey K.T.** 2002. alterations of the p16(INK4) locus in human malignant mesothelial tumors. *Carcinogenesis* 23: 1127-30.

- Hirvonen A., Pelin K., Tammilehto L., Karjalainen A., Mattson K. and Linnainmaa K.** 1995. Inherited GSTM1 and NAT2 defects as concurrent risk modifiers in asbestos-related human malignant mesothelioma. *Cancer Res* 55: 2981-83.
- Hirvonen A., Saarikoski S.T., Linnainmaa K., Koskinen K., Husgafvel-Pursiainen K., Mattson K. and Vainio H.** 1996. Glutathione s-transferase and n-acetyltransferase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders. *J Natl Cancer Inst* 88: 1853-1856.
- Ho M., Hassan R., Zhang J., Wang Q., Onda M., Bera T. and Pastan I.** 2005. Humoral immune response to mesothelin in mesothelioma and ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 11: 3814-20.
- Hollenbeak C.S., Todd M.M., Billingsley E.M., Harper G., Dyer A. and Lengerich E.J.** 2005. Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. *Cancer* 104: 1962-1967.
- Hung C., Calizo R., Tsai Y., He L. and Wu T.** 2007. A DNA vaccine encoding a single-chain trimer of HLA-A2 linked to human mesothelin peptide generates anti-tumor effects against human mesothelin-expressing tumors. *Vaccine* 25: 127-135.
- Hung, C-F., Tsai,Y-C., He, L. and Wu, T-C.** 2007. Control of Mesothelin-expressing ovarian cancer using adoptive transfer of mesothelin peptide-specific CD8+ T cells. *Gene Therapy* 14: 921-9.
- Hung K., Hayashi R., Lafond-Walker A., Lowenstein C., Pardoll D. and Levitsky H.** 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188: 2357-68.
- Ikeda H., Old L.J. and Schreiber R.D.** 2002. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 95-109.
- Ilyas M., Tomlinson I.P., Rowan A., Pignatelli M. and Bodmer W.F.** 1997. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10330-334.
- Inohara, C; McDonald, C. and Nunez, Gabriel.** 2005. Nod-1/ir proteins: role in host- microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 74: 355-383.
- Inaba K. and Inaba M.** 2005. Antigen recognition and presentation by dendritic cells. *Int J Hematol* 81: 181-187.
- Ishigami S., Natsugoe S., Tokuda K., Nakajo A., Che X., Iwashige H., Aridome K., Hokita S. and Aikou T.** 2000. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88: 577-583.
- Issa, JP, Garcia-Manero, G, Giles, FJ, Mannari, R, Thomas, D, Faderl, S, Bayar, E, Lyons, J, Rosenfeld, CS, Cortes, J. and Kantarjian HM.** 2004. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 103: 1635-40.

- Jaffee E.M., Hruban R.H., Biedrzycki B., Laheru D., Schepers K., Sauter P.R., Goemann M., Coleman J., Grochow L., Donehower R.C., Lillemoe K.D., O'Reilly S., Abrams R.A., Pardoll D.M., Cameron J.L. and Yeo C.J.** 2001. Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J Clin Oncol* 19: 145-156.
- Jäger, E., Chen, Y-T, Drijfhout, J.W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jäger, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L. and Knuth, A.** 1998. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1 : definition of human hitocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med* 187: 265-270.
- Jäger, E., Nagata, Y., Gnajtlic, S., Wada, H., Stockert, E., Karbach, J., Dunbar, P.R., Lee, S.Y., Jungbluth, A., Jäger, D., Arand, M., Ritter, G., Cerundolo, V., Dupont, B., Chen, Y-T, Old, L.J. and Knuth, A.** 2000. Monitoring CD8 Tcell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 4760-65.
- James, S.R., Link, P.A. and Karpf, A.R.** 2006. Epigenetic regulation of X-linked cancer/germline antigen genes by DNMT-1 and DNMT3b. *Oncogene* 25: 6975-85.
- Jasani B., Cristaudo A., Emri S.A., Gazdar A.F., Gibbs A., Krynska B., Miller C., Mutti L., Radu C., Tognon M. and Procopio A.** 2001. Association of SV40 with human tumours. *Semin Cancer Biol* 11: 49-61.
- Jaurand M.** 2005. Mesothelioma pathogenesis, facts and expectations. *Pathol Biol (Paris)* 53: 41-44.
- Jaurand M.C.** 1997. Mechanisms of fiber-induced genotoxicity. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5: 1073-1084.
- Jego G., Palucka A.K., Blanck J., Chalouni C., Pascual V. and Banchereau J.** 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19: 225-234.
- Jerome K.R., Domenech N. and Finn O.J.** 1993. Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin complementary DNA. *J Immunol* 151: 1654-1662.
- Jinushi M., Takehara T., Kanto T., Tatsumi T., Groh V., Spies T., Miyagi T., Suzuki T., Sasaki Y. and Hayashi N.** 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: 1249-1256.
- Ju S.T., Cui H., Panka D.J., Ettinger R. and Marshak-Rothstein A.** 1994. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4185-4189.
- Kalinski P., Hilkens C.M., Wierenga E.A. and Kapsenberg M.L.** 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20: 561-567.
- Kamp D.W., Graceffa P., Pryor W.A. and Weitzman S.A.** 1992. The role of free radicals in asbestos- induced diseases. *Free Radic Biol Med* 12: 293-315.

- Karpf, A.R., Lasek, A.W., Ririe, T.O., Hanks, A.N., Grossman, D. and Jones, D.A.** 2003. Limited gene activation in tumor and normal epithelial cells treated with the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol* 65: 18-27.
- Karpf, A.R.** 2006 A Potential Role for Epigenetic Modulatory Drugs in the Enhancement of Cancer/Germ-Line Antigen Vaccine Efficacy. *Epigenetics* 6: 116–120.
- Kast W.M. and Melief C.J.** 1991. In vivo efficacy of virus-derived peptides and virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Lett* 30: 229-232.
- Kast W.M., Offringa R., Peters P.J., Voordouw A.C., Meloen R.H., Van Der Eb A.J. and Melief C.J.** 1989. Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1a-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell* 59: 603-614.
- Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C., and Seigneurin-Berny, D.** 2001. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* 11: 162-166.
- Klarnet J.P., Kern D.E., Okuno K., Holt C., Lilly F. and Greenberg P.D.** 1989. FBL-reactive CD8+ cytotoxic and CD4+ helper T lymphocytes recognize distinct friend murine leukemia virus- encoded antigens. *J Exp Med* 169: 457-467.
- Kotera Y., Fontenot J.D., Pecher G., Metzgar R.S. and Finn O.J.** 1994. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res* 54: 2856-60.
- Krammer P.H.** 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795.
- Kuendgen, A, Gattermann, N.** 2008. Valproic acid for the treatment of myeloid malignancies. *Cancer* 110: 943-54.
- Kumaki, F; Kawai, T;Churg, A;Galateau-Sallé, F B;Hasleton, P;Henderson, D;Rogli, Victor;Travis, W D;Cagle, P. and Ferrans, V.** 2002. Expression of telomerase reverse transcriptase (TERT) in malignant mesotheliomas. *Am J Sur Pathol* 26: 365-370.
- Laird, PW, Jackson-Grusby, L, Fazeli, A, Dickinson, SL, Jung, WE, Li, E, Weinberg, RA, Jaenisch, R.** 1995. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 81: 197-205.
- Lala P.K. and Orucevic A.** 1998. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev* 17: 91-106.
- Langenkamp A., Messi M., Lanzavecchia A. and Sallusto F.** 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1: 311-316.
- Langerak A.W., De Laat P.A., Van Der Linden-Van Beurden C.A., Delahaye M., Van Der Kwast T.H., Hoogsteden H.C., Benner R. and Versnel M.A.** 1996. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptors in human malignant mesothelioma *in vitro* and *in vivo*. *J Pathol* 178: 151-160.
- Lanier L.L.** 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 225-274.
- Lanzavecchia A.** 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28: 2760-2769.

- Lechner J.F., Tokiwa T., LaVeck M., Benedict W.F., Banks-Schlegel S., Yeager H.J., Banerjee A. and Harris C.C.** 1985. Asbestos-associated chromosomal changes in human mesothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3884-88.
- Lee A.Y., He B., You L., Dadfarmay S., Xu Z., Mazieres J., Mikami I., McCormick F. and Jablons D.M.** 2004. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* 23: 6672-76.
- Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M. and Davis MM.** 1999. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. med* 5: 677-85
- Lee T.C., Zhang Y., Aston C., Hintz R., Jagirdar J., Perle M.A., Burt M. and Rom W.N.** 1993. Normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines express insulin-like growth factor I and associated molecules. *Cancer Res* 53: 2858-2864.
- Leithner K., Leithner A., Clar H., Weinhaeusel A., Radl R., Krippel P., Rehak P., Windhager R., Haas O.A. and Olschewski H.** 2006. Mesothelioma mortality in europe: impact of asbestos consumption and simian virus 40. *Orphanet J Rare Dis* 1: 44.
- Lesimple T., Moisan A. and Toujas L.** 1998. Autologous human macrophages and anti-tumour cell therapy. *Res Immunol* 149: 663-671.
- Li Q., Verschraegen C.F., Mendoza J. and Hassan R.** 2004. Cytotoxic activity of the recombinant anti-mesothelin immunotoxin, SS1(DSFv)PE38, towards tumor cell lines established from ascites of patients with peritoneal mesotheliomas. *Anticancer Res* 24: 1327-1335.
- Liang, G, Gonzales, FA, Jones, PA, Orntoft, TF. And Thykjaer, T.** 2002. Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 62: 961-6.
- Lin, K.T., Momparler, R.L. and Rivard, G.E.** 1981. High-performance liquid chromatographic analysis of chemical stability of 5-aza-2'-deoxycytidine. *J. Pharm. Sci.* 70: 1228-32.
- Litinskiy M.B., Nardelli B., Hilbert D.M., He B., Schaffer A., Casali P. and Cerutti A.** 2002. Cellules dendritiques induisent CD40-indépendant immunoglobuline classe commutation à travers bly et april. *Nat Immunol* 3: 822-829.
- Liu Y.** 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23: 275-306.
- Liu Y.J.** 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106: 259-262.
- Liu Z., Ivanoff A. and Klominek J.** 2001. Expression and activity of matrix metalloproteases in human malignant mesothelioma cell lines. *Int J Cancer* 91: 638-643.
- Loriot, A, De Plaen, E, Boon, T and De Smet, C.** 2006. Transient down-regulation of DNMT1 methyltransferase leads to activation and stable hypomethylation of MAGE-A1 in melanoma cells. *J Biol Chem* 281 :10118-26.

- Lou Y., Liu C., Kim G.J., Liu Y., Hwu P. and Wang G.** 2007. Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses. *J Immunol* 178: 1534-1541.
- MacLennan I. and Vinuesa C.** 2002. Dendritic cells, baf, and april: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* 17: 235-238.
- Mahnke K., Knop J. and Enk A.H.** 2003. Induction of tolerogenic dendritic cells: 'you are what you eat'. *Trends Immunol* 24: 646-651.
- Marcenaro E., Della Chiesa M., Bellora F., Parolini S., Millo R., Moretta L. and Moretta A.** 2005. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* 174: 3992-98.
- Maric M., Chen L., Sherry B. and Liu Y.** 1997. A mechanism for selective recruitment of CD8 T cells into B7-1-transfected plasmacytoma: role of macrophage-inflammatory protein 1alpha. *J Immunol* 159: 360-368.
- Martin-Fontecha A., Sebastiani S., Hopken U.E., Ugucioni M., Lipp M., Lanzavecchia A. and Sallusto F.** 2003. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 198: 615-621.
- Marzo A.L., Fitzpatrick D.R., Robinson B.W. and Scott B.** 1997. Antisense oligonucleotides specific for transforming growth factor beta2 inhibit the growth of malignant mesothelioma both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 57: 3200-3207.
- Masood R., Kundra A., Zhu S., Xia G., Scalia P., Smith D.L. and Gill P.S.** 2003. Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the VEGF and VEGF-c autocrine loops. *Int J Cancer* 104: 603-610.
- Matsumura M., Fremont D.H., Peterson P.A. and Wilson I.A.** 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257: 927-934.
- Matzinger P.** 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-5.
- Maziak D.E., Gagliardi A., Haynes A.E., Mackay J.A. and Evans W.K.** 2005. Surgical management of malignant pleural mesothelioma: a systematic review and evidence summary. *Lung Cancer* 48: 157-169.
- Mescher M.F., Curtsinger J.M., Agarwal P., Casey K.A., Gerner M., Hammerbeck C.D., Popescu F. and Xiao Z.** 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 211: 81-92.
- Metintas S, Metintas M, Ucgun I, and Oner U.** 2002. Malignant mesothelioma due to environmental exposure to asbestos: follow-up of a Turkish cohort living in a rural area. *Chest* 122: 2224-9
- Milazzo, Caterina;Reichardt, Volker L;Müller, Martin R;Grünebach, Frank;Brossart, Peter.** 2003. Induction of myeloma-specific cytotoxic t cells using dendritic cells transfected with tumor- derived rna. *Blood* 101: 977-982.
- Montanaro, F;Bray, F;Gennaro, V;Merler, E;Tyczynski, JE;Parkin, D Maxwell;Strnad, M;Jechov'a, Marie;Storm, H;Aareleid, T;Hakulinen, T;Velten, M;Lef'evre, H;Danzon, A;Buemi, A and Daur'es.** 2003. Pleural mesothelioma incidence in Europe: evidence of some deceleration in the increasing trends. *Cancer Causes Control* 14: 791-803.

- Morelli A.E., Larregina A.T., Shufesky W.J., Zahorchak A.F., Logar A.J., Papworth G.D., Wang Z., Watkins S.C., Falo L.D.J. and Thomson A.W.** 2003. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101: 611-620.
- Mohr, S., Keith, G., and Rihn, B.** 2005. Amiante et mésothéliome pleural malin : aspects moléculaires, cellulaires et physiopathologiques. *Bull. Cancer* 92: 959-976.
- Morin P.J., Sparks A.B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B. and Kinzler K.W.** 1997. Activation of beta-catenin-tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Cancer Res* 275: 1787-1790.
- Mukherjee, P, Ginardi, AR, Tinder, TL, Sterner, CJ. And Gendler, SJ.** 2001. MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes eradicate tumors when adoptively transferred *in vivo*. *Clin Cancer Res* 7: 848-55.
- Mukherji, B, Chakraborty, NG, Yamasaki, S, Okino, T, Yamase, H, Sporn, JR, Kurtzman, SK, Ergin, MT, Ozols, J, and Meehan, J.** 1995. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8078-82.
- Mutsaers S.E.** 2004. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 9-16.
- Nandi D., Tahiliani P., Kumar A. and Chandu D.** 2006. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 31: 137-155.
- Natsume, T, Kunio T, Shinji S, M, and Kiyotaka K.** 2008. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *Int. J. Cancer* 122: 2542-53.
- Nauta A.J., Castellano G., Xu W., Woltman A.M., Borrias M.C., Daha M.R., van Kooten C. and Roos A.** 2004. Opsonization with CLQ and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J Immunol* 173: 3044-3050.
- Neijssen J., Herberts C., Drijfhout J.W., Reits E., Janssen L. and Neefjes J.** 2005. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434: 83-88.
- Nephew, K.P., and Huang, T.H.** 2003. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett* 190: 125-133.
- Nishioka Y., Nishimura N., Suzuki Y. and Sone S.** 2001. Human monocyte-derived and CD83(+) blood dendritic cells enhance NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 31: 2633-2641.
- Notari, R.E. and Young, J.L.** 1975. Kinetics and mechanisms of degradation of antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solution. *J. Pharm. Sci* 64: 1148-57.
- Ordonez, N.G.** 2007. What are the current best immunohistochemical markers for the diagnosis of epithelioid mesothelioma? A review and update. *Hum Pathol* 38: 1-16.

- Ordenez, N.G.** 2006. Value of immunohistochemistry in distinguishing peritoneal mesothelioma from serous carcinoma of the ovary and peritoneum: a review and update. *Adv Anat Pathol* 13: 16-25.
- Ordenez, N.G.** 2002. Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesotheliomas: a critical review of old markers, new markers. *Hum Pathol* 33: 953-967.
- Ordenez, N.G.** 2003. Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Mod Pathol* 16: 192-197.
- Paganuzzi M., Onetto M., Marroni P., Filiberti R., Tassara E., Parodi S. and Felletti R.** 2001. Diagnostic value of cyfra 21-1 tumor marker and CEA in pleural effusion due to mesothelioma. *Chest* 119: 1138-1142.
- Parham P.** 1992. Immunology. deconstructing the MHC. *Nature* 360: 300-301.
- Pass H.I., Lott D., Lonardo F., Harbut M., Liu Z., Tang N., Carbone M., Webb C. and Wali A.** 2005. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med* 353: 1564-1573.
- Peiser L., Mukhopadhyay S. and Gordon S.** 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14: 123-128.
- Pelucchi C., Malvezzi M., La Vecchia C., Levi F., Decarli A. and Negri E.** 2004. The mesothelioma epidemic in western Europe: an update. *Br J Cancer* 90: 1022-1024.
- Penna G., Sozzani S. and Adorini L.** 2001. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 167: 1862-1866.
- Perkins G.L., Slater E.D., Sanders G.K. and Prichard J.G.** 2003. Serum tumor markers. *Am Fam Physician* 68: 1075-1082.
- Peto J., Decarli A., La Vecchia C., Levi F. and Negri E.** 1999. The european mesothelioma epidemic. *Br J Cancer* 79: 666-672.
- Pfaffl, MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Ac Res* 29: 45-49.
- Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D and Ashkenazi A.** 1998. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396: 699-703
- Piccioli D., Sbrana S., Melandri E. and Valiante N.M.** 2002. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195: 335-341.
- Plata F., Langlade-Demoyen P., Abastado J.P., Berbar T. and Kourilsky P.** 1987. Retrovirus antigens recognized by cytolytic T lymphocytes activate tumor rejection *in vivo*. *Cell* 48: 231-240.
- Posadas E.M., Simpkins F., Liotta L.A., MacDonald C. and Kohn E.C.** 2005. Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer--realistic hope? *Ann Oncol* 16: 16-22.
- Preuss K., Zwick C., Bormann C., Neumann F. and Pfreundschuh M.** 2002. Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev* 188: 43-50.

- Qu C., Edwards E.W., Tacke F., Angeli V., Llodra J., Sanchez-Schmitz G., Garin A., Haque N.S., Peters W., van Rooijen N., Sanchez-Torres C., Bromberg J., Charo I.F., Jung S., Lira S.A. and Randolph G.J.** 2004. Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte- derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* 200: 1231-1241.
- Rammensee, H G;Friede, T. and Stevanoviic, S.** 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228.
- Randolph G.J., Angeli V. and Swartz M.A.** 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5: 617-628.
- Ratzinger G., Stoitzner P., Ebner S., Lutz M.B., Layton G.T., Rainer C., Senior R.M., Shipley J.M., Fritsch P., Schuler G. and Romani N.** 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: 4361-4371.
- Reis e Sousa C.** 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6: 476-483.
- Ressing M.E., Sette A., Brandt R.M., Ruppert J., Wentworth P.A., Hartman M., Oseroff C., Grey H.M., Melief C.J. and Kast W.M.** 1995. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies of HLA-A\*0201- binding peptides. *J Immunol* 154: 5934-5943.
- Ridge J.P., Di Rosa F. and Matzinger P.** 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393: 474-478.
- Riedl S.J. and Shi Y.** 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907.
- Rittling S.R. and Chambers A.F.** 2004. Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* 90: 1877-1881.
- Robinson B.W.S. and Lake R.A.** 2005. Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med* 353: 1591-1603.
- Robinson B.W.S., Creaney J., Lake R., Nowak A., Musk A.W., de Klerk N., Winzell P., Hellstrom K.E. and Hellstrom I.** 2003. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 362: 1612-1616.
- Robinson, B.W.S., Robinson, C. and Lake R.A.** 2001. Localised spontaneous regression in Mesothelioma - possible immunological mechanism. *Lung Cancer* 32: 197-201.
- Robinson C., Callow M., Stevenson S., Scott B., Robinson B.W. and Lake R.A.** 2000. Serologic responses in patients with malignant mesothelioma: evidence for both public and private specificities. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 550-556.
- Robinson C., Robinson B.W. and Lake R.A.** 1998. Sera from patients with malignant mesothelioma can contain autoantibodies. *Lung Cancer* 20: 175-184.
- Rollins B.J.** 2006. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer* 42: 760-767.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., and allis, C.D.** 2001. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70: 81-120.

- Roushdy-Hammady I., Siegel J., Emri S., Testa J.R. and Carbone M.** 2001. Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the cappadocian region of turkey. *Lancet* 357: 444-445.
- Rubinfeld B., Robbins P., El-Gamil M., albert I., Porfiri E. and Polakis P.** 1997. Stabilization of beta- catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275: 1790-92.
- Ruppert J., Sidney J., Celis E., Kubo R.T., Grey H.M. and Sette A.** 1993. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 74: 929-37.
- Raulet D.H.** 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3:781-90.
- Saenz-Robles, M T;Sullivan, C S. and Pipas, J M.** 2001. Transforming functions of simian virus 40. *Oncogene* 20: 7899-7907.
- Sahin, U;Türeci, O;Schmitt, H;Cochlovius, B;Johannes, T;Schmits, R;Stenner, F;Luo, G;Schobert, I. and Pfreundschuh, M.** 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11810-11813.
- Santini, V., Kantarjian, H. and Issa, J.P.** 2001. Changes in DNA methylation in neoplasia : pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 134: 573-586.
- Scherpereel, A;Grigoriu, B;Conti, M;Gey, T;Grégoire, M;Copin, Marie-C;Devos, P;Chahine, B;Porte, H. and Lassalle, P.** 2006. Soluble mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 1155-1160.
- Schulz, O;Diebold, S;Chen, M;Naslund,T;Nolte, M;Alexopoulou, L;Azuma, YT;Flavell, Richard A;Liljeström, P;Reis e Sousa, C.** 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433: 887-892.
- Serrano, A;Garcia, A;Abril, E;Garrido, F. and Ruiz-Cabello, F.** 1996. Methylated cpg points identified within MAGE-1 promoter are involved in gene repression. *Int J Cancer* 68: 464-470.
- Shah, K.V.** 2006. SV40 and human cancer : a review of recent data. *Int J Cancer* 120: 215-223.
- Soini, Y;Kinnula, V;Kaarteenaho-Wiik, R;Kurttila, E;Linnainmaa, K. and Pääkkö, P.** 1999. Apoptosis and expression of apoptosis regulating proteins BCL-2, MCL-1, BCL-x, and BAX in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 5: 3508-3515.
- Sallusto F., Schaerli P., Loetscher P., Schaniel C., Lenig D., Mackay C.R., Qin S. and Sandberg A.A. and Bridge J.A.** 2001. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 127: 93-110.
- Scanlan M.J., Simpson A.J.G. and Old L.J.** 2004.The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 4: 1-2.
- Schoenberger S.P., Toes R.E., van der Voort E.I., Offringa R. and Melief C.J.** 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393: 480-483.
- Schott M.** 2006. Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocr Relat Cancer* 13: 779-795.

- Schumacher K., Haensch W., Roefzaad C. and Schlag P.M.** 2001. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 61: 3932-36.
- Sebastien P., Janson X., Gaudichet A., Hirsch A. and Bignon J.** 1980. Asbestos retention in human respiratory tissues: comparative measurements in lung parenchyma and in parietal pleura. *IARC Sci Publ* 28: 237-246.
- Selikoff I.J., Hammond E.C. and Seidman H.** 1980. Latency of asbestos disease among insulation workers in the united states and canada. *Cancer* 46: 2736-2740.
- Seregni E., Coli A. and Mazzucca N.** 2004. Circulating tumour markers in breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31 Suppl 1: S15-22.
- Serwold T., Gonzalez F., Kim J., Jacob R. and Shastri N.** 2002. Eraap customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419: 480-483.
- Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J. and Schreiber R.D.** 2001. Ifngamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-1111.
- Siegel F.P., Kadowaki N., Shodell M., Fitzgerald-Bocarsly P.A., Shah K., Ho S., Antonenko S. and Liu Y.J.** 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835-1837.
- Sigalotti, L., Coral, S., Nardi, G., Pessoto, A., Cortini, E., Cattarossi, I., Colizzi, F., altomonte, M. and Maio, M.** 2002. Promoter methylation controls the expression of MAGE-2,3 and 4 genes in human cutaneous melanoma. *J Immunother* 25: 16-26.
- Sigalotti L., Coral S., altomonte M., Natali L., Gaudino G., Cacciotti P., Libener R., Colizzi F., Vianale G., Martini F., Tognon M., Jungbluth A., Cebon J., Maraskovsky E., Mutti L. and Maio M.** 2002. Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications. *Br J Cancer* 86: 979-982.
- Sigalotti, L., Fratta, E., Coral, S., Tanzarella, S., Danielli, R., Colizzi, F., Fonsatti, E., Traversari, C., altomonte, M., and Maio, M.** 2004. Intratumor heterogeneity of cancer /testis antigens expression in human. *Cancer Res.* 15: 9167-71.
- Sims, R.J., Nishioka, K., and Reinberg, D.** 2003. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 19: 629-639
- Smyth M.J., Swann J., Cretney E., Zerafa N., Yokoyama W.M. and Hayakawa Y.** 2005. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med* 202: 583-588.
- Smyth M.J., Thia K.Y., Street S.E., Cretney E., Trapani J.A., Taniguchi M., Kawano T., Pelikan S.B., Crowe N.Y. and Godfrey D.I.** 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191: 661-668.
- Snijdewint F.G., von Mensdorff-Pouilly S., Karuntu-Wanamarta A.H., Verstraeten A.A., van Zanten-Przybysz I., Hummel P., Nijman H.W., Kenemans P. and Hilgers J.** 1999. Cellular and humoral immune responses to MUC-1 mucin and tandem-repeat peptides in ovarian cancer patients and controls. *Cancer Immunol Immunother* 48: 47-55.

- Spirtas, R., Heineman, EF, Bernstein, L., Beebe, GW, Keehn, RJ. And Stark, A.** 1994. Malignant Mesothelioma : attributable risk of asbestos exposure. *Occup Environ Med* 51: 804-11.
- Sozzani S., allavena P., D'Amico G., Luini W., Bianchi G., Kataura M., Imai T., Yoshie O., Bonecchi R. and Mantovani A.** 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161: 1083-1086.
- Spisek R., Bretaudeau L., Barbieux I., Meflah K. and Gregoire M.** 2001. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 50: 417-427.
- Spugnini E.P., Bosari S., Citro G., Lorenzon I., Cognetti F. and Baldi A.** 2006. Human malignant mesothelioma: molecular mechanisms of pathogenesis and progression. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 2000-2004.
- Steinbach D., Schramm A., Eggert A., Onda M., Dawczynski K., Rump A., Pastan I., Wittig S., Pfaffendorf N., Voigt A., Zintl F. and Gruhn B.** 2006. Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 12: 2434-2441.
- Steinman R.M.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296.
- Steinman R.M.** 2003. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris)* 51: 59-60.
- Stenton, S.C.** 1997. Simian virus 40 and malignant Mesothelioma. *Thorax* 52 (Suppl 3): S52-S57.
- Stewart S.A. and Weinberg R.A.** 2006. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 531-557.
- Street S.E.A., Trapani J.A., MacGregor D. and Smyth M.J.** 2002. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 196: 129-134.
- Sugarbaker D.J., Flores R.M., Jaklitsch M.T., Richards W.G., Strauss G.M., Corson J.M., DeCamp M.M.J., Swanson S.J., Bueno R., Lukanich J.M., Baldini E.H. and Mentzer S.J.** 1999. Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients.. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117: 54-63; discussion 63-5.
- Taieb J., Chaput N., Menard C., Apetoh L., Ullrich E., Bonmort M., Pequignot M., Casares N., Terme M., Flament C., Opolon P., Lecluse Y., Metivier D., Tomasello E., Vivier E., Ghiringhelli F., Martin F., Klatzmann D., Poynard T., Tursz T., Raposo G., Yagita H., Ryffel B., Kroemer G. and Zitvogel L.** 2006. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 12: 214-219.
- Takahashi T., Makiguchi Y., Hinoda Y., Kakiuchi H., Nakagawa N., Imai K. and Yachi A.** 1994. Expression of MUC-1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC-1 from a multiple myeloma patient. *J Immunol* 153: 2102-2109.

- Takeda K., Smyth M.J., Cretney E., Hayakawa Y., Kayagaki N., Yagita H. and Okumura K.** 2002. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195: 161-169.
- Talanian R.V., Yang X., Turbov J., Seth P., Ghayur T., Casiano C.A., Orth K. and Froelich C.J.** 1997. Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J Exp Med* 186: 1323-1331.
- Tarro G., Perna A. and Esposito C.** 2005. Early diagnosis of lung cancer by detection of tumor liberated protein. *J Cell Physiol* 203: 1-5.
- Taylor-Papadimitriou J., Burchell J.M., Plunkett T., Graham R., Correa I., Miles D. and Smith M.** 2003. MUC-1 and the immunobiology of cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 209-221.
- Ten Berge R.L., Snijdewint F.G., von Mensdorff-Pouilly S., Poort-Keesom R.J., Oudejans J.J., Meijer J.W., Willemze R., Hilgers J. and Meijer C.J.** 2001. MUC-1 is preferentially expressed by ALK positive anaplastic large cell lymphoma, in the normally glycosylated or only partly hypoglycosylated form. *J Clin Pathol* 54: 933-939.
- Thomas A.M., Santarsiero L.M., Lutz E.R., Armstrong T.D., Chen Y., Huang L., Laheru D.A., Goggins M., Hruban R.H. and Jaffee E.M.** 2004. Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of *in vivo* cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J Exp Med* 200: 297-306.
- Thomas L.** 1959. In Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. *Lawrence* 3: 529-532.
- Thomas W.D. and Hersey P.** 1998. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol* 161: 2195-2200.
- Tomek, S. and Manegold, C.** 2004. Chemotherapy for malignant pleural Mesothelioma : past results and recent developments. *Lung Cancer* 45S: S103-S119.
- Topalian S.L., Gonzales M.I., Parkhurst M., Li Y.F., Southwood S., Sette A., Rosenberg S.A. and Robbins P.F.** 1996. Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med* 183: 1965-1971.
- Touret N., Paroutis P., Terebiznik M., Harrison R.E., Trombetta S., Pypaert M., Chow A., Jiang A., Shaw J., Yip C., Moore H., van der Wel N., Houben D., Peters P.J., de Chastellier C., Mellman I. and Grinstein S.** 2005. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123: 157-170.
- Tossavainen, A.** 2004. Global use of asbestos and the incidence of Mesothelioma. *Int J Occup Environ Health* 10: 22-25.
- Trombetta E.S. and Mellman I.** 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and *in vivo*. *Annu Rev Immunol* 23: 975-1028.
- Tsang K., Palena C., Gulley J., Arlen P. and Schlom J.** 2004. A human cytotoxic T-lymphocyte epitope and its agonist epitope from the nonvariable number of tandem repeat sequence of MUC-1. *Clin Cancer Res* 10: 2139-2149.

- Turner J.G., Rakhmievich A.L., Burdelya L., Neal Z., Imboden M., Sondel P.M. and Yu H.** 2001. Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells. *J Immunol* 166: 89-94.
- Uematsu K., Kanazawa S., You L., He B., Xu Z., Li K., Peterlin B.M., McCormick F. and Jablons D.M.** 2003. Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of dishevelled overexpression and transcriptional activity of beta-catenin. *Cancer Res* 63: 4547-4551.
- Upadhyay D. and Kamp D.W.** 2003. Asbestos-induced pulmonary toxicity: role of DNA damage and apoptosis. *Exp Biol Med* 228: 650-659.
- Van Kaick, G;Dalheimer, A;Hornik, S;Kaul, A;Liebermann, D;Lühns, H;Spiethoff, A;Wegener, K. and Wesch, H.** 1999. The german thorotrast study: recent results and assessment of risks. *Radiat Res* 152: S64-71.
- Van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., Lurquin C., De Plaen E., Van den Eynde B., Knuth A. and Boon T.** 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647.
- Van der Bruggen, P., Bastin, J., Gajewski, T., Coulie, P.G., Boel, P., De Smet, C., Traversari, C., Townsend, A. and Boon, T.** 1994. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur J Immunol* 24: 3038-83.
- Versnel M.A., Claesson-Welsh L., Hammacher A., Bouts M.J., van der Kwast T.H., Eriksson A., Willemsen R., Weima S.M., Hoogsteden H.C. and Hagemeyer A.** 1991. Human malignant mesothelioma cell lines express PDGF beta-receptors whereas cultured normal mesothelial cells express predominantly PDGF alpha-receptors. *Oncogene* 6: 2005-2011.
- Viatte S., Alves P.M. and Romero P.** Reverse immunology approach for the identification of CD8 t-cell-defined antigens: advantages and hurdles. *Immunol Cell Biol* 84: 318-330.
- Vieira, P L;de Jong, E C;Wierenga, E A;Kapsenberg, M L. and Kalinski, P.** Development of Th1- inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* 164: 4507-4512.
- Villar-Garea.** 2004. Esteller.Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int. J. Cancer* 112: 171-178.
- Villegas F.R., Coca S., Villarrubia V.G., Jimenez R., Chillon M.J., Jareno J., Zuñiga M. and Callol L.** 2002. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35: 23-28.
- Vincent M.S., Leslie D.S., Gumperz J.E., Xiong X., Grant E.P. and Brenner M.B.** 2002. CD1- dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol* 3: 1163-1168.
- Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C. and Paoletti P.** 2003. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J.Clin.Onco* 21: 2636-44

- Von Mensdorff-Pouilly S., Gourevitch M.M., Kenemans P., Verstraeten A.A., Litvinov S.V., van Kamp G.J., Meijer S., Vermorken J. and Hilgers J.** 1996. Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in patients with benign and malignant breast tumours. *Eur J Cancer* 32: 1325-1331.
- Wagner J.C., Sleggs C.A. and Marchand P.** 1960. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the north western cape province. *Br J Ind Med* 17: 260-271.
- Waite K. and Gilligan D.** 2007. The role of radiotherapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Clin Oncol* 19: 182-187.
- Walzer T., Dalod M., Robbins S.H., Zitvogel L. and Vivier E.** 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106: 2252-2258.
- Wang N.S., Huang S.N. and Gold P.** 1979. Absence of carcinoembryonic antigen-like material in mesothelioma: an immunohistochemical differentiation from other lung cancers. *Cancer* 44: 937-943.
- Wang R.F.** 2001. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol* 22: 269-276.
- Watts T.H.** 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23: 23-68.
- Weber, J., Salgaller, M., Samid, D., Johnson, B., Herlyn, M., Lassam, N., Treisman, J., and Rosenberg, S.A.** 1994. Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 54: 1766-71
- Weiser, T.S., Guo, Z.S., Ohnmacht, G.A., Parkhurst, M.L., Tong-On, P., Marincola, F.M., Fischette, M.R., Yu, X., Chen, G.A., Hong, J.A., Stewart, J.H., Nguyen, D.M., Rosenberg, S.AA. and Schrupp, D.S.** 2001. Sequential 5-aza-2'-deoxycytidine - depsipeptide FR901228 treatment induces apoptosis preferentially in cancer cells and facilitates their recognition by cytolytic T lymphocytes specific for NY-ESO-1. *J Immunother* 24: 151-61.
- Weiss LM, Warnke RA, Sklar J. and Cleary ML.** 1987. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 317: 1185-9.
- Wierecky, J, Mueller, M. and Brossart, P.** 2006. Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1. *Cancer Immunol Immunother* 55: 63-7.
- Wischnewski, F., Pantel, K. and Schwarzenbach, H.** 2006. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 4: 339-49.
- Wittel U.A., Goel A., Varshney G.C. and Batra S.K.** 2001. Mucin antibodies - new tools in diagnosis and therapy of cancer. *Front Biosci* 6: 1296-310.
- Wolfers J., Lozier A., Raposo G., Regnault A., They C., Masurier C., Flament C., Pouzieux S., Faure F., Tursz T., Angevin E., Amigorena S. and Zitvogel L.** 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for cI cross-priming. *Nat Med* : 7: pp. 297-303.
- Wong L., Zhou J., Anderson D. and Kratzke R.A.** 2002. Inactivation of p16-INK4a expression in malignant mesothelioma by methylation. *Lung Cancer* 38: 131-136.

**Yegles M., Saint-Etienne L., Renier A., Janson X. and Jaurand M.C.** 1993. Induction of metaphase and anaphase/telophase abnormalities by asbestos fibers in rat pleural mesothelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 186-191.

**Yokokawa J., Palena C., Arlen P., Hassan R., Ho M., Pastan I., Schlom J. and Tsang K.Y.** 2005. Identification of novel human CTL epitopes and their agonist epitopes of mesothelin. *Clin Cancer Res* 11: 6342-6351.

**Yu Y., Hagihara M., Ando K., Gansuud B., Matsuzawa H., Tsuchiya T., Ueda Y., Inoue H., Hotta T. and Kato S.** 2001. Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. *J Immunol* 166: 1590-1600.

**Yuen M. and Lai C.** 2005. Serological markers of liver cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19: 91-99.

**Zanella C.L., Posada J., Tritton T.R. and Mossman B.T.** 1996. Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 56: 5334-38.

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

**Zitvogel L., Tesniere A. and Kroemer G.** 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6: 715-727.

**Zucali P.A. and Giaccone G.** 2006. Biology and management of malignant pleural mesothelioma. *Eur J Cancer* 42: 2706-2714.

Vu, le Président du jury

Vu, le Directeur de thèse

Vu, le Directeur de l'UFR

**Nom-Prénom** : DAVID Thomas

**Titre de la thèse** : Effet du 5-aza-2'-désoxycytidine et de l'acide valproïque sur l'expression d'antigènes tumoraux dans le mésothéliome pleural malin

---

### Résumé de la thèse :

Le mésothéliome pleural malin, dont l'incidence est relativement élevée dans le Grand-Ouest de la France et dans le milieu professionnel exposé à l'amiante est difficile à traiter. Le recours à la chirurgie, à la radiothérapie et à la chimiothérapie donne une médiane de survie entre 9 et 12 mois et un taux de guérison extrêmement faible. Ceci impose donc de définir de nouvelles stratégies, associant, par exemple, l'immunothérapie. En l'absence de marqueurs tumoraux immunogènes et spécifiques du mésothéliome, nous montrons que l'administration d'un agent hypométhylant (5-aza-2'-désoxycytidine) combiné à un inhibiteur d'histone désacétylase (acide valproïque) peut contribuer, sur une série de lignées de mésothéliome, à favoriser l'induction *de novo* ou la surexpression de peptides enclanchant des mécanismes immunitaires d'élimination des cellules tumorales. L'utilisation d'un traitement séquentiel avec le 5-aza-2'-désoxycytidine et l'acide valproïque apparaît donc intéressante dans une approche thérapeutique associée (chimio-immunothérapie).

Nombre total de références : 350

---

**MOTS CLÉS** : mésothéliome, antigènes tumoraux, agent hypométhylant, inhibiteur d'histone désacétylases, activation immunitaire.

---

### JURY

**PRÉSIDENT** : M. Jacques AUBRY, Professeur d'Immunologie  
Faculté de Pharmacie de Nantes

**ASSESEURS** : M. Stéphane BIRKLE, Maître de Conférences en Immunologie  
Faculté de Pharmacie de Nantes  
Mlle. Marianne LE PRIELLEC, Pharmacienne  
Rue Camille Saint Saens, résidence le clos Dakar, 56400 Auray

---

**Adresse de l'auteur** : 14, rue des Halles, 44000 Nantes