

Université de Nantes
Faculté de Médecine et Techniques Médicales

Production de cellules dendritiques pour une immunothérapie anti-tumorale

Thèse de Doctorat

Ecole doctorale : Chimie-Biologie
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Immuno-Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

Pierre-Joseph ROYER

Le 29 novembre 2006, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : Karin TARTE, PU-PH, Rennes
Daniel OLIVE, PU-PH, Marseille

Examineur : Nicolas FERRY, Directeur de Recherche, Nantes

Directeur de Thèse : Marc GREGOIRE, Directeur de Recherche, Nantes

Abréviations

ADCC : Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity

AFP : α foetoprotéine

AICD : Activation-Induced Cell Death

APRIL : A Proliferation-Inducing ligand

ATP : Adenosine TriPhosphate

BAFF : B-Cell-Activating Factor

BDCA : Blood Dendritic Cell Antigen

BSA : Bovin Serum Albumin

CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain

CCL : CC-chemokine ligand

CCR : CC-chemokine receptor

CDC : Complement Dependant Cytotoxicity

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

CpG ODN : CpG Oligodeoxynucleotide

CPP : Cell Penetrating Peptide

CTL : Cytotoxic T Lymphocyte

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen-4

DC : Cellule Dendritique

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific ICAM3-grabbing nonintegrin

ERAAP : Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing

ERAD : ER-Associated Degradation system

FLICE : Fas-associated death domain-like IL-1 converting enzyme

FLIP : FLICE Inhibitory Protein

FLT3L : Fms-Like Tyrosine kinase 3 Ligand

FMG : Fusogenic Membran Glycoprotein

FoxP3 : Forkhead Box P3

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

GMP : Good Manufacturing Practice

HEV : High Endothelial Venule

HLA : Human Leucocyte Antigen
 HMGB-1 : High Mobility Group Box-1 Protein
 HO-1 : Heme Oxygenase 1
 HSP : Heat Shock Protein
 IFN : Interferon
 IRF : IFN Regulatory Factor
 ICAM : Intracellular Adhesion Molecule
 IDO : Indolamine 2,3-dioxygenase
 IL : Interleukine
 KLH : Keyhole Limpet Hemocyanine
 LAK : Lymphokine-Activated Killer
 LC : Cellule de Langerhans
 LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1
 Lox-1 : Lectin-like receptor for oxidized-LDL
 LRR : Leucin-Rich-Repeat
 MCM : Monocyte Conditioned Medium
 MICA/B : MHC class I-related Chain A/B
 MIP : Macrophage Inflammatory Protein
 MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1
 MMP : Matrix MetalloProteinase
 MMR : Macrophage Mannose Receptor
 NK : Natural Killer
 NKG2D : Natural Killer Group protein 2 D
 NOD : Nucleotide-biding Oligomerization Domain
 PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns
 PAP : Prostatic Antigen Phosphatase
 PBS : Phosphate Buffered Saline
 PGE2 : Prostaglandine E2
 PI-9 : serine Protease Inhibitor-9
 PRR : Pattern-Recognition Receptor
 PSA : Prostate-Specific Antigen
 RANTES : Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted
 SMAC : Supramolecular Activation Cluster (cSMAC : central SMAC, pSMAC : peripheral SMAC)

TAP : Transporter associated with Antigen Processing

TCR : T Cell Receptor

TGF : Transforming Growth Factor

TIDC : Tumor-Infiltrating DC

TIL : Tumor-Infiltrating Lymphocyte

TIR : Toll/IL-1R homology domain

TNF : Tumor Necrosis Factor

TLR : Toll Like Receptor

Treg : Lymphocyte T regulateur

Sommaire

INTRODUCTION :	7
I. BIOLOGIE DES CELLULES DENDRITIQUES	8
<i>I.1. Les différentes sous-populations de DC</i>	10
<i>I.2. Recrutement des DC vers les tissus périphériques</i>	12
<i>I.3. Internalisation des antigènes</i>	13
L'endocytose	13
La phagocytose	13
La macropinocytose	14
<i>I.4. Apprêtement des antigènes internalisés</i>	14
I.4.1 : Présentation des antigènes sur le CMH de classe I	14
I.4.2 : Présentation des antigènes sur le CMH de classe II	16
I.4.3 : Présentation restreinte au système CD1	18
<i>I.5. Maturation des DC</i>	19
I.5.1 : Maturation par reconnaissance de molécules exogènes	20
I.5.2 : Maturation par reconnaissance de molécules endogènes	23
<i>I.6. Migration des DC vers les ganglions lymphatiques</i>	25
<i>I.7. Interaction DC-lymphocytes T</i>	26
I.7.1 : La synapse immunologique	27
I.7.2 : Activation des lymphocytes T	28
I.7.3 : Induction de la tolérance	29
<i>I.8: Interaction des DC avec les autres populations leucocytaires</i>	30
I.8.1 : DC-NK	30
I.8.2 : DC-Lymphocytes B	31
II: LES CELLULES DENDRITIQUES ET L'IMMUNOTHERAPIE ANTI-TUMORALE	33
<i>II.1. L'immunothérapie passive</i>	33
Les anticorps monoclonaux	33
Les macrophages	34
Les lymphocytes	34
<i>II.2. L'immunothérapie active</i>	35
Vaccination par injection d'antigènes de tumeur	35
Vaccination par injection de cellules tumorales	35
Vaccination par injection de cellules dendritiques	36
<i>II.3. Les DC et la vaccination anti-tumorale</i>	38
<i>II.4. Préparation des cellules dendritiques</i>	40
II.4.1 : Production du vaccin cellulaire	40
A partir de DC isolées <i>in vivo</i>	40
A partir des précurseurs CD34+	40
A partir de monocytes	41
A partir de cellules tumorales	42
II.4.2 : Maturation des DC dérivées de monocytes	43
II.4.3 : Chargement des DC	45
Chargement par peptides	45
Cellules mortes	47
Protéines	48
ADN-ARN	48
Fusion	49
II.4.4 : Posologie et site d'injection	50
<i>II.5. Les conditions de vaccination</i>	53
II.5.1 : La résistance tumorale	53
Défaut de présentation des antigènes	53
Production d'un environnement tumoral immunosuppresseur	54
Les lymphocytes T régulateurs	55
Résistance à l'apoptose	57
II.5.2 : La combinaison de la vaccination avec d'autres traitements	58

RESULTATS.....	62
I. PRODUCTION DE DC POUR UN USAGE CLINIQUE	63
Article: <u>Royer PJ</u> , Tanguy-Royer S, Ebstein F, Sapede C, Simon T, Barbieux I, Oger R, and Gregoire M. Culture Medium and Protein Supplementation in the Generation and Maturation of Dendritic Cells. Scand J Immunol. 2006. 63(6):401-409.	63
II. ANALYSE DE LA PRODUCTION DE DC CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE LAM (LEUCEMIE AIGUE MYELOBLASTIQUE) APRES CHIMIOTHERAPIE	73
Article : <u>Royer PJ*</u> , Bougras G*, Ebstein F, Tanguy-Royer S, Simon T, Morineau N, Chevallier P, Harousseau JL and Gregoire M. Efficient monocyte-derived dendritic cells generation in patients with acute myeloid leukaemia after chemotherapy treatment.....	73
III. PRODUCTION DE CLONES T CD8 DIRIGES CONTRE DEUX EPITOPES DERIVES DE L'AFP (α -FOETOPROTEINE) ET PRESENTES DANS LE CONTEXTE HLA-A*0201	106
III.1. Génération-maturation des DC	108
III.2 Purification des lymphocytes T CD8	109
III.3 Sensibilisation des lymphocytes T CD8 autologues.....	109
III.4 Clonage des lymphocytes T CD8.....	110
III.5. Cytotoxicité des clones CD8-hAFP ₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP ₁₅₈₋₁₆₆	114
III.6. Conclusion :	117
IV. ANALYSE DE L'INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE LA MOLECULE HO-1 (HEME OXYGENASE 1) SUR LA MATURATION DES DC.	118
Article: Chauveau C, Remy S*, <u>Royer PJ*</u> , Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert FX, Tesson L, Brion R, Beriou G, Gregoire M, Josien R, Cuturi MC, Anegon I. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. Blood. 2005 106(5):1694-1702.	118
DISCUSSION-PERSPECTIVES	127
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	133

INTRODUCTION :

L'implication du système immunitaire dans l'élimination des cellules tumorales est un phénomène décrit depuis déjà longtemps. Dès la fin du 19^{em} siècle, William B. Coley observe des régressions tumorales chez des patients atteints d'infections par streptocoques. Il rapporte ensuite le traitement de patients, par inoculation de bactéries vivantes puis d'extraits bactériens, dans ce qui peut être considéré comme la première approche d'immunothérapie. La démarche de Coley reste cependant très empirique et il faudra attendre le développement de l'immunologie fondamentale pour comprendre les mécanismes impliqués. En 1909, Ehrlich formule l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire est capable de réprimer le développement des tumeurs. Beaucoup plus tard, il est suggéré que l'élimination des cellules tumorales fait intervenir l'immunité à médiation cellulaire. Le cancer résulte alors de l'apparition de cellules tumorales associée à une défaillance du système immunitaire, c'est le concept de surveillance immunitaire des tumeurs proposé par Burnet (Burnet, 1967).

Pour que le système immunitaire puisse éliminer spécifiquement des cellules tumorales, il doit reconnaître à leur surface des structures antigéniques distinctes. Le développement tumoral est associé à l'acquisition de mutations génétiques et donc à l'expression de nouveaux antigènes, potentiellement reconnus par le système immunitaire. En 1991, le premier antigène tumoral, MAGE-1, est identifié (van der Bruggen *et al.*, 1991). La mise en évidence de lymphocytes T capables de reconnaître spécifiquement les antigènes tumoraux permet ensuite d'envisager l'immunothérapie anti-tumorale.

Les premiers travaux reposent sur l'injection de lymphocytes T (Kradin *et al.*, 1989). Depuis une dizaine d'années néanmoins, de nombreuses études sont menées pour exploiter le potentiel des cellules dendritiques (DC). Ces cellules sont en effet capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T et d'initier une réponse immune. La maîtrise de leur production *in vitro* à partir de monocytes ou de cellules CD34+, des mécanismes de chargement en antigènes puis d'activation doit permettre leur utilisation en immunothérapie anti-tumorale.

I. Biologie des cellules dendritiques

La défense de l'organisme repose sur une coopération fine entre l'immunité innée et l'immunité acquise. La première ligne de défense est assurée par les cellules de l'immunité innée qui sont par exemple les cellules phagocytaires ou les cellules NK (Natural Killer). Les cellules phagocytaires reconnaissent des motifs partagés entre les différents pathogènes tandis que l'activation des NK repose sur une balance entre signaux activateurs et inhibiteurs. L'immunité acquise, quant à elle, est représentée par les lymphocytes T et B. Elle permet, grâce aux réarrangements géniques, de générer une réponse spécifique d'antigènes et se caractérise par la mise en place d'une mémoire immunitaire.

Les lymphocytes T naïfs sont localisés dans les organes lymphoïdes secondaires alors que les antigènes exogènes contre lesquels ils doivent pouvoir répondre sont principalement situés dans les organes périphériques. En outre, les lymphocytes T ne reconnaissent pas les protéines entières mais des motifs peptidiques particuliers (épitopes) liés aux molécules du CMH. Leur activation nécessite la présentation de l'antigène mais aussi un ensemble de signaux (co-stimulation, cytokines) que la plupart des cellules de l'organisme sont incapables de leur procurer. La sensibilisation des lymphocytes T fait donc intervenir des cellules spécialisées, les CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes), capables d'échantillonner les antigènes présents en périphérie, puis de venir les présenter aux lymphocytes T. Trois types de CPA sont décrits : les macrophages, les lymphocytes B et les DC. Seules les DC sont spécialisées dans la fonction de présentation. Elles sont ainsi qualifiées de CPA professionnelles. Les DC reconnaissent et internalisent les antigènes selon des mécanismes propres à l'immunité innée (reconnaissance de motifs partagés par les pathogènes, phagocytose). Elles peuvent ensuite activer spécifiquement les lymphocytes T et initier une réponse immune primaire, permettant d'établir une mémoire immunitaire (Banchereau et Steinman, 1998; Hart, 1997). Ces propriétés en font des acteurs majeurs de l'immunité, à l'interface entre les réponses innée et acquise.

Les DC sont généralement caractérisées par leurs propriétés d'internalisation et de présentation des antigènes, de migration vers les tissus et les ganglions lymphatiques et d'induction de réponses lymphocytaires. Toutefois, d'autres fonctionnalités peuvent être observées selon la population ou l'état de maturation des DC considérées.

I.1. Les différentes sous-populations de DC

Les premières DC identifiées sont les cellules de Langerhans (LC) en 1868. D'autres types de DC ont ensuite été décrits et le terme DC rassemble aujourd'hui des populations cellulaires assez hétérogènes. Deux voies d'ontogénèse sont à l'origine de ces différentes populations (Paczesny *et al.*, 2003) (figure 1).

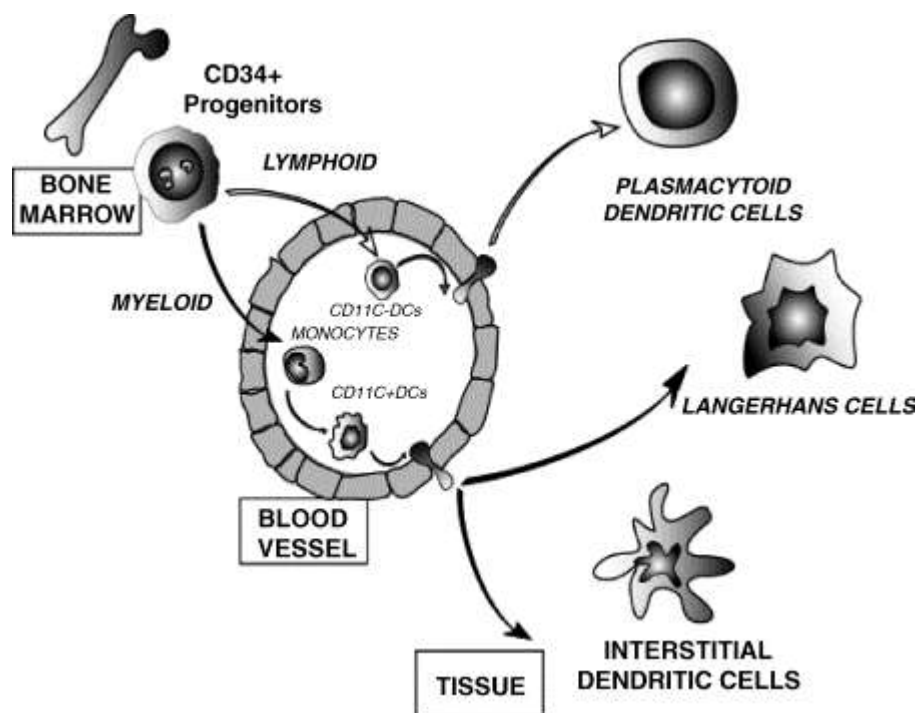


Figure 1 : Les voies d'ontogénèse à l'origine des DC. (D'après Paczesny S. *et al.* 2003).

La voie myéloïde donne naissance aux DC dites conventionnelles, les LC dans l'épithélium stratifié de la peau et les DC interstitielles dans les autres tissus. Elle se caractérise par l'expression de marqueurs de type myéloïde comme CD33 ou CD13 ainsi que par l'expression de CD11c (Briere *et al.*, 2002). En outre, cette voie est dépendante du GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor) et de l'IL-4 (Interleukine 4), ainsi que du TGF β (Transforming Growth Factor β) pour la différenciation en LC (Ito *et al.*, 1999). Les LC se distinguent des DC interstitielles notamment par l'expression de la Langérine

(CD207), qui intervient dans la formation des granules de Birbeck (Valladeau *et al.*, 2000). Les DC interstitielles expriment elles la molécule DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM3-grabbing nonintegrin) (Turville *et al.*, 2002). Les DC dérivées de monocytes *in vitro* (Mo-DC) sont apparentées à cette population. La contribution respective des LC et des DC interstitielles dans le déclenchement de la réponse immune n'est pas encore complètement appréhendée. En particulier, le rôle biologique des LC n'est pas clair. Des études menées chez la souris montrent en effet que l'activation des lymphocytes T naïfs contre des antigènes issus de l'épiderme se fait par une population autre que les LC (Allan *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003). En revanche elles interviendraient dans l'activation des lymphocytes T effecteurs ou mémoires.

La voie lymphoïde inclut, quant à elle, les DC plasmacytoïdes (pDC) qui représentent la première barrière de protection contre l'expansion virale. Cette voie dépend du facteur de croissance Flt3L (Fms-Like Tyrosine kinase 3 Ligand) (Blom *et al.*, 2000). Les pDC expriment notamment à leur surface les molécules BDCA2 et BDCA4, impliquées dans le contrôle de la sécrétion de l'IFN (Interferon) de type I en réponse à une infection virale (Cella *et al.*, 1999; Dzionek *et al.*, 2000; Siegal *et al.*, 1999). Contrairement aux DC myéloïdes, la localisation des pDC est généralement restreinte aux tissus lymphatiques et au sang périphérique (Liu, 2005).

Sur la base de leur capacité à activer préférentiellement une réponse de type Th1 pour les DC myéloïdes et de type Th2 pour les pDC, la nomenclature DC1 et DC2 a été initialement utilisée pour désigner ces deux populations (Rissoan *et al.*, 1999). Elle n'est cependant plus d'actualité puisque l'induction de réponses Th1 par les DC plasmacytoïdes a été depuis rapportée (Bendriss-Vermare *et al.*, 2005; Cella *et al.*, 2000).

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

I.2. Recrutement des DC vers les tissus périphériques

Le recrutement des DC vers les tissus périphériques est un phénomène très rapide. Des expériences menées chez la souris mettent en évidence une migration de DC immatures au niveau des sites inflammés dès 1h après injection d'agents pathogènes (McWilliam *et al.*, 1994). Ces DC, provenant du sang ou des tissus environnants, sont attirées principalement par les chimiokines inflammatoires produites par les cellules endothéliales ou épithéliales (Rollins, 1997). La présence de récepteurs aux chimiokines, à la surface des DC, détermine leur capacité de migration. Ainsi, les LC qui expriment la molécule CCR6 (CC Chemokine Recepteur 6) migrent en réponse à la chimiokine MIP-3 α (Macrophage Inflammatory Protein 3 α). Les DC du sang CD11c⁺ ou les Mo-DC n'expriment pas, quant à elles, le récepteur CCR6. Elles sont néanmoins capables de répondre à d'autres chimiokines telles que MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), MIP-1 α ou RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted), grâce respectivement à leurs récepteurs CCR2 et CCR1 ou CCR5 (Caux *et al.*, 2000; Dieu-Nosjean *et al.*, 2000; Dieu *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998). Plus généralement, diverses molécules montrent aussi des propriétés attractives sur les DC immatures. Ce sont par exemples la protéine C1q du complément (Vegh *et al.*, 2006), les anaphylatoxines (Gutzmer *et al.*, 2006), des peptides formylés dérivés de bactéries (Sozzani *et al.*, 1995) ou les défensines (Yang *et al.*, 2000).

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

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

I.3. Internalisation des antigènes

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

L'endocytose

Ce mécanisme permet l'internalisation de macromolécules, grâce à la formation d'un réseau de clathrine ou de calvéoline permettant la formation de vésicules d'endocytose (Roth, 2006). Différents récepteurs en assurent la spécificité : les récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines capables de fixer les complexes immuns (Fanger *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2001), les récepteurs aux protéines de choc thermique tels CD91 ou Lox-1 (Lectin-like receptor for oxidized-LDL) (Basu *et al.*, 2001; Delneste *et al.*, 2002), les récepteurs de type scavenger comme CD36 (Peiser *et al.*, 2002), ou les récepteurs de la famille des lectines tel le récepteur MMR (Macrophage-Mannose Receptor), DEC-205, la langerine, ou encore DC-SIGN (Engering *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 1995; Sallusto *et al.*, 1995; Valladeau *et al.*, 2000).

La phagocytose

C'est un processus dépendant de l'actine capable d'internaliser de larges particules ou pathogènes ($\geq 1\mu\text{m}$). Bien que les propriétés de phagocytose des DC soient faibles par rapport à celles des macrophages, elles sont dotées de différents récepteurs leur permettant de reconnaître et d'internaliser un matériel très divers. Ainsi, les cellules apoptotiques ou nécrotiques sont phagocytées *via* les récepteurs au complément, la molécule de surface CD14, les intégrines $\alpha\text{v}\beta 3$ et $\alpha\text{v}\beta 5$, ou les récepteurs de type scavenger comme CD36 ou CD68 (Albert *et al.*, 1998a; Berard *et al.*, 2000; Rubartelli *et al.*, 1997; Shaif-Muthana *et al.*, 2000; Subklewe *et al.*, 2001) (Savill et Fadok, 2000). La phagocytose permet aussi l'internalisation

de complexes immuns (Fanger *et al.*, 1996) ou de pathogènes (Blank *et al.*, 1993; Gildea *et al.*, 2001; Inaba *et al.*, 1993; Romagnoli *et al.*, 2004; Uronen-Hansson *et al.*, 2004).

La macropinocytose

La macropinocytose, qui dépend aussi de l'actine, permet aux DC de concentrer des substances extracellulaires à l'intérieur de vacuoles cytoplasmiques (Norbury, 2006; Sallusto *et al.*, 1995).

I.4. Apprêtement des antigènes internalisés

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

I.4.1 : Présentation des antigènes sur le CMH de classe I

Les protéines destinées à cette voie de présentation sont ubiquitinyllées dans le cytosol, i.e. marquées par des molécules d'adressage, puis dégradées par le protéasome et diverses peptidases (Trombetta et Mellman, 2005). Les peptides générés accèdent alors *via* le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing) au réticulum endoplasmique. Là, ils sont clivés par la protéase ERAAP (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing ou ERAP 1) en peptides de 9 à 10 acides aminés qui seront apprêtés sur les molécules du CMH-I (Serwold *et al.*, 2002) (figure 2).

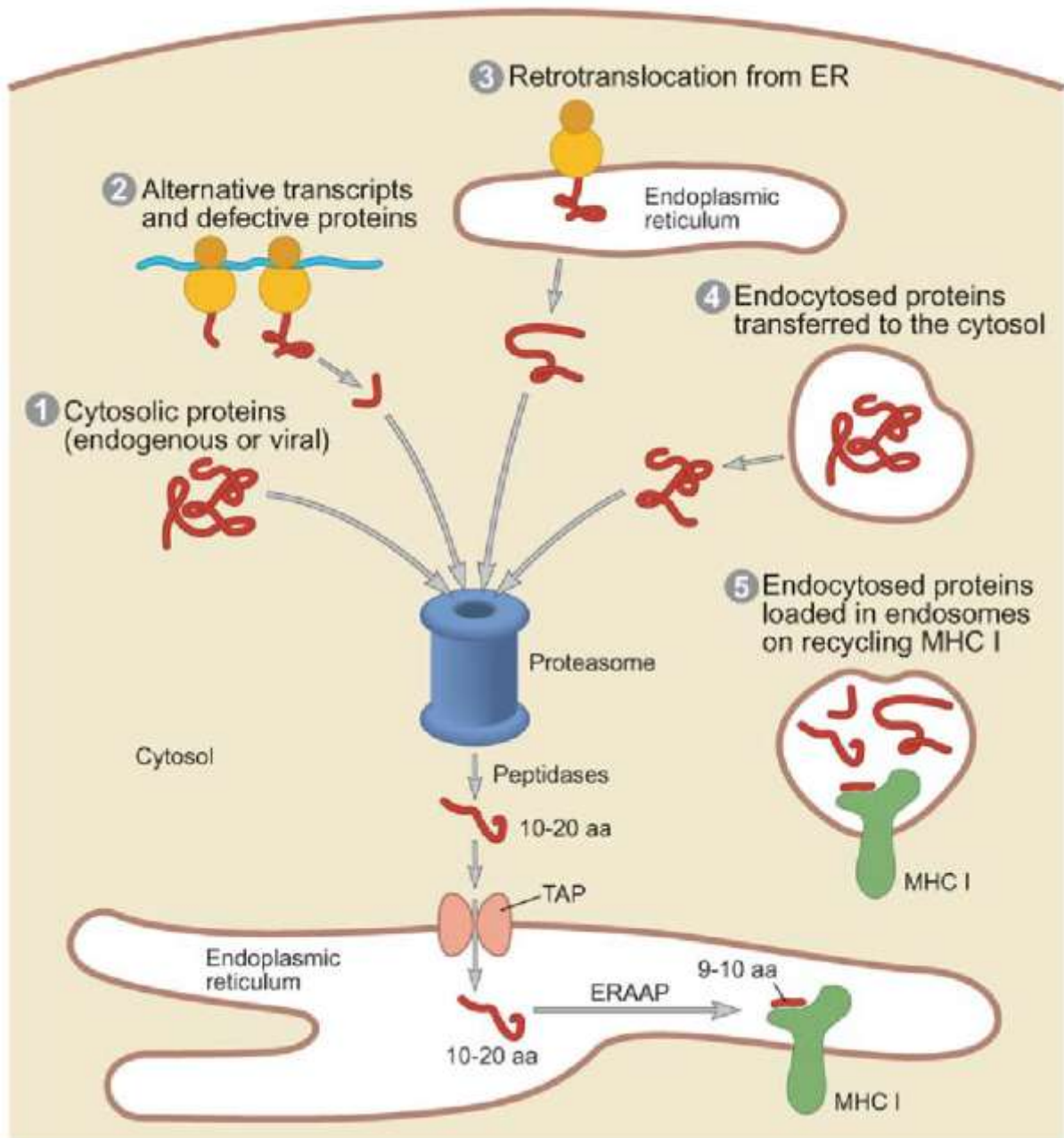


Figure 2 : Les voies d'accès au CMH de classe I. (D'après Trombetta E.S. et Mellman I. 2005).

Le CMH de classe I est spécialisé dans la présentation de peptides endogènes. Cependant, les DC sont également capables de présenter des peptides exogènes internalisés sur le CMH-I grâce au processus de présentation croisée (Albert *et al.*, 1998b). Cette voie est quantitativement moins importante que la présentation endogène. Elle est néanmoins essentielle pour générer une réponse lymphocytaire T CD8 contre les cellules tumorales ou les pathogènes qui n'infectent pas les DC. Différents mécanismes permettent aux antigènes internalisés d'accéder au CMH-I. Ils peuvent être transférés des vésicules d'internalisation vers le cytosol grâce au système ERAD (ER-Associated Degradation system), qui reposerait sur la fusion des vésicules d'endocytose avec le réticulum endoplasmique (Guermónprez *et al.*, 2003). Les antigènes seraient alors transférés des vésicules d'endocytose vers le cytoplasme des DC par le canal Sec61 (Inaba et Inaba, 2005) et suivraient ensuite la voie protéasome/TAP/réticulum endoplasmique. La contribution de cette voie dans le processus de présentation croisée reste cependant discutée (Groothuis et Neefjes, 2005; Touret *et al.*, 2005).

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

I.4.2 : Présentation des antigènes sur le CMH de classe II

Les peptides présentés sur le CMH de classe II sont principalement issus d'antigènes exogènes internalisés par phagocytose, macropinocytose ou endocytose (figure 3). Le chargement sur le CMH-II pourrait alors se faire dans les endosomes tardifs ou les lysosomes. Les enzymes lysosomiales contenues dans ces vésicules assurant alors le découpage des protéines avant leur chargement sur le CMH-II (Neijssen *et al.*, 2005). Néanmoins, les protéines endogènes cytosoliques ont aussi accès aux lysosomes et donc au chargement sur le CMH-II. La dichotomie initialement établie entre la présentation de protéines endogènes par le CMH-I et la présentation de protéines exogènes par le CMH-II est donc aujourd'hui remise en cause. Ces deux voies se distinguent en fait plus par leur rôle physiologique.

La présentation des antigènes sur le CMH-I ou le CMH-II peut être régulée selon différentes modalités. Par exemple, l'internalisation *via* le récepteur DEC-205 améliore la présentation des antigènes (Bonifaz *et al.*, 2004) et le ciblage de lox-1 par des HSP (Heat Shock Protein) favorise la présentation croisée (Delneste *et al.*, 2002). Elle peut aussi être régulée quantitativement, au cours de la maturation des DC, par une synthèse de protéases et de molécules du CMH (Cella *et al.*, 1997; Rescigno *et al.*, 1998) et qualitativement, par génération de nouveaux épitopes par l'immunoprotéasome (Chapiro *et al.*, 2006).

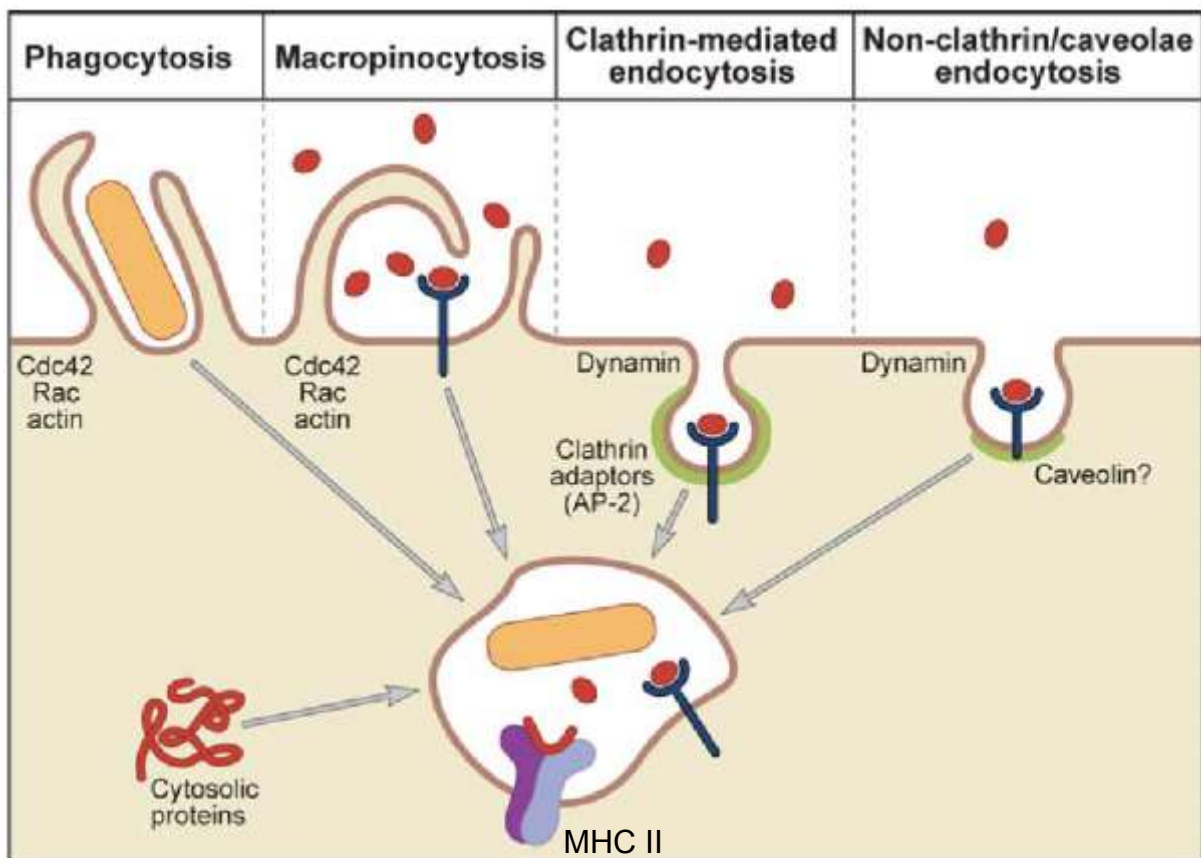


Figure 3 : Les voies d'accès au CMH de classe II. (D'après Trombetta E.S. et Mellman I. 2005).

I.4.3 : Présentation restreinte au système CD1

Outre les molécules du CMH-I et du CMH-II, les DC expriment une troisième classe de molécules impliquées dans la présentation aux lymphocytes T, les molécules CD1. Chez l'homme, 4 isoformes sont identifiées CD1a, b, c et d. Comme pour le CMH-I, les molécules CD1 sont associées à la β 2-microglobuline (Vincent *et al.*, 2003). Elles sont impliquées dans la présentation d'antigènes lipidiques d'origine endogène ou exogène.

I.5. Maturation des DC

Les DC disposent de nombreux récepteurs capables de reconnaître des molécules dérivées de pathogènes (molécules exogènes) ou des molécules endogènes produites en dehors de tout contexte infectieux. Ces dernières peuvent être issues de l'environnement tumoral. La reconnaissance de ces molécules peut se traduire par la maturation des DC, caractérisée notamment par la perte des capacités de phagocytose, le développement d'extensions cytoplasmiques, la migration vers les organes lymphoïdes ou encore l'expression de molécules membranaires et de cytokines (figure 4).

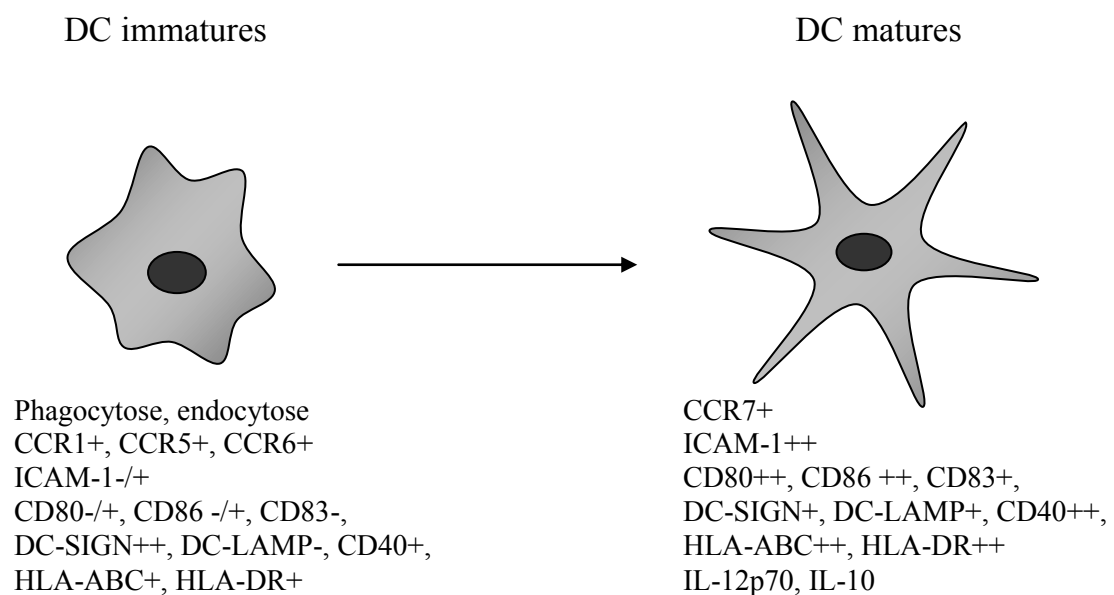


Figure 4 : Propriétés des cellules dendritiques immatures et matures.

I.5.1 : Maturation par reconnaissance de molécules exogènes

Le mécanisme de reconnaissance des pathogènes par le système immunitaire inné est très rudimentaire en comparaison de la reconnaissance lymphocytaire et la diversité du répertoire généré par les réarrangements géniques. Il n'est cependant pas complètement aspécifique, comme considéré originellement. En fait le système inné reconnaît des motifs conservés entre les différents agents pathogènes, les PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) grâce à des récepteurs particuliers, les PRR (Pattern-Recognition Receptors) (Akira *et al.*, 2006).

Le groupe le plus important des PRR est constitué par les TLR (Toll Like Receptor). Ces récepteurs sont apparentés à la protéine Toll, initialement identifiée chez la drosophile, qui intervient dans la polarisation dorso-ventrale au stade larvaire et dans la réponse contre les bactéries ou les champignons chez l'adulte (Lemaitre, 2004). Les TLR se caractérisent par un domaine extracellulaire comportant des motifs LRR (Leucin-Rich-Repeat), qui interviennent dans l'interaction avec les pathogènes, et un domaine intracellulaire TIR (Toll/IL-1R homology domain) responsable de la transmission du signal (Akira *et al.*, 2006). Treize TLR sont décrits chez les mammifères (Roach *et al.*, 2005), mais 10 seulement sont exprimés par les DC humaines. Ils leur permettent de reconnaître une grande diversité de molécules issues des pathogènes (table 1). Les TLR capables de reconnaître les acides nucléiques (TLR 3, 7, 8 et 9) sont localisés dans des compartiments intracellulaires. Les autres sont exprimés à la surface des DC (TLR 1, 2, 4, 5 et 6). Par ailleurs, les populations de DC expriment différents panels de récepteurs. Les pDC expriment un répertoire restreint de TLR (TLR1, 6, 7, 9). Les résultats sont plus contradictoires concernant les Mo-DC ou les DC myéloïdes. Les premières études concluent que ces populations n'expriment pas le TLR7 ni le TLR9 (Jarrossay *et al.*, 2001; Kadowaki *et al.*, 2001; Krug *et al.*, 2001). Plus récemment cependant, des auteurs ont mis en évidence, chez les DC myéloïdes, de la présence de l'ARNm codant pour le TLR7 et leur capacité à répondre à l'imiquimod, un ligand spécifique de ce TLR (Ito *et al.*, 2002). L'expression du TLR9 par des DC conventionnelles a par ailleurs été démontrée dernièrement (Hoene *et al.*, 2006).

La reconnaissance des ligands conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B ou IRF (IFN Regulatory Factor). Deux voies de signalisation peuvent être distinguées.

Une première fait intervenir la molécule MyD88, qui peut se fixer au domaine intracellulaire de tous les TLR excepté le TLR3. Elle aboutit à la production de cytokines de type inflammatoire comme le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-2 ou l'IL-6 après fixation de ligands sur les TLR 2 ou 4, et d'IFN de type I après reconnaissance de ligands par les TLR 7 et 9 (Akira *et al.*, 2006). La deuxième voie est indépendante de MyD88. Elle est impliquée dans la signalisation du TLR3 mais aussi dans celle du TLR4 et se traduit par la sécrétion d'IFN de type I.

Les TLR permettent aux DC de reconnaître les pathogènes internalisés ou présents dans le milieu extracellulaire. Néanmoins, les DC doivent aussi être capables de réagir face aux pathogènes qui se sont introduits dans leur cytosol. Deux familles de PRRs sont alors impliquées, les NOD-LRR (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) et les CARD-helicase (Caspase Activation and Recruitment Domain) responsables de la reconnaissance de composés bactériens et viraux (Akira *et al.*, 2006; Inohara *et al.*, 2005).

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

Table 1 : Reconnaissance des composés pathogènes par les TLR. (D'après Akira S. et al. 2006).

I.5.2 : Maturation par reconnaissance de molécules endogènes

Le système immunitaire est initialement perçu comme assurant la discrimination entre le soi et le non soi. Ce concept est réactualisé en 1994 par Matzinger, qui propose une théorie selon laquelle le système immunitaire réagit aux situations "à risque" en détectant la présence de signaux de danger. Ces signaux sont issus des agents pathogènes bien sûr, mais aussi des molécules du soi, par exemple lors d'une inflammation ou de la perte de l'intégrité cellulaire ou tissulaire (figure 5).

Les DC réagissent aux molécules inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-1 et engagent leur programme de maturation (Banchereau et Steinman, 1998). Des signaux provenant de cellules mortes sont aussi capables d'activer les DC (Gallucci *et al.*, 1999; Sauter *et al.*, 2000). Les premières molécules identifiées responsables de cette maturation sont les HSP (Basu *et al.*, 2000; Somersan *et al.*, 2001). Ces protéines chaperonnes sont libérées de manière incontrôlée et en grande quantité en cas de lyse cellulaire. Différentes HSP sont associées à une activation du système immunitaire (HSP 60, HSP 70, HSP 90 et grp96). Elles sont reconnues par les récepteurs Lox-1 ou CD91 mais aussi par les TLR2 ou 4 et par les molécules CD36 ou CD40 (Basu *et al.*, 2001; Delneste *et al.*, 2002; Srivastava, 2002). En 2003, Shi et collaborateurs identifient l'acide urique, molécule issue du métabolisme des bases puriques, comme un signal responsable de l'activation des DC (Shi *et al.*, 2003). Si son mode de fonctionnement est encore mal compris, l'acide urique serait avec les HSP parmi les premiers signaux reçus par les DC, et les plus efficaces pour induire leur activation (Skoberne *et al.*, 2004). D'autres molécules activatrices ont toutefois été identifiées. Ce sont par exemple HMGB-1 (High Mobility Group Box-1 Protein) (Scaffidi *et al.*, 2002), l'ATP (Adenosine TriPhosphate) (Wilkin *et al.*, 2001) ou les espèces actives de l'oxygène (Rutault *et al.*, 1999). Des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour préciser l'effet de ces molécules, d'autant plus que les préparations utilisées peuvent contenir des contaminants d'origine microbienne.

La dégradation de l'architecture tissulaire peut aussi être à l'origine de la maturation des DC. Ainsi, l'héparane sulfate, composant de la matrice extracellulaire, active les cellules *via* le TLR4 (Kodaira *et al.*, 2000). La rupture de vaisseaux sanguins conduit elle à l'activation des DC tissulaires par une arrivée de plaquettes (exprimant le CD40L) ou par la libération de fibrinogène reconnu par le TLR4 (Beg, 2002; Kaneider *et al.*, 2003).

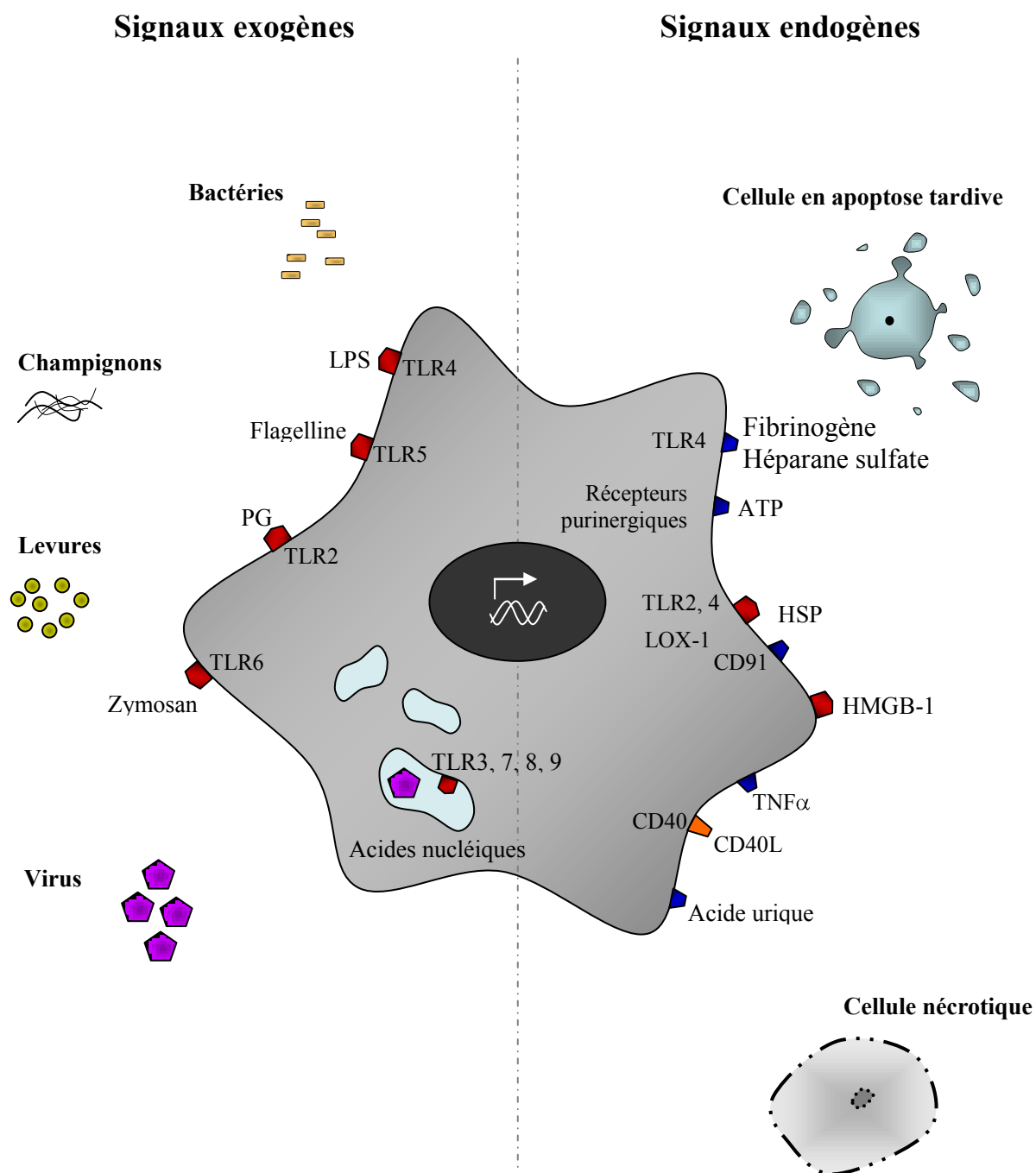


Figure 5 : Les DC et les signaux de danger.

I.6. Migration des DC vers les ganglions lymphatiques

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

L'expression de la molécule CCR7 est donc nécessaire à la migration des DC vers les organes périphériques. Elle permet aux DC de répondre aux chimiokines CCL19 (CC-chemokine ligand 19) et CCL21 produites par les cellules stromales des régions T des ganglions (Kellermann *et al.*, 1999). L'expression de CCR7 n'est cependant pas suffisante pour assurer la migration des DC. Sa fonctionnalité repose sur l'expression membranaire de l'ADP-ribosyl cyclase CD38 (Partida-Sanchez *et al.*, 2004) et sur la présence dans l'environnement de molécules comme PGE2 (prostaglandine E2) (Scandella *et al.*, 2002), les leucotriènes (Robbiani *et al.*, 2000) ou le NO (Giordano *et al.*, 2006). Il a aussi été démontré que la présence de cellules apoptotiques, associée à un signal de maturation (TNF α ou LPS), pouvait induire la migration des DC (Bertho *et al.*, 2005). Aujourd'hui, les mécanismes moléculaires impliqués dans la sensibilisation du récepteur CCR7 restent largement inconnus.

Après contact avec un pathogène, les DC arrivent dans les ganglions en moins de 24h (Legge et Braciale, 2003). Au cours de la migration, le contact avec les chimiokines CCL19 et CCL21 permet de renforcer la maturation des DC et leur capacité à activer les lymphocytes T et à générer une réponse de type Th1 (Marsland *et al.*, 2005). La migration des LC est par contre beaucoup plus lente (3jours). Les LC pourraient de fait être impliquées dans la reconnaissance de pathogènes particuliers, nécessitant une réponse retardée, ou dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T effecteurs et mémoires uniquement au niveau de la peau (Kamath *et al.*, 2002; Villadangos et Heath, 2005). Les pDC sont elles capables d'accéder directement du sang aux ganglions, indépendamment des vaisseaux lymphatiques, mais *via* les HEV (High Endothelial Venules) (Yoneyama *et al.*, 2004).

1.7. Interaction DC-lymphocytes T

Les DC pénétrant dans les ganglions lymphatiques sont dirigées par un gradient de chimiokines vers les aires paracorticales, où elles sécrètent à leur tour des chimiokines comme CCL18 et CCL22, qui attirent par chimiotactisme les lymphocytes T naïfs et mémoires (Visser *et al.*, 2001). L'interaction entre DC et lymphocyte T se traduit par un échange de signaux de co-stimulation ou d'inhibition (figure 6). Elle conduit au "priming" des lymphocytes T et au déclenchement d'une réaction immunitaire ou à leur inactivation.

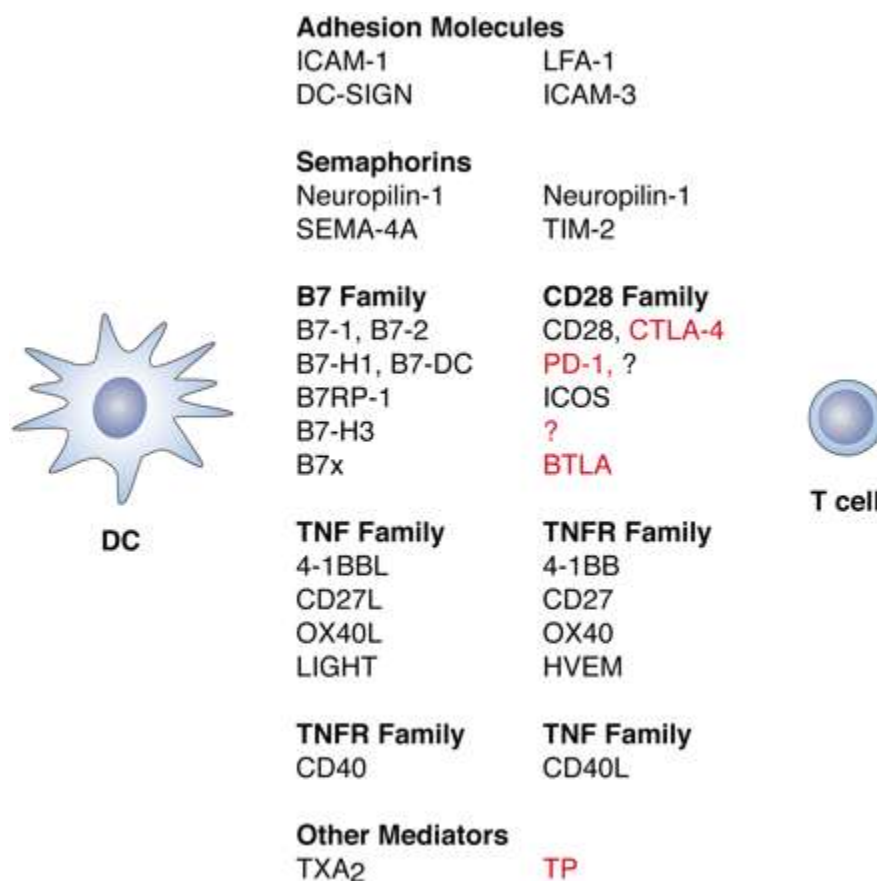


Figure 6 : Les molécules impliquées dans l'interaction T-DC. (D'après O'Neill D. et al. 2004).

1.7.1 : La synapse immunologique

Le contact entre DC et lymphocyte T conduit à une polarisation du cytosquelette d'actine et des microtubules et à la concentration, au sein d'une synapse immunologique, de molécules de présentation, de co-stimulation et d'adhérence (figure 7). La synapse immunologique s'organise en régions concentriques. La partie centrale appelée cSMAC (central Supramolecular Activation Cluster) comprend principalement le TCR, interagissant avec le CMH-peptide, et les molécules de co-stimulation. A la périphérie, se trouve la région pSMAC (peripheral Supramolecular Activation Cluster), composée des molécules d'adhérence, notamment ICAM 1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) et LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) (Friedl *et al.*, 2005).

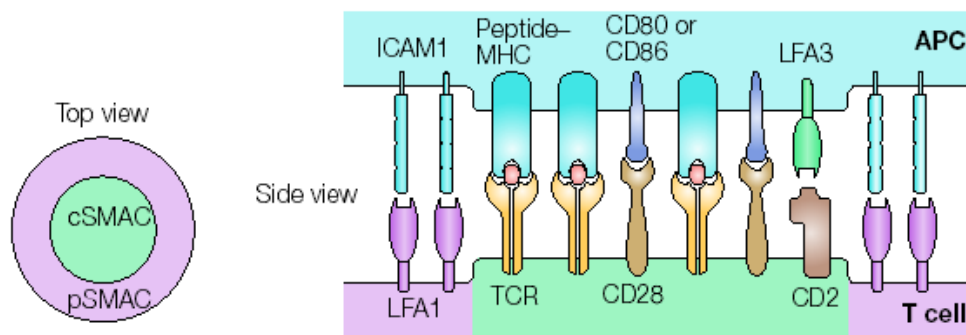


Figure 7 : La synapse immunologique. (D'après Friedl P. *et al.* 2005).

Le rôle biologique de la synapse immunologique n'est pas clairement défini. Une hypothèse est que son organisation spatiale facilite la signalisation entre les lymphocytes T et les DC (Dustin et Cooper, 2000). Mais il a été aussi montré que la signalisation *via* le TCR précède la formation de la synapse (Lee *et al.*, 2002b). Il semble que l'interaction T-DC peut se faire selon différentes modalités qui déterminent la réponse engagée. Par exemple, un priming des lymphocytes T implique des interactions stables avec les DC (plusieurs heures), alors qu'en situation de tolérance, les contacts sont transitoires (quelques minutes) et répétitifs (Hugues *et al.*, 2004).

1.7.2 : Activation des lymphocytes T

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

L'interaction entre DC et lymphocytes T est un processus complexe et ordonné, qui fait intervenir de nombreux signaux membranaires ou solubles habituellement classés en 3 catégories. Le signal 1 consiste en la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Seul, il ne permet pas l'activation des lymphocytes. Il doit être suivi par un signal 2, de co-stimulation, qui fait intervenir les molécules CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) et CD28 (figure 6). Malgré cela, des études ont montré que la présence de lymphocytes T CD4 auxiliaires était nécessaire, lors du "priming", pour l'induction de lymphocytes T CD8 mémoires (Janssen *et al.*, 2003; Shedlock et Shen, 2003; Sun et Bevan, 2003) ou cytotoxiques (Bennett *et al.*, 1998; Ridge *et al.*, 1998). C'est en fait l'interaction CD40/CD40L qui assure cet effet "licensing" (Bennett *et al.*, 1998; Schoenberger *et al.*, 1998), même si d'autres couples de molécules comme LIGHT/HVEM ou 4-1BBL/4-1BB participent à l'activation des lymphocytes T (Croft, 2003; Wiethe *et al.*, 2003). L'expression des molécules de co-stimulation est directement liée à l'état d'activation des lymphocytes. Dès lors, les molécules CD28 et HVEM présentes sur les lymphocytes T naïfs seraient les premières impliquées dans l'interaction avec les DC (Croft, 2003). L'expansion clonale ferait intervenir les protéines CD28 et CD27 et ultérieurement, l'expression des molécules 4-1BB et d'OX40 procurerait des signaux de survie aux lymphocytes T.

Enfin, les DC procurent un signal 3, responsable de l'orientation de la réponse immune. L'activité fonctionnelle des lymphocytes CD4 peut en effet être polarisée vers un type Th1, caractérisé par la sécrétion d'IFN γ et de TNF β , favorisant la différenciation des

lymphocytes T CD8 en lymphocytes T cytotoxiques capables d'éliminer les cellules cibles, ou vers un type Th2, avec sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13, assurant une réponse humorale contre les microorganismes extracellulaires (Murphy et Reiner, 2002). L'orientation de la réponse immune dépend principalement du stimulus de maturation (de Jong *et al.*, 2002; Mazzoni et Segal, 2004) mais aussi d'autres facteurs comme le type de DC impliquées (myéloïdes ou plasmacytoïdes) (Rissoan *et al.*, 1999), la cinétique de la maturation (Langenkamp *et al.*, 2000), la concentration en antigène lors du chargement des DC (Boonstra *et al.*, 2003; Hosken *et al.*, 1995) ou le ratio entre DC et lymphocytes T (Tanaka *et al.*, 2000). D'un point de vue moléculaire, l'IL-12p70 produite en grande quantité après reconnaissance de pathogènes suivie d'une stimulation par CD40L (Krug *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2000) est un élément majeur de la polarisation Th1. Néanmoins, des molécules comme l'IL-23, l'IL-27, l'IL-18, l'IFN (de Jong *et al.*, 2005; Trinchieri *et al.*, 2003), ou l'expression du ligand de Notch Delta favorisent également les réponses Th1. Par contre, la présence du marqueur OX40L (Akiba *et al.*, 2000), du ligand de Notch Jagged (Lehar et Bevan, 2004) ou une forte expression, par les DC, de la molécule CD86 par rapport à CD80 (Kuchroo *et al.*, 1995) sont des inducteurs de réponses Th2.

1.7.3 : Induction de la tolérance

L'implication des DC immatures dans la tolérance périphérique aux antigènes du soi est maintenant bien établie (Steinman *et al.*, 2003). La présentation des antigènes par des DC immatures entraîne ainsi une prolifération abortive et une anergie des lymphocytes T (van Stipdonk *et al.*, 2003). Elle peut aussi promouvoir la tolérance par l'induction des Treg (lymphocytes T régulateurs), capables d'inhiber la réponse immune effectrice grâce à la sécrétion d'IL-10 ou de TGF β (Jonuleit et Schmitt, 2003; Jonuleit *et al.*, 2000). Néanmoins, les DC matures peuvent aussi participer au processus de tolérance (Rutella *et al.*, 2006).

L'exposition des DC à des molécules comme l'IL-10, le TGF β , la vitamine D₃ ou bien les corticostéroïdes peut générer des DC tolérogènes (Lyakh *et al.*, 2005; Stock *et al.*, 2005). En outre, l'interaction entre les molécules CD80 ou CD86 et CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4) se traduit par l'activation de l'IDO (Indolamine 2,3-dioxygenase) (Munn *et al.*, 2004). Cette enzyme intervient dans le métabolisme du

tryptophane. La privation de cet acide aminé ou les métabolites générés inhibent la prolifération des lymphocytes T et induisent leur mort par apoptose.

1.8: Interaction des DC avec les autres populations leucocytaires

1.8.1 : DC-NK

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

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

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

1.8.2 : DC-Lymphocytes B

Les DC matures entraînent la prolifération, la commutation isotypique et la différenciation des lymphocytes B en cellules plasmacytoïdes, par l'intermédiaire de l'expression des molécules d'activation et de survie comme BAFF (B-Cell-Activating Factor) ou APRIL (A Proliferation-Inducing ligand) (Litinskiy *et al.*, 2002; MacLennan et Vinuesa, 2002). De même, les pDC activées engagent la différenciation des lymphocytes B *via* la sécrétion d'IFN α/β et d'IL6 (Jego *et al.*, 2003).

Les propriétés activatrices des DC sont donc intimement liées à leur état d'activation. Elles peuvent d'interagir avec les différentes populations leucocytaires et générer une réponse immune diversifiée (figure 8).

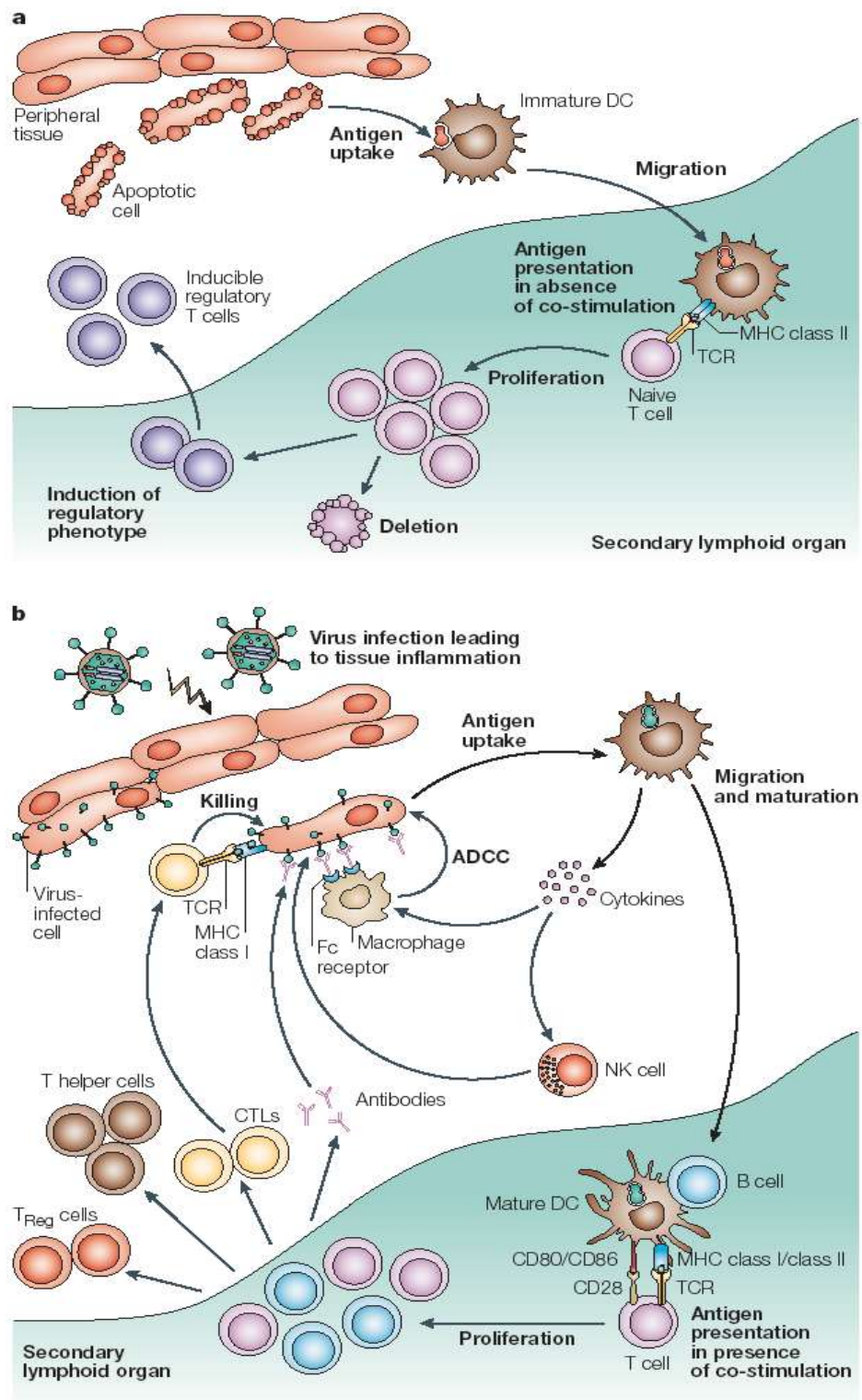


Figure 8 : Interaction des DC (a, immatures ; b, matures) avec les populations leucocytaires et induction de la tolérance ou de réponses immunes. (D'après Bancherau J. et Palucka K., 2005).

II: Les cellules dendritiques et l'immunothérapie anti-tumorale

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

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

II.1. L'immunothérapie passive

Les anticorps monoclonaux

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

Bishop, 2006). Après des premiers résultats cliniques très décevants, une nouvelle ingénierie de production a été établie, avec notamment la mise en place d'anticorps humanisés. Aujourd'hui, les anticorps monoclonaux sont indiqués dans plusieurs types de cancer. Les anticorps anti-HER2 sont utilisés dans le traitement du cancer du sein (Baselga *et al.*, 1996) ou du cancer du poumon à petites cellules (Johnson et Janne, 2006) ; les anticorps anti-CD20 dans celui du lymphome non hodgkinien (Colombat *et al.*, 2001). Une nouvelle approche consiste par ailleurs à "armer" les anticorps en les couplant à des molécules radioactives ou à des drogues anticancéreuses, afin de diriger ces substances au niveau de l'environnement tumoral (Wu et Senter, 2005).

Les macrophages

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

Les lymphocytes

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

représentent une des approches d'immunothérapie les plus intéressante (Benlalam *et al.*, 2006). Dernièrement, des lymphocytes spécifiques de tumeurs, générés *in vitro* à partir de PBMC de patients ont pu être aussi utilisés (Vignard *et al.*, 2005).

II.2. L'immunothérapie active

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

Vaccination par injection d'antigènes de tumeur

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

Vaccination par injection de cellules tumorales

Dans l'idéal, cette vaccination est réalisée avec des cellules tumorales autologues, le patient étant alors immunisé contre tous les antigènes exprimés par sa propre tumeur. Cette méthode est toutefois limitée par la quantité de cellules tumorales disponible. Ainsi, les patients inopérables, dont la tumeur est inaccessible ou ayant de petites lésions ne sont pas éligibles pour une telle thérapie. L'alternative peut être l'établissement d'une lignée tumorale autologue mais encore une fois, cela n'est pas applicable à tous les patients. Dans une étude

concernant 695 patients atteints de différents types de cancer métastatiques, les auteurs ont pu établir des lignées cellulaires à court terme chez seulement 43% des patients (Dillman *et al.*, 2002).

Devant ces difficultés, de nombreux cliniciens s'orientent vers l'utilisation de lignées tumorales allogéniques partageant des antigènes de tumeurs avec les cellules du patient (Morton *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 2002). Ces lignées présentent l'avantage d'être parfaitement disponibles. En outre, cette stratégie réduit la variabilité puisque les patients reçoivent le même vaccin. Par contre, les lignées tumorales utilisées expriment des molécules du CMH de classe I et II allogéniques, qui peuvent générer une réponse immunitaire. Celle-ci doit être distinguée de la réponse anti-tumorale lors de l'immunomonitorage. De plus, la réponse allogénique peut avoir des conséquences sur la vaccination. Une réponse directe, après reconnaissance des molécules allogéniques par les lymphocytes T du patient conduit généralement à la destruction du vaccin, alors qu'une réponse indirecte, après apprêtement des allo-antigènes par les DC du patient, pourra elle soutenir la réponse anti-tumorale générée (Yannelli et Wroblewski, 2004).

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

Vaccination par injection de cellules dendritiques

Depuis le premier essai clinique réalisé en 1996 (Hsu *et al.*, 1996), cette dernière approche s'est considérablement développée et en 2003, 98 essais étaient rapportés, concernant plus de 1000 patients traités (Ridgway, 2003). Aujourd'hui, près de 70 essais en cours sont recensés sur le site <http://www.clinicaltrials.gov/ct>. Si la majorité des essais sont réalisés à partir de DC dérivées de monocytes, il existe *in vitro* de nombreux systèmes de production, de chargement ou de maturation. La vaccination par DC rassemble donc des produits cellulaires assez hétérogènes, qui sont de surcroît injectés selon des modalités et à des doses différentes (Figdor *et al.*, 2004) (figure 9).

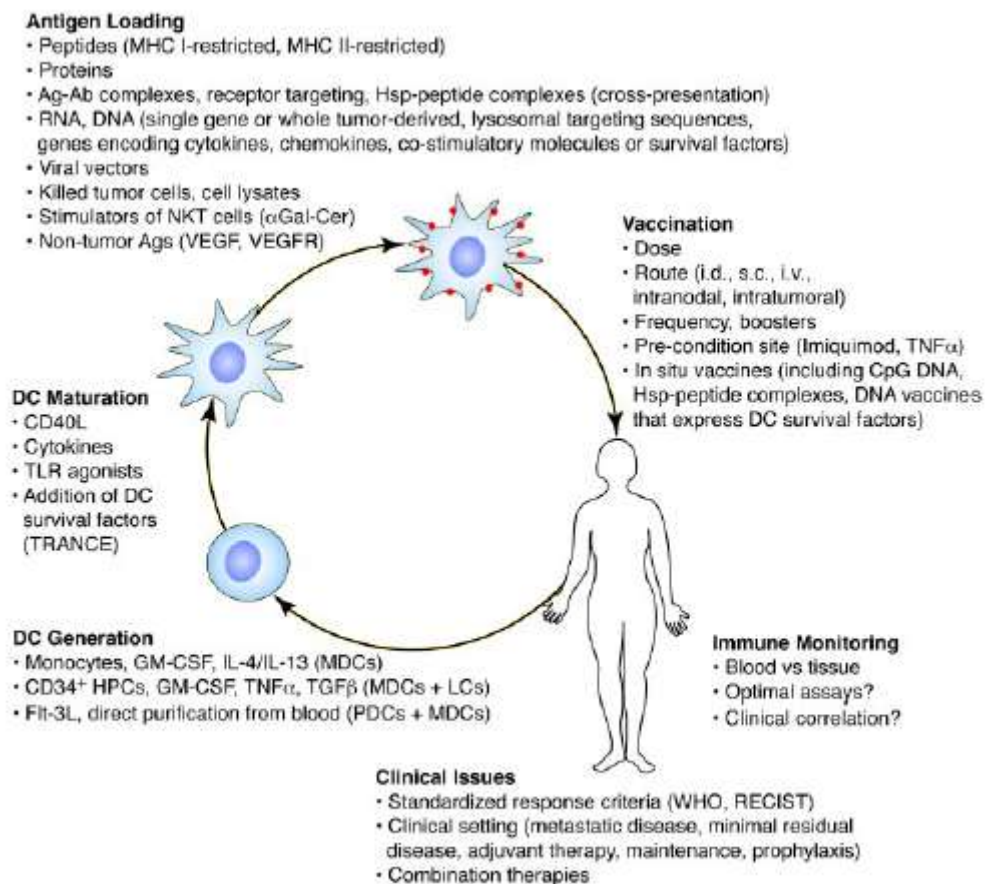


Figure 9 : Les DC et la vaccination anti-tumorale. (D'après O'Neill D. et al. 2004).

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

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

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

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

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

Une autre équipe a réalisé une comparaison DC *versus* placebo chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique réfractaire aux hormones (Small *et al.*, 2006). Les DC utilisées sont purifiées à partir de prélèvements sanguins et sont chargées avec l'antigène PAP (Prostatic Antigen Phosphatase) couplé au GM-CSF. Quatre-vingt deux

patients sont traités avec les DC et 45 reçoivent un placebo. Les auteurs n'observent aucune différence significative dans la progression tumorale. Par contre, la vaccination semble apporter un bénéfice sur la survie des patients (à 36 mois, la survie dans le bras DC est de 34% contre 11% dans le bras placebo).

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

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

II.4. Préparation des cellules dendritiques

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

II.4.1 : Production du vaccin cellulaire

A partir de DC isolées *in vivo*

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

A partir des précurseurs CD34+

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

favoriser la prolifération des précurseurs ou orienter leur différenciation en LC (Strobl *et al.*, 1997).

A partir de monocytes

Actuellement, c'est le mode de production de DC le plus répandu. C'est une stratégie relativement facile à mettre en œuvre et qui permet d'obtenir un grand nombre de cellules. Les monocytes représentent 5 à 15 % des cellules mononuclées du sang et peuvent être facilement purifiés par adhérence au plastique (Thurner *et al.*, 1999), par élutriation (centrifugation à contre-courant) (Faradji *et al.*, 1994) ou par des systèmes de billes magnétiques (Babatz *et al.*, 2003). L'adhérence au plastique est la technique la plus simple mais correspond en fait plus à un enrichissement cellulaire, avec des contaminations par des lymphocytes et un rendement relativement faible. Elle pose aussi des problèmes de standardisation, puisque le taux de pureté varie d'un donneur l'autre. L'élutriation permet elle d'obtenir de manière reproductible une population monocyttaire pure à 80% au moins, avec des rendements de 80% environ. Elle peut se faire en système clos (Berger *et al.*, 2005). Les DC obtenues à partir de monocytes purifiés par adhérence ou par élutriation présentent des capacités de maturation et des propriétés allostimulatrices équivalentes (Berger *et al.*, 2005). C'est donc sur des critères de pureté cellulaire, de rendement et de standardisation que se différencient ces deux techniques. Enfin, le tri magnétique peut être limité par des problèmes de rendements ou de pureté (Felzmann *et al.*, 2003). De plus, après purification positive, la présence de billes résiduelles à la surface des DC peut altérer leur comportement. Une inhibition de la sécrétion d'IL-12p70, en réponse au LPS, a notamment été rapportée (Elkord *et al.*, 2005).

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

A partir de cellules tumorales

Dans le cadre de certaines hémopathies, ce sont les cellules tumorales elles-mêmes qui peuvent être à l'origine des DC. C'est le cas notamment pour la leucémie aiguë myéloblastique, pour laquelle les blastes tumoraux peuvent être différenciés en cellules de type dendritique en présence de GM-CSF et de TNF α (Claxton *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2001; Mohty *et al.*, 2002). Au cours de cette différenciation, l'expression des antigènes est maintenue. Il n'est donc pas nécessaire de réaliser un chargement en antigènes de tumeur.

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

De nouvelles stratégies de production de DC sont bien sûr envisageables et peuvent être évaluées cliniquement. Une équipe a décrit par exemple la différenciation de monocytes en DC, en présence de GM-CSF et d'IL-4, mais en seulement 24h (Dauer *et al.*, 2003; Dauer *et al.*, 2005). Ces fastDC générées ont des propriétés phénotypiques et des capacités de sécrétion de cytokines équivalentes au DC dérivées de monocytes de manière conventionnelle. Le raccourcissement du temps de culture est un avantage non négligeable pour l'immunothérapie. Cette procédure assure aussi de meilleurs rendements et une pureté cellulaire plus importante. En outre, les lymphocytes T effecteurs générés à partir de ces fastDC auraient des capacités cytotoxiques plus fortes.

La population monocyttaire n'est pas homogène. Il est en effet possible de distinguer chez les donneurs sains une population de phénotype CD14⁺/CD16⁻ majoritaire (90% des monocytes environ) et une population CD14⁺/CD16⁺ (Arroyo *et al.*, 2004). Les monocytes de phénotype CD16⁺ favoriseraient une réponse T mémoire de type Th1. Leur proportion peut être largement augmentée dans certains cancers (rein, poumon, colon) (Saleh *et al.*, 1995). Actuellement, la génération des DC est réalisée à partir de la population totale de monocytes, mais un tri préalable des cellules CD16⁺ pourrait être considéré.

Enfin, il a été décrit une population de DC au sein des tumeurs, les TIDC (Tumor-Infiltrated Dendritic Cell) (Preynat-Seauve *et al.*, 2006). Ces DC présentent un statut de maturation intermédiaire. Elles sont capables d'internaliser des antigènes, de répondre à une

stimulation et d'induire des réponses de type CD4 ou CD8. Même si ce point reste discuté (Berhanu *et al.*, 2006), elles pourraient être utilisées pour l'immunothérapie anti-tumorale. Par exemple, il est possible d'imaginer une chimiothérapie induisant la mort des cellules tumorales et ainsi le chargement et la maturation *in situ* des TIDC. Cette stratégie pourrait être aisément mise en place, dans la mesure où il n'y a pas de production *ex vivo* de DC.

II.4.2 : Maturation des DC dérivées de monocytes

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

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

signal comme le $\text{TNF}\alpha$ peut ensuite activer fonctionnellement cette enzyme (Braun *et al.*, 2005). Cet élément doit donc être considéré dans les protocoles d'immunothérapie.

D'autres agents de maturation sont disponibles pour un usage clinique, notamment le CD40L (Schlienger *et al.*, 2003), qui favoriserait la présentation croisée (Delamarre *et al.*, 2003), ou des ligands des TLR. La stimulation des DC par des ligands des TLR induit une maturation phénotypique et s'accompagne d'une sécrétion de cytokines dont l'IL-12p70. La stimulation des DC *via* les TLR présente l'intérêt majeur, pour une immunothérapie anti-tumorale, de pouvoir lever la tolérance T, vraisemblablement par la sécrétion d'IL-6 ou d'IL-12p70 (Pasare et Medzhitov, 2003; Yang *et al.*, 2004). Les molécules peuvent être dérivées du LPS comme OM-197-MP-AC (Veran *et al.*, 2004) ou OM-174 (Pajak *et al.*, 2003). Des combinaisons de ligand de TLR et de cytokines sont aussi disponibles. C'est le cas par exemple pour la combinaison $\text{IFN}\gamma$ +ribomunyl (ligand du TLR4 composé de fractions membranaires et ribosomales de différentes souches bactériennes) (Boccaccio *et al.*, 2002), qui favorise la sécrétion d'IL-12p70 *via* l' $\text{IFN}\gamma$, ou la combinaison $\text{TNF}\alpha$ +poly IC (un ARN double brin synthétique se fixant sur le TLR3) (Spisek *et al.*, 2001). Néanmoins, les ligands des TLR restent actuellement encore peu utilisés dans les protocoles cliniques.

La production de cytokines peut être transitoire et limitée aux premières heures de la maturation (Langenkamp *et al.*, 2002). En particulier, la sécrétion d'IL-12p70 s'arrête après 18h. A ce stade tardif de la maturation, les DC sont qualifiées d'"exhausted", puisqu'elles ne sont plus capables de sécréter de cytokines. Elles favorisent des réponses Th2 ou non polarisées. Il est démontré qu'une exposition très brève (jusqu'à 15 minutes) suffit à engager le processus de maturation. Celui-ci se poursuit alors après que les stimuli de maturation aient été retirés (Spisek *et al.*, 2003). Les DC obtenues présentent donc un phénotype caractéristique de cellules matures. Cependant, elles restent capables de répondre à un deuxième signal de type T (CD40L et $\text{IFN}\gamma$), par une sécrétion d'IL12p70 d'autant plus forte que la première exposition aux agents de maturation a été courte.

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

production pour un usage clinique, les DC sont classiquement exposées 24h au moins aux agents de maturation. Il semble favorable aujourd'hui de diminuer la durée de cette exposition.

II.4.3 : Chargement des DC

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

Chargement par peptides

Ce mode de chargement est largement utilisé dans les essais cliniques, avec principalement des peptides restreints au CMH de classe I (Banchereau *et al.*, 2001; Butterfield *et al.*, 2006; Mackensen *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 1996; Nestle *et al.*, 1998; Schuler-Thurner *et al.*, 2000). Les peptides utilisés dérivent d'antigènes et comptent 9 à 11 acides aminés. Cette stratégie est relativement simple à mettre en place et à évaluer. Elle a permis de démontrer le "proof of concept" de l'immunothérapie à base de DC. Cependant elle présente des limitations évidentes. Elle nécessite l'identification et la caractérisation préalable des épitopes tumoraux. De plus, la restriction antigénique fait qu'elle ne s'applique qu'aux patients d'un haplotype HLA donné. La stabilité du complexe CMH-peptide après chargement est aussi problématique. Les peptides synthétiques, même issus d'épitopes immunodominants, peuvent avoir une faible affinité pour les molécules du CMH, réduisant ainsi leur immunogénicité. Une modification au niveau des résidus d'ancrage permet d'améliorer cette affinité et favorise l'amplification des lymphocytes T (Slansky *et al.*, 2000). Toutefois, il est possible que, parmi les lymphocytes ainsi générés, une forte proportion manifeste peu ou pas d'activité cytotoxique envers les cellules tumorales (Stuge *et al.*, 2004). Une autre option pour augmenter la stabilité des complexes CMH-peptide, est de coupler les peptides tumoraux à des séquences CPP (Cell Penetrating Peptide). Le motif CPP assure alors la pénétration des peptides dans les DC, ainsi que leur processing et leur présentation sur les molécules du CMH. La protection anti-tumorale a été démontrée dans un modèle murin (Wang et Wang, 2002), mais aucune étude n'a encore été réalisée chez l'homme.

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

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

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

Cellules mortes

Cette stratégie repose sur les propriétés physiologiques d'internalisation des DC. L'utilisation de cellules tumorales mortes (apoptotiques ou nécrotiques) présente plusieurs avantages. Il n'est pas nécessaire d'identifier et de caractériser les antigènes exprimés par la tumeur. Grâce à la phagocytose, les peptides antigéniques ont accès aux voies de présentation du CMH de classe I (par présentation croisée) et du CMH de classe II, permettant le développement d'une réponse immune diversifiée, impliquant à la fois des lymphocytes T CD4 et CD8 et favorisant une réaction contre les tumeurs faiblement immunogènes.

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

De nombreux travaux ont été menés pour déterminer l'impact de la phagocytose sur la maturation des DC, afin de définir quel type de mort cellulaire utiliser. Les capacités immunostimulatrices des cellules nécrotiques sont bien démontrées. La nécrose conduit en effet à la libération de diverses molécules comme l'ADN génomique ou l'acide urique, capables d'induire la maturation des DC (Ishii *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2003). Par contre, la phagocytose de cellules apoptotiques est plus controversée. Selon les études, elle peut inhiber la capacité des DC à répondre à des stimuli de maturation (Stuart *et al.*, 2002; Urban *et al.*, 2001) ou induire le processus de maturation (Chen *et al.*, 2001; Ronchetti *et al.*, 1999; Rovere *et al.*, 1998). D'autres études montrent que la nécrose et l'apoptose sont deux préparations cellulaires équivalentes (Kotera *et al.*, 2001; Larmonier *et al.*, 2006).

Les processus intervenant après phagocytose ne sont donc pas entièrement élucidés. Il semble en fait que la présence de signaux de danger au moment de la phagocytose favorise la maturation des DC et leurs capacités immunostimulatrices. Il est clair aujourd'hui que les HSP jouent dans ce contexte un rôle déterminant. L'immunogénicité tumorale a par exemple été corrélée au niveau d'expression de l'HSP 70 (Melcher *et al.*, 1998). Les HSP peuvent induire la maturation des DC. En outre, elles sont capables de chaperonner les peptides antigéniques et d'assurer leur cross présentation (Basu *et al.*, 2001; Delneste *et al.*, 2002; Srivastava, 2002).

Protéines

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

Récemment, la présentation de l'antigène NY-ESO-1 délivré seul, avec un adjuvant (ISCOMATRIX) ou avec des anticorps anti-NY-ESO-1 a été investiguée (Schnurr *et al.*, 2005). Si la présentation des antigènes sur les molécules du CMH de classe II est possible avec ces trois formulations, la présentation croisée nécessite l'utilisation d'ISCOMATRIX ou d'anticorps anti-NY-ESO-1. Le chargement en présence d'adjuvant se caractérise par une présentation rapide (dans les 4h), des épitopes sur les molécules du CMH-I, et retardée (24h environ) sur les molécules du CMH-II. Au contraire, la formation de complexes immuns conduit à une présentation rapide des épitopes sur les molécules du CMH-II et plus lente sur les molécules du CMH-I. La formulation utilisée détermine aussi les mécanismes intervenants dans le processing de l'antigène. En effet, la dégradation de NY-ESO-1 fait intervenir une voie indépendante du protéasome, s'il est délivré avec l'adjuvant, ou dépendante du protéasome s'il est délivré avec des anticorps. Il est ainsi envisageable que les épitopes générés selon ces deux modes de formulation soient différents et donnent lieu à des réponses T différentes. Outre un impact quantitatif et qualitatif, le choix de la formulation peut donc aussi déterminer la spécificité des réponses T engagées.

ADN-ARN

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

L'utilisation de vecteurs viraux assure la transfection des DC avec une bonne efficacité (supérieure à 90%) (Jenne *et al.*, 2001). Deux essais cliniques utilisent cette stratégie, avec induction de réponses immunes (Di Nicola *et al.*, 2004; Morse *et al.*, 2005). Elle peut néanmoins être limitée par d'éventuelles perturbations de la physiologie des DC après l'infection et par le déclenchement de réponses dirigées contre les antigènes viraux. D'autres stratégies de transfection non virale sont disponibles, comme la lipofection, l'électroporation, la précipitation au calcium, le système "gene gun" ou l'utilisation de microparticules phagocytibles, mais avec une efficacité généralement moindre (Jenne *et al.*, 2001; Jilek *et al.*, 2005; Larregina *et al.*, 2004).

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

Fusion

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

II.4.4 : Posologie et site d'injection

Les essais de vaccination mettent en évidence une très grande hétérogénéité concernant la quantité de DC à injecter, ainsi que la fréquence et le nombre d'injections (Figdor *et al.*, 2004). Dans la vaccination contre les agents infectieux, le priming des lymphocytes T est généralement suivi d'un rappel après 4 à 6 semaines (Zinkernagel, 2003), mais ces règles ne sont pas forcément applicables à une pathologie chronique comme le cancer. Dans l'immunothérapie du cancer, les vaccinations, entre 3 et 6 généralement, sont hebdomadaires, bihebdomadaires ou mensuelles. L'objectif étant de rapprocher les vaccinations pour favoriser l'expansion des lymphocytes T, tout en évitant la lyse des DC par les lymphocytes générés, si les vaccinations sont trop fréquentes (Schuler *et al.*, 2003). Le nombre de DC injectées varie énormément selon les sites d'injection et selon les essais (de 10^5 à 200.10^6 cellules). Les adjuvants fréquemment utilisés sont la KLH ou la toxine tétanique. Ils permettent de contrôler l'immunogénicité des DC préparées et procurent un effet "helper" pour l'induction de lymphocytes T cytotoxiques. Ils peuvent cependant créer une compétition antigénique avec les antigènes spécifiques de tumeurs.

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

Une approche alternative est l'injection des cellules au sein même des ganglions. Les DC sont alors immédiatement en contact avec les lymphocytes T. Cette voie est donc

particulièrement intéressante dans le cas de vaccination par DC chargées avec peptides. Les DC peuvent ensuite migrer vers un ganglion voisin *via* les vaisseaux lymphatiques. Mais les difficultés de cette technique sont importantes. En effet, des analyses d'imagerie par résonance magnétique révèlent une injection intra-ganglionnaire dans 50% des cas seulement (de Vries *et al.*, 2005). Il est possible aussi que l'injection désorganise l'architecture ganglionnaire. Un accès plus physiologique dans le ganglion *via* un vaisseau lymphatique afférent peut être envisagé, mais reste aussi très complexe à mettre en place.

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

L'ensemble de ces données montre la très grande diversité dans les protocoles de vaccination anti-tumorale par DC. Si certains paramètres font l'objet de consensus (utilisation de DC matures par exemple), il reste difficile de privilégier une méthode de production à une autre. L'expérience des premiers essais montre néanmoins la nécessité d'améliorer la standardisation et le contrôle qualité des vaccins (Figdor *et al.*, 2004). Des critères de qualité peuvent alors être proposés (voir figure 10), l'objectif étant d'atteindre ces critères avec le mode de production choisi.

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

Figure 10: Critères de qualité des vaccins à base de DC. (D'après Figdor C.G. et al. 2004).

II.5. Les conditions de vaccination

L'immunothérapie anti-tumorale par injection de DC n'est fondée que si le système immunitaire du receveur peut répondre à la vaccination. Les patients inclus dans les essais cliniques sont généralement à des stades très avancés de la maladie, avec une masse tumorale importante et un système immunitaire altéré. La vaccination par DC s'applique vraisemblablement plus à des patients à des stades moins avancés de la maladie ou déjà traités de manière conventionnelle. En outre, son efficacité pourrait être améliorée par une association avec d'autres thérapies.

II.5.1 : La résistance tumorale

La présence de lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux témoigne de l'immunogénicité des tumeurs. Près de la moitié des patients atteints de mélanome montrent en effet une présence TIL (Gajewski *et al.*, 2006). Pourtant, l'élimination des tumeurs établies est un phénomène rare et les TIL présents au niveau du site tumoral peuvent être fonctionnellement déficients (Koneru *et al.*, 2005; Radoja *et al.*, 2001). De même, dans les essais de vaccination, l'induction de lymphocytes T est couramment observée, mais sans corrélation avec les réponses cliniques. Les cellules tumorales développent en fait différentes stratégies qui leur permettent d'échapper à la reconnaissance et à la destruction par le système immunitaire.

Défaut de présentation des antigènes

La présentation des antigènes restreints au CMH de type I est un paramètre déterminant pour la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales. Une altération de la capacité de présentation des antigènes permet aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire. Les mécanismes engagés sont par exemple une diminution ou même la perte de l'expression des molécules HLA, ou des mutations concernant les molécules associées au processing des antigènes, comme le transporteur TAP ou les sous unités du protéasome LMP-2 et LMP-7 (Low Molecular weight Protein) (Campoli *et al.*, 2002; Miller et Pisa, 2005). Par ailleurs, la pression de sélection exercée par le système immunitaire peut favoriser

l'émergence de nouveaux variants antigéniques non reconnus (Khong *et al.*, 2004; Yee *et al.*, 2002).

Production d'un environnement tumoral immunosuppresseur

Les cellules cancéreuses produisent d'importantes quantités de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Cette molécule qui assure la vascularisation de la tumeur peut aussi inhiber la différenciation et la maturation des DC (Gabrilovich *et al.*, 1996). La sécrétion d'IL-6 et de M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) oriente elle la différenciation des cellules CD34+ en cellules de type monocyte-macrophage, sans capacité de présentation antigénique (Menetrier-Caux *et al.*, 1998). L'implication de l'IL-10 et du TGFβ dans l'immunosuppression a aussi été rapportée. Ces deux molécules entraînent une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation, des cytokines inflammatoires et une inhibition de la présentation antigénique par les DC (Beissert *et al.*, 1995; De Smedt *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2006). Les DC traitées par l'IL-10 sont en outre capables d'induire l'anergie de lymphocytes T CD8 activés (Steinbrink *et al.*, 1999).

Diverses autres molécules produites dans l'environnement tumoral participent à renforcer son caractère immunosuppresseur, c'est le cas notamment de la molécule PGE2 (Badawi, 2000), des gangliosides (Peguet-Navarro *et al.*, 2003) ou de la PSA (Prostate-Specific Antigen) dans le cancer de la prostate (Aalamian *et al.*, 2003; Kennedy-Smith *et al.*, 2002).

L'environnement ainsi créé affecte l'ensemble des populations leucocytaires présentes au niveau du site tumoral. Outre le blocage de la différenciation et de la maturation des DC, il favorise l'expression des molécules de co-inhibition B7-H1 et B7-H4 par les DC myéloïdes, entraînant l'inactivation des lymphocytes T (Zou, 2005). Il induit par ailleurs l'expression de l'enzyme IDO par les DC (Munn *et al.*, 2002; Uyttenhove *et al.*, 2003). Les DC plasmacytoïdes peuvent quant à elles être attirées par la chémokine CXCL12, produite par les cellules tumorales, et induire la production d'IL-10 par les lymphocytes T (Zou *et al.*, 2001).

Enfin, l'environnement tumoral favorise l'émergence des Treg, qui jouent un rôle primordial dans l'immunosuppression.

Les lymphocytes T régulateurs

Les Treg sont décrits dès les années 70 (Gershon et Kondo, 1970; Gershon et Kondo, 1971), mais l'absence de marqueur spécifique constitue un frein à leur étude. Leur implication majeure dans l'échappement tumoral n'a été reconnue que dernièrement (Shevach, 2002; Zou, 2005). La molécule CD25 (qui est la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2) (Sakaguchi *et al.*, 1995) et le facteur de transcription FoxP3 (Forkhead Box P3) (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003) peuvent être utilisés aujourd'hui pour caractériser les Treg. Le phénotype classiquement présenté CD4+CD25+FoxP3+ correspond en fait aux Treg naturels, produits dans le thymus.

De fortes proportions de Treg sont présentes dans l'environnement tumoral, le sang ou les ganglions lymphatiques de patients atteints de mélanome (Viguié *et al.*, 2004), d'hépatocarcinome (Ormandy *et al.*, 2005), de cancer du poumon ou ovarien (Woo *et al.*, 2001) ou de cancer du sein ou du pancréas (Liyanage *et al.*, 2002). Leur accumulation peut être corrélée à une diminution de la survie des patients (Curiel *et al.*, 2004). L'origine des Treg au niveau du site tumoral est diverse (figure 11). Ils peuvent être recrutés par la chimiokine CCL22 produite par la tumeur (Curiel *et al.*, 2004), être induits et proliférer grâce aux DC myéloïdes ou plasmacytoïdes présentes dans l'environnement tumoral (Curiel *et al.*, 2003; Dhodapkar et Steinman, 2002; Dhodapkar *et al.*, 2001) ou être convertis à partir de lymphocytes T sous l'effet du TGFβ (Chen *et al.*, 2003).

Les Treg exercent leurs effets suppresseurs par l'intermédiaire d'IL-10 ou de TGFβ, produits par eux même ou par les DC qu'ils ont conditionnées (Zou, 2006). Ils disposent aussi du système granzyme/perforine par lequel ils lysent les lymphocytes T CD4 et CD8 activés (Grossman *et al.*, 2004). Ils peuvent induire chez les DC l'expression de l'enzyme IDO, selon un processus dépendant de la molécule CTLA-4 et de l'IFNγ (Fallarino *et al.*, 2003), ou celle de la molécule inhibitrice B7-H4 (Kryczek *et al.*, 2006). Enfin, les Treg ne produisent pas d'IL-2 mais en consomment. Ils rentrent en compétition pour l'IL-2 avec les lymphocytes T, et comme ils disposent d'un récepteur avec une affinité largement supérieure, ils privent de cette cytokine les autres populations lymphocytaires (de la Rosa *et al.*, 2004; von Boehmer, 2005).

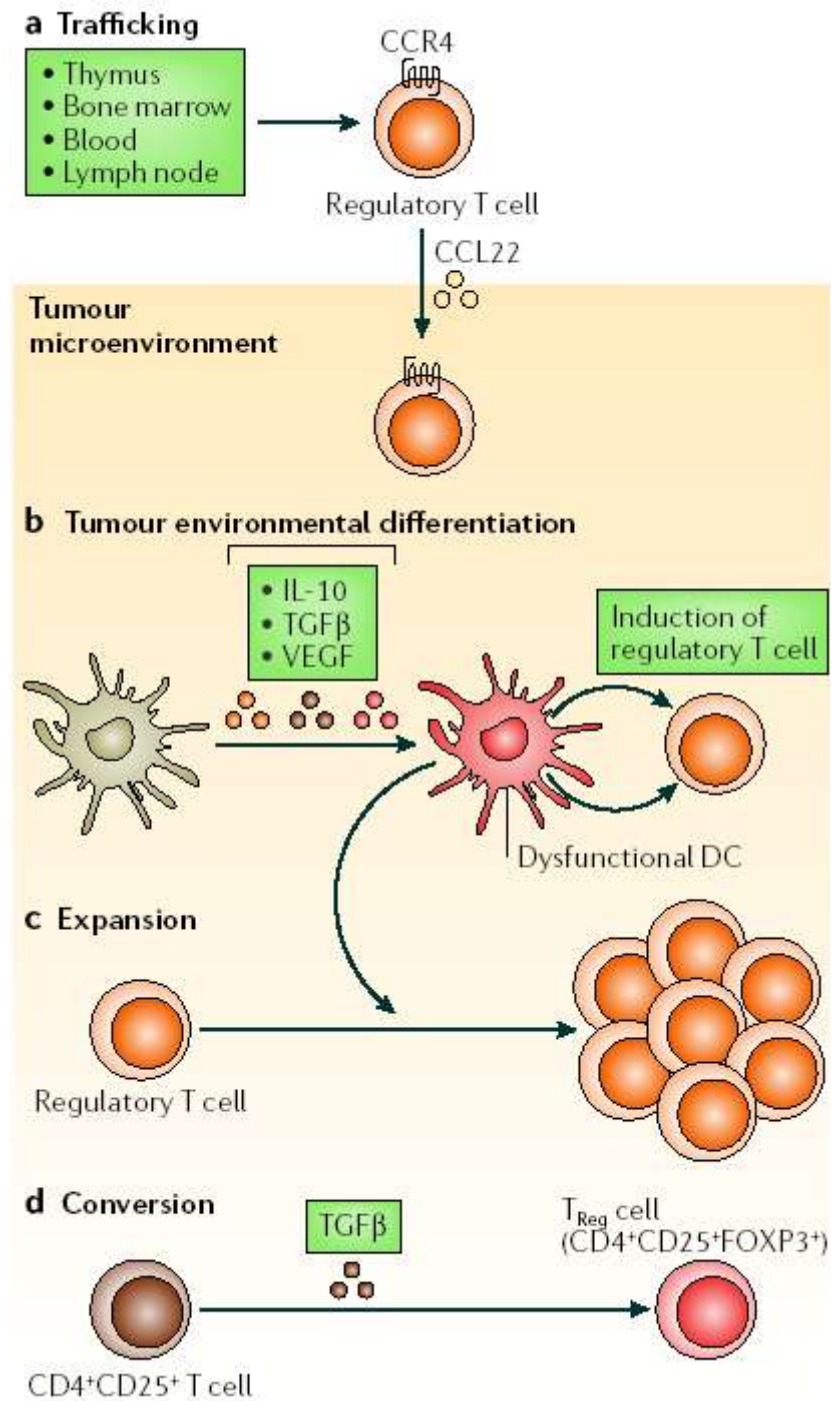


Figure 11 : Origine des Treg dans l'environnement tumoral. (D'après Zou W. 2006).

Résistance à l'apoptose

Deux familles de molécules régulent le processus apoptotique, les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bax/Bac et les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2/Bcl-XL. Une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques par rapport aux protéines pro-apoptotiques assure aux cellules tumorales une sensibilité moindre à l'apoptose (Evan et Vousden, 2001). Les cellules tumorales développent en outre des mécanismes leur permettant de résister à l'apoptose induite par les effecteurs du système immunitaire. Elles sont capables par exemple d'inhiber la voie granzyme/perforine, grâce à la surexpression de deux protéases, PI-9 (serine Protease Inhibitor-9) et cathepsine B, qui inactivent respectivement les molécules granzyme B et perforine (Malmberg et Ljunggren, 2006). Elles peuvent aussi prévenir l'apoptose induite *via* la signalisation par les récepteurs de mort tel que Fas. Ainsi, la perte d'expression ou de fonction de ces récepteurs (Landowski *et al.*, 1997), leur sécrétion sous formes solubles pour fixer et neutraliser Fas-L (Midis *et al.*, 1996; Roth *et al.*, 2001; Ugurel *et al.*, 2001) ou encore la surexpression de la protéine FLIP (FLICE Inhibitory Protein) capable de bloquer l'activation de la caspase 8 (Djerbi *et al.*, 1999) leur assure une résistance face aux lymphocytes T et aux cellules NK.

Les cellules tumorales sont elles-mêmes capables d'induire l'apoptose des lymphocytes T par l'expression de Fas-L (Arbuckle *et al.*, 2000) ou par l'expression de la molécule B7-H1 (Dong *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces mécanismes permet donc aux cellules tumorales de bloquer le développement d'une réponse immune et même d'inhiber les effecteurs de la réponse immune lorsque celle-ci a pu se mettre en place.

II.5.2 : La combinaison de la vaccination avec d'autres traitements

Les patients inclus dans les essais d'immunothérapie sont généralement à des stades avancés de la maladie, avec une progression tumorale rapide et un système immunitaire altéré. Les réponses immunes qui parviennent à se mettre en place sont alors débordées par le développement tumoral. Dernièrement, l'équipe de Nestle a montré, chez des patients atteints de lymphome T cutané, que la réponse clinique était associée à l'étendue de la tumeur, les régressions étant préférentiellement observées chez les patients avec une faible masse tumorale lors de la vaccination (Maier *et al.*, 2003). Le traitement de patients présentant une pathologie avancée paraît donc aujourd'hui illusoire et l'immunothérapie par DC s'oriente plutôt vers la vaccination de patients, lorsque leur masse tumorale est minimale, c'est-à-dire à des stades précoces de la maladie ou après un traitement conventionnel.

A ce titre, associer l'immunothérapie avec la chimiothérapie ou la radiothérapie présente plusieurs intérêts. La chimiothérapie et la radiothérapie réduisent en effet l'importance de la masse tumorale. En outre, elles peuvent permettre la libération d'antigènes tumoraux dans un contexte immunogénique (Casares *et al.*, 2005; Hallahan *et al.*, 1989; Sherman *et al.*, 1991). Par ailleurs, beaucoup d'antigènes tumoraux sont impliqués dans les phénomènes de résistances aux drogues. Il est donc vraisemblable que l'immunothérapie par DC, en ciblant ces antigènes, puisse sensibiliser les cellules tumorales à la chimiothérapie (Liu *et al.*, 2006a).

L'avenir de la vaccination est donc sans doute dans sa combinaison avec d'autres approches thérapeutiques. De nombreuses possibilités sont alors disponibles (figure 12). Le conditionnement du site d'injection par l'administration de $\text{TNF}\alpha$ permet augmenter la migration des DC (Martín-Fondevila *et al.*, 2003), l'administration d'adjuvants comme l'IFN de type I (Banchereau et Palucka, 2005) ou la molécule CpG ODN (CpG Oligodeoxynucleotide) (Hiraoka *et al.*, 2004) favorise elle l'émergence de réponses de type Th1.

L'IL-2 est une cytokine qui favorise la prolifération et l'activité des lymphocytes T (Li *et al.*, 2001). Elle peut être co-administrée avec des DC (Escobar *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2006). Son utilisation reste cependant limitée en immunothérapie puisqu'elle peut réduire la réponse T par le phénomène d'AICD (Activation-Induced Cell Death) (Waldmann *et al.*, 2001) et favoriser la prolifération des Treg (Ahmadzadeh et Rosenberg, 2006). En outre, elle

se révèle toxique à forte dose (Schwartzentruber, 2001). Par contre, un intérêt croissant est porté sur l'IL-15 (Gatza et Okada, 2006; Rubinstein *et al.*, 2002). Cette cytokine favorise en effet la prolifération des lymphocytes T mémoires, l'activation des cellules NK et contrairement à l'IL-2, elle a un effet anti-apoptotique (Li *et al.*, 2001). L'injection d'autres cytokines comme l'IL-7 ou l'IL-21 peut également être envisagée (Zou, 2006).

L'efficacité thérapeutique de la vaccination par DC peut aussi être améliorée en bloquant les différents mécanismes développés par les cellules tumorales pour échapper au système immunitaire. Dans les années 80, des travaux chez l'animal montrent qu'une drogue comme le cyclophosphamide améliore l'immunothérapie adoptive par élimination des Treg (North, 1984). Des études ont montré que l'élimination des Treg, chez des patients atteints de carcinomes rénaux ou ovariens, permet d'intensifier la réponse immune générée après vaccination (Dannull *et al.*, 2005; Holtl *et al.*, 2005). Cependant, très peu de données de comparaison, entre la vaccination seule et la vaccination après élimination des Treg sont actuellement disponibles.

Il a aussi été proposé que la lymphodéplétion elle-même puisse améliorer l'issue de la vaccination. Elle permettrait en effet de réduire la compétition pour les cytokines comme l'IL-15 et l'IL-7 (Gattinoni *et al.*, 2005; Klebanoff *et al.*, 2005) et faciliterait l'accès des lymphocytes aux DC (Kedl *et al.*, 2000). La régénération lymphocytaire périphérique après lymphodéplétion et vaccination favoriserait alors l'émergence de populations spécifiques de la tumeur.

Le développement d'anticorps spécifiques de la molécule CTLA-4 permet d'envisager le blocage de ce mécanisme inhibiteur au cours de la vaccination. Les anticorps anti-CTLA-4 seuls montrent des effets anti-tumoraux (Ribas *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, ils ont été utilisés en combinaison avec des peptides (Attia *et al.*, 2005; Sanderson *et al.*, 2005) mais pas encore avec des DC. Enfin, le blocage de l'IL-10 du TGF β ou de l'enzyme IDO est aussi envisageable en association avec l'immunothérapie par DC (Zou, 2006).

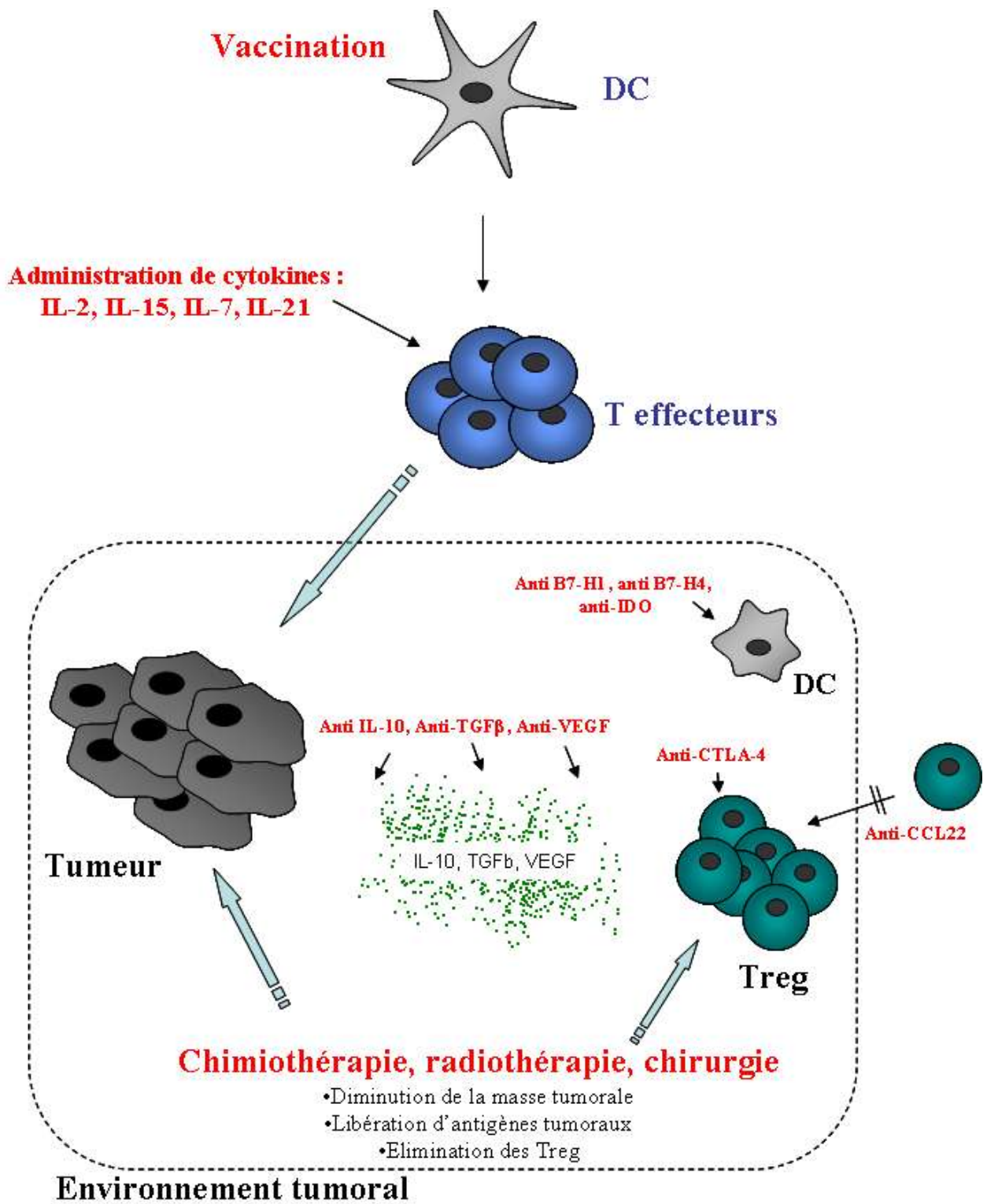


Figure 12 : La vaccination par DC en combinaison avec différentes thérapeutiques.

La vaccination par DC offre des perspectives intéressantes pour une immunothérapie anti-tumorale. L'expérience des premiers essais cliniques de vaccination met en évidence la nécessité d'améliorer la méthodologie de production des DC ainsi que les protocoles de vaccination. Dans ce contexte, le premier objectif du travail de thèse a été de développer des conditions favorables de production de DC, selon un protocole standardisé et sécurisé. A partir de ces conditions, nous proposons deux protocoles d'immunothérapie, dans le cadre de la LAM (Leucémie Aigue Myéloblastique) et du CHC (Carcinome Hépatocellulaire).

Dans une dernière partie plus fondamentale, nous étudions l'impact de la molécule HO-1 (Heme Oxygenase 1) sur la maturation des DC.

RESULTATS

I. Production de DC pour un usage clinique

Article: Royer PJ, Tanguy-Royer S, Ebstein F, Sapede C, Simon T, Barbieux I, Oger R, and Gregoire M. Culture Medium and Protein Supplementation in the Generation and Maturation of Dendritic Cells. Scand J Immunol. 2006. 63(6):401-409.

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

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

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

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

INSERM U601, Institut de Biologie, Nantes, France

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

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

Abstract

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

Introduction

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

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

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

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

Materials and methods

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

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

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

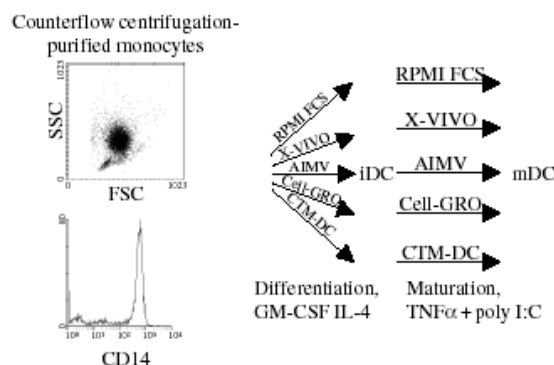


Figure 1 Dendritic cells (DC) generation. Monocytes purification was analysed by flow cytometry, based on morphological properties and CD14 expression. Then, monocytes were cultured with GM-CSF and IL-4 in different media for DC generation. After 6 days, immature DC were activated with TNF α and poly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

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

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

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

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

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

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

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

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

Results

Comparative effect of media on DC generation

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

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

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

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

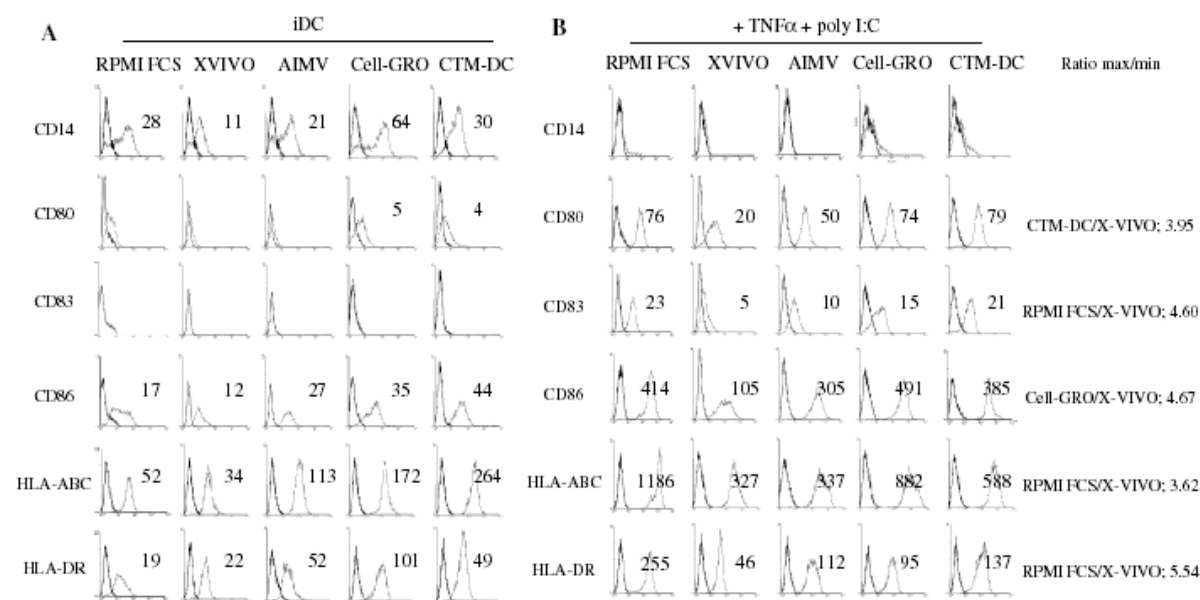


Figure 2 Comparative phenotypic analysis of immature dendritic cells (iDC) (A) and mature DC (mDC) (B) generated in different culture media. The phenotypic markers, CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC and HLA-DR were analysed by flow cytometry. DC were gated according to their morphological properties and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

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

DC and batches of medium

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

Protein supplementation and DC maturation

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

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

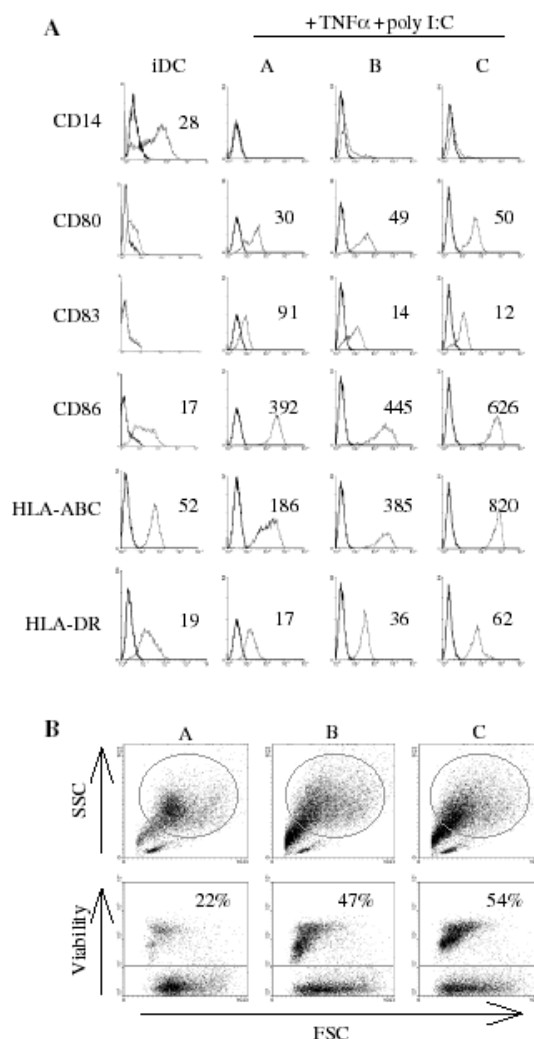


Figure 3 Analysis of mature dendritic cells (mDC) cultured in different batches of AIMV. DC cultured in three distinct batches of AIMV (batches A, B and C) were exposed to TNF α and poly I:C for 48 h and analysed for phenotypic properties and viability. (A) DC were gated according to morphological properties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

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

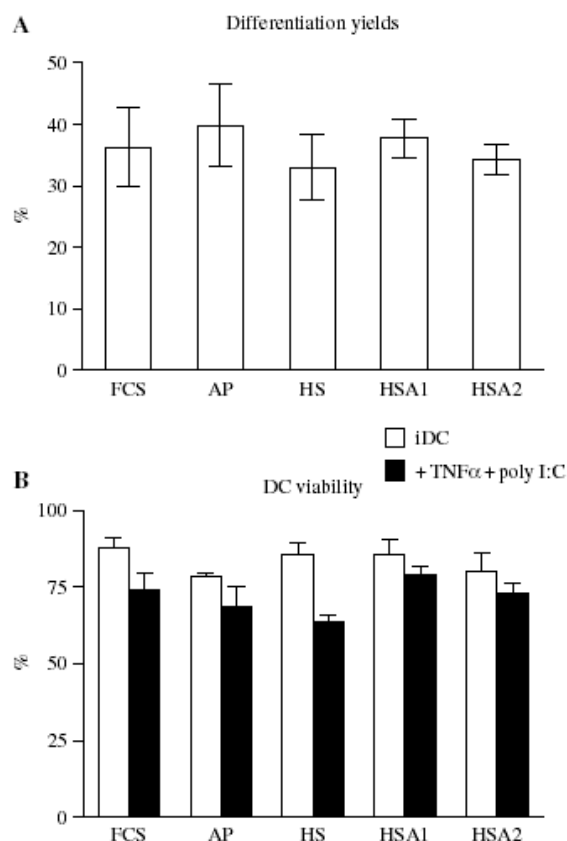


Figure 4 Protein supplementation and dendritic cells (DC) generation. (A) Differentiation yields depending on the protein supplement used. Monocytes were cultured in RPMI supplemented with foetal calf serum (FCS), human serum (HS), autologous plasma (AP) or human serum albumin (HSA) (two batches were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

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

Cytokine production

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

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

Functional capacities of the generated DC

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

Discussion

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

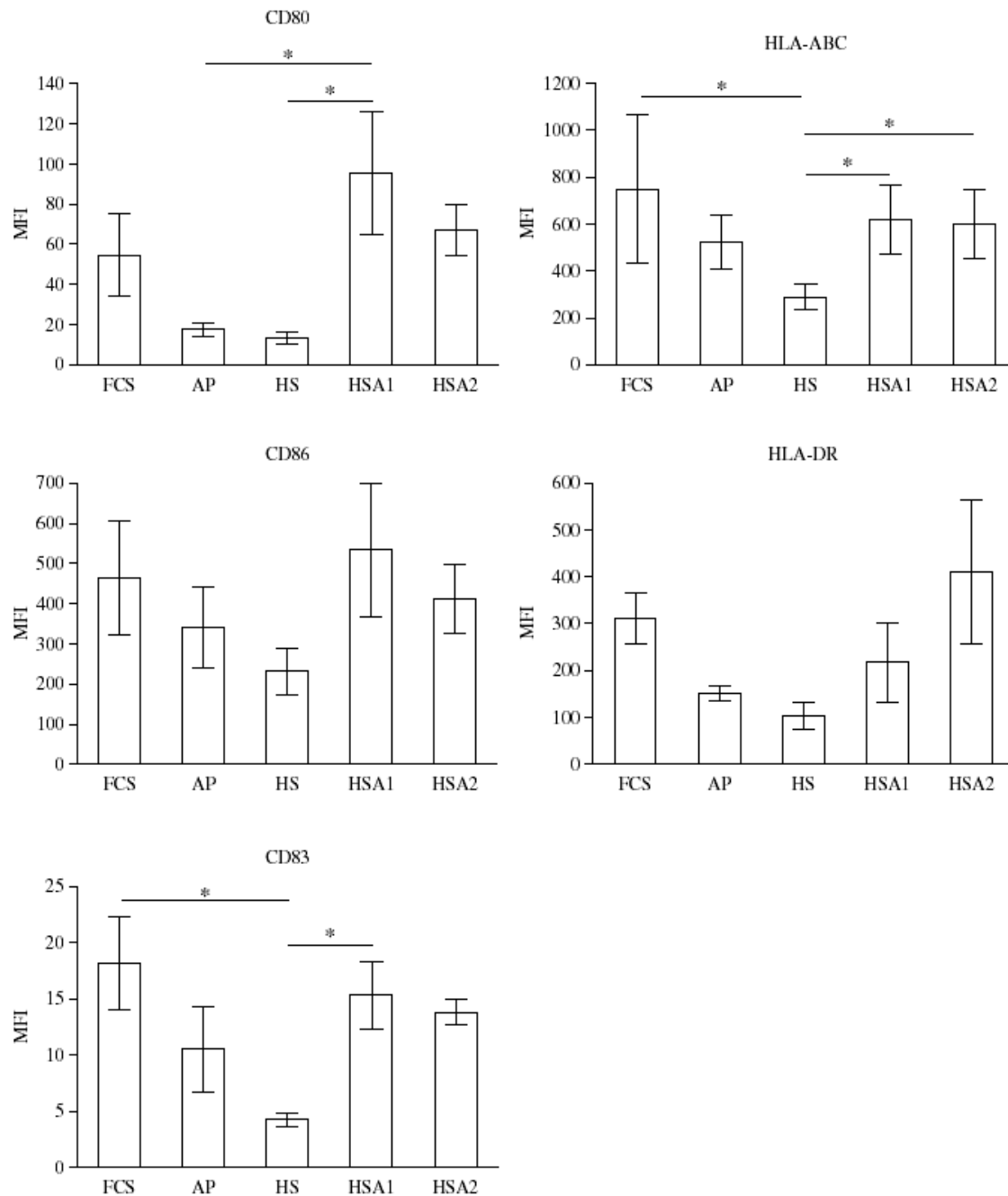


Figure 5 Phenotypic analysis of mature dendritic cells (mDC) cultured in RPMI with different protein supplementation. CD80, CD83, CD86, HLA-ABC and HLA-DR molecules were analysed. Results are expressed as median fluorescence intensity (MFI) ($n=5$). * represents significant differences ($P \leq 0.05$).

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

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

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

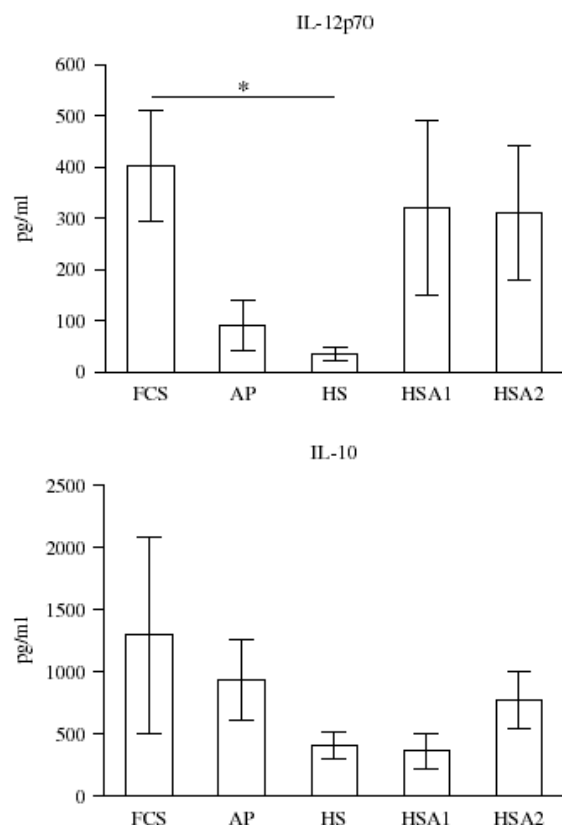


Figure 6 Concentration of IL-12p70 and IL-10. Immature dendritic cells seeded in RPMI supplemented with foetal calf serum (FCS), human serum (HS), autologous plasma (AP) or human serum albumin (HSA) were stimulated with TNF α and poly I:C. Forty-eight hours later, supernatants were removed. IL-12p70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

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

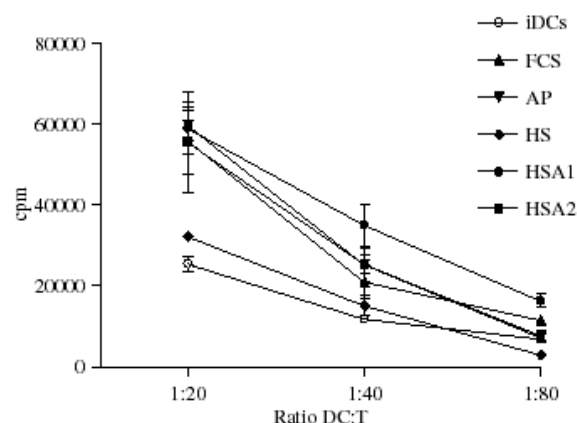


Figure 7 Mixed leucocyte reaction. The capacity of dendritic cells (DC) generated in RPMI in the presence of different serum supplements to stimulate a T-cell response was analysed. Increasing numbers of DC treated with TNF α and poly I:C for 48 h were used to stimulate allogeneic T lymphocytes. Proliferation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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

References

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

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

II. Analyse de la production de DC chez des patients atteints de LAM (Leucémie Aigue Myéloblastique) après chimiothérapie

Article : **Royer PJ***, Bougras G*, Ebstein F, Tanguy-Royer S, Simon T, Morineau N, Chevallier P, Harousseau JL and Gregoire M. Efficient monocyte-derived dendritic cells generation in patients with acute myeloid leukaemia after chemotherapy treatment.

*contribution équivalente.

Si la chimiothérapie permet d'obtenir une rémission complète chez environ 70% des patients atteints de LAM, les rechutes sont nombreuses et à 5 ans, seulement 15% des patients survivent. Il est donc nécessaire d'envisager des protocoles thérapeutiques alternatifs pour prévenir la survenue des rechutes. Des expériences de greffes ont établi chez l'homme l'implication du système immunitaire et particulièrement des lymphocytes T dans la prévention des rechutes. Par ailleurs, nous avons montré *in vitro* que des DC dérivées de monocytes et chargées en antigènes tumoraux pouvaient générer une réponse lymphocytaire spécifique et cytotoxique contre les blastes tumoraux. La vaccination de patients après chimiothérapie offre donc une perspective intéressante pour le traitement des LAM.

Les cellules cancéreuses exercent des effets suppresseurs sur le système immunitaire. Il semble donc important de vacciner des patients avec une masse tumorale la plus faible possible. La production des DC doit donc être programmée tôt après chimiothérapie, au moment de la rémission complète. Nous avons investigué la production de DC chez des patients atteints de LAM à différents stades de leur traitement. Des prélèvements ont été recueillis chez 22 patients, avant et après une ou plusieurs cures de chimiothérapie. A ces différents stades, nous avons analysé la production des DC, leur maturation et leur capacité à activer des lymphocytes T. Ces cellules ont été comparées avec celles issues de donneurs sains.

Nos résultats montrent que la production de DC matures est possible chez les patients atteints de LAM et traités par chimiothérapie. Cette production est possible quel que soit le nombre et l'intensité des cures reçues. Il existe une fenêtre de temps, entre 1 et 2 mois après chimiothérapie, favorable à la production des DC.

Exp Hematol. 2008 Mar;36(3):329-39. Epub 2008 Jan 22.

Efficient monocyte-derived dendritic cell generation in patients with acute myeloid leukemia after chemotherapy treatment: Application to active immunotherapy.

Royer PJ, Bougras G, Ebstein F, Leveque L, Tanguy-Royer S, Simon T, Juge-Morineau N, Chevallier P, Harousseau JL, Gregoire M.

INSERM, U601, Nantes, France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Centre de Recherche en Oncologie, Nantes, France.

OBJECTIVE: While complete remission in acute myeloid leukemia (AML) can be achieved after chemotherapy (CT), relapses occur for the majority of patients, underlying the need to eliminate residual disease. Based on dendritic cell (DC) vaccination, the triggering of an immune response against residual leukemia cells after CT could maintain patients in remission. The aim of our study was to assess, for vaccine preparation, generation of monocyte-derived DCs in AML patients after CT. **MATERIALS AND METHODS:** We evaluated efficiency of the production, yields, maturation, and functional properties of DCs from 22 AML patients at different CT stages compared to those from 15 healthy donors. **RESULTS:** We demonstrated that monocyte-derived DC production is successful later than 3 weeks after the last CT cycle, whatever the CT was. Immature DCs demonstrated functional phagocytic activity. Mature DCs displayed migratory, T-cell stimulatory and Th1-activation capacities. Our results also suggest a favorable period from 20 to 60 days after CT for potent monocyte-derived DC production and immune activation. **CONCLUSION:** In defining patient-sampling conditions, this preclinical study has direct implications for AML DC-based immunotherapy.

Efficient monocyte-derived dendritic cell generation in patients with acute myeloid leukaemia after chemotherapy treatment.

Pierre-Joseph Royer*, Gwenola Bougras*, Frederic Ebstein, Severine Tanguy-Royer, Thomas Simon, Nadine Morineau, Patrice Chevallier, Jean-Luc Harousseau and Marc Gregoire.

INSERM, U601, Nantes, France ; Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France.

Corresponding author: Marc Gregoire, INSERM U601, Institut de Biologie, 44093 Nantes Cedex 01, France.

Phone: 33-2-40-08-41-50;

Fax: 33-2-40-08-40-82.

E-mail : marc.gregoire@nantes.inserm.fr

* contributed equally to this work.

This work was supported by INSERM grants, and by ARC National and the Canceropole Grand Ouest.

P.J.R is a recipient of a fellowship from La Ligue contre le Cancer (Loire Atlantique committee) and from ARC National.

Keywords: Acute myeloid leukaemia, chemotherapy, dendritic cells, immunotherapy.

Abbreviations: CT, chemotherapy; DC, dendritic cells; AML, acute myeloid leukaemia; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

Abstract

Whereas complete remission in acute myelogenous leukaemia (AML) patients can be achieved by chemotherapy (CT), the majority of them will later relapse. Thus, the challenge in AML treatment clearly lies in the relapse prevention. There is evidence nowadays that leukaemia cells can be recognized and killed by T lymphocytes. The triggering of an immune response against residual leukaemia cells, based upon dendritic cells (DC) vaccination after CT treatment may then maintain the remission. The aim of our study was to determine the most suitable process for the ex vivo preparation of DC in AML patients after CT treatment. Thus, we assessed and compared to healthy donors the monocyte-derived DC production from AML patients. Production yields, as well as DC maturation and functional properties, were analyzed. We showed that DC generation was feasible after one or several CT cures, but was determined by the delay between CT and the blood sample. DC generation was successful 3 weeks after the last CT cure and our results suggest a favourable period, from 3 weeks to 2 months after CT, for DC production. This study has direct implications for DC-based immunotherapy in AML.

Introduction

Acute myeloid leukaemia is a malignant disorder of blood cells, characterized by the proliferation of blasts, undifferentiated immature myeloid cells. Blast accumulation, associated with a deficit of cells involved in haematopoiesis, results in anaemia, neutropenia or infections and leads inevitably to death (Lowenberg *et al.*, 2003). AML treatment consists first of chemotherapy (CT). It ensures complete remission in 60-80% of patients younger than 60 years. However relapses are frequent (50-80%) and despite a consolidation phase (CT, bone marrow transplantation), long-term disease free-survival occurs in less than half of the patients, with an overall survival of only 15% at 5 years (Smith *et al.*, 2004). Thus, the poor prognosis of patients with AML stresses the importance of exploring new therapeutic strategies to improve overall survival. An induction of antileukemia immune responses in patients during the period of minimal residual disease could prevent relapse. Among the immunotherapeutic protocols currently developed for generating antitumor immune responses, one is to use autologous dendritic cells (DC) loaded with autologous tumor cells (Gregoire *et al.*, 2003).

By their ability to stimulate naïve T cells and to initiate a specific immune response, DC are a promising approach for AML relapse treatment. With a view to vaccination, DC are generally produced *in vitro* from CD14 monocytes, but in the case of AML, it has also been reported that blast cells can differentiate in cells with morphologic, phenotypic and functional properties similar to DC (Charbonnier *et al.*, 1999; Choudhury *et al.*, 1999; Cignetti *et al.*, 2004). In maintaining the expression of leukemia-associated antigens while increasing the expression of presentation and co-stimulation molecules (Li *et al.*, 2005), these blast-derived DC acquire the capacity to stimulate anti-leukemic T-cell responses. However, the "leukemic-DC" strategy entails several limitations. First, AML consists of a mixture of heterogeneous diseases, which results in a lack of reproducibility in term of culture yield, and cell phenotype

or immune properties. Moreover, despite the use of a great variety of cytokine combinations, leukemic-DC production is generally restricted to only 60-70% of patients (Mackensen *et al.*, 2000), without insurance concerning their ability to induce a cytotoxic T cell response (Harrison *et al.*, 2001). It is also unclear nowadays that the leukemic-DC could generate tolerogenic or tumorigenic signals (Buggins *et al.*, 2001; Panoskaltsis, 2005).

We thus favor DC generation from monocytes of non leukemic-origin. Experimental and pre-clinical investigations for monocyte-derived DC (Mo-DC) production are described with leukapheresis from healthy donors. The feasibility of DC-based vaccine administration has been demonstrated in many cancers with immunological and clinical responses (Figdor *et al.*, 2004; Nestle *et al.*, 2005; Ridgway, 2003). Besides, in AML, we have demonstrated *in vitro* that Mo-DC loaded with late-apoptotic leukemic blasts induced leukaemia-specific cytotoxic T-cell response (Spisek *et al.*, 2002).

Since immunotherapy appears the most effective in patients with a low tumour cell burden (Bocchia *et al.*, 2000; Bruserud et Wendelboe, 2001; Figdor *et al.*, 2004), we propose Mo-DC vaccination in complete remission patients after CT. *In vitro* DC generation after CT has been investigated in various cancer types (Schutt *et al.*, 2005; Syme *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2000). These studies conducted with or without patient mobilization generally showed the feasibility to generate DC after CT. In AML, most of works were conducted on blast differentiation, therefore without previous CT treatments that are usually involved in clinical trials. Thus, our objective was to compare the monocyte-derived DC generation from healthy donors, with non-leukemic monocytes originated from AML patients after CT.

We analysed the feasibility to generate Mo-DC in a large panel of AML patients. Based on cell phenotype and functional properties, we investigated the DC production from patients at different CT stages. We demonstrated that Mo-DC generation is possible 3 weeks after the last CT treatment. These DC were at least comparable, in term of phenotype and immune

functional properties, with DC from healthy donors. Our study provides then new elements for autologous immunological therapeutic approaches.

Patients and Methods

Blood samples

Twenty two patients with various FAB subtypes (according to the French-American-British classification criteria (Bennett *et al.*, 1998)) and 15 healthy donors were included in the analysis. Table 1 shows relevant clinical and diagnostic laboratory data for the patients. Peripheral blood samples were taken after informed consent at the time of diagnostic tests, and after the CT treatment in complete remission patients. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified by Ficoll-Paque (Amersham) gradient density centrifugation. Isolate cells were used immediately or cryopreserved in RPMI with 20% heat inactivated SVF (Eurobio) and 10 % DMSO (Sigma-Aldrich).

Generation of monocyte-derived DC

Complete medium (CM) used for cell culture consisted of RPMI supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 1% penicillin/streptomycin and 2mM L-glutamine (Life Technologies). In AML patients, complete remission ($\leq 5\%$ blasts in bone marrow) was checked by cytology analysis. Immature DC were generated from the adherent fraction of PBMC. Briefly, $10 \cdot 10^6$ cells were suspended in 3 ml of CM/well and allowed to adhere to six-well plates. After 2h of incubation at 37°C, non-adherent cells were removed and adherent monocytes were cultured in 3ml of CM with 500 IU/ml of GM-CSF and 200 IU/ml of IL-4. Monocyte differentiation was carried out for 6 days. Mo-DC generation was considered successful when at least 10^4 DC were generated per blood ml.

Phagocytosis analysis

Phagocytosis activity of DC was assessed on the base of FITC-labeled latex beads (PharMingen) incorporation as previously described (Spisek *et al.*, 2002). DC were incubated 4 hours with latex beads and phagocytosis was determined by FACS analysis.

DC maturation

After 6 days, immature DC were harvested and plated in fresh medium with 500 IU/ml GM-CSF and 200 IU/ml IL-4 at 10^6 cells/ml in 24-well plates coated with poly(2-hydroxyethylmetacrylate) to avoid cell adhesion. Maturation was induced by 24 hours treatment of the combination of 20 ng/ml TNF α (AbCys SA) and 50 μ g/ml Poly I:C (Sigma-Aldrich) as previously described (Spisek *et al.*, 2001).

Flow-cytometric analysis

For phenotypic analysis, FITC or PE-conjugated monoclonal antibodies against the following molecules were used: CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC (Immunotech) and HLA-DR (Caltag). Non-reactive isotype-matched antibodies were used as control (Immunotech). Cells were labelled at 4°C for 30 min. in RPMI 10% FCS, washed once in PBS, and then analysed on a FACScalibur cytometer using Cell Quest Pro software. The DC population was gated according to its forward-scatter and side-scatter properties. Dead cells were excluded on the basis of TO-PRO3 iodide (1 μ M, Molecular Probes) staining. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

Cytokine detection

Supernatants from 24 hours DC culture were collected and stored at -20°C until they were used for cytokine quantification. IL-12p70 and IL-10 production were determined by ELISA assays (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. All experiments were performed in duplicate.

Mixed Leukocyte Reaction (MLR)

For each condition, graded numbers of DC were cultured in triplicate in U-bottomed 96-well plates with 1×10^5 allogeneic T lymphocytes in a final volume of 200 μl in RPMI 10% FCS. Proliferation of allogeneic T lymphocytes was determined 4 days later by uptake of ^3H -thymidine (1 $\mu\text{Ci/well}$) for the last 18h.

Statistical analysis

Statistical significances were assessed using a one way annova and Tukey post hoc test. Correlations were analyzed by the parametric Pearson correlation test. Significant differences *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

Results

Dendritic cell generation

Disease and CT treatments could impact on the DC generation, maturation and functional properties. Thus we investigated the ability to generate functional mature DC in 22 patients at different stages of AML. As given in table 1, the median age at diagnostic was 61.5 (range, 23-74 years) for 9 women and 13 men. Blood samples were collected before treatment (21 patients), after one CT (8 patients), or after two or more CT courses (12 patients). For 11 patients, samples were obtained before and after treatments (table 2a). All patients included after (one or more courses) CT were in complete remission and the blood samples were obtained after the aplasia phase (e.g. at least 20 days after CT). Fifteen healthy donors were used as control.

We first investigated and compared DC generation in AML patients with healthy donors. Patients were sampled at different time points throughout the treatment (at diagnostic and after one or several CT cures). DC were generated from the blood cell adherent fraction. Since blasts were present in 10 blood samples before CT, leukemic-DC contamination can not be excluded in these culture. According to predefined criteria (at least 10^4 DC produced per blood ml), DC generation before CT achieved in 15 AML patients out of 21 (table 2b). Interestingly, DC generation failure is not imputable to blast culture contamination since no blast was detected in 5 out of the 6 samples. On the other hand, after CT, DC production was successful in 17 attempts out of 22. Among the 15 healthy donors, DC production succeeded in 14, as commonly observed in our laboratory.

Then, we determined differentiation yields (expressed as number of DC generated per blood volume in ml) for the different cell sources. As shown in figure 1a, yields were comparable in patients before and after CT and in healthy donors (respectively $74,993 \pm 11,159$; $95,510 \pm$

17,007 and $74,633 \pm 21,388$ DC/blood ml). Interestingly, high viability (close to 80%) was obtained whatever the cell origin was (figure 1b).

Besides, we also investigated the DC generation according to CT accumulation. Thus, samples were divided in the two following subgroups: one CT cure and two or more CT cures. No significant differences in term of culture yields and viability were observed between the two subgroups (not shown). Thus, CT cure accumulation does not impede DC generation.

Production and maturation of DC from AML patients

We were then interested in the phenotypic characterization of the immature DC. Cells were differentiated for 6 days and were compared by flow cytometry analysis for their expression of CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, HLA-DR and CD14. The immature DC from healthy donors or AML patients before or after CT presented similar phenotypes with low expression of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 (figure 2a). As expected for immature DC, CD83 expression was nearly negative whatever the cell origin, whereas CD14 expression was positively noted. Interestingly, we noted a homogeneous HLA-ABC expression whereas HLA-DR was higher expressed (although not statistically significant) in healthy donors.

The phagocytosis properties of the immature DC were also assessed by the uptake of FITC-dextran beads (figure 2b). Phagocytosis is indeed an important parameter for the monitoring of *ex vivo* immature DC generation and is also a tumour antigen loading strategy. As shown in a representative experiment, the DC phagocytotic properties were similar between patients and healthy donors.

Because the maturation of monocyte-derived DC could be altered either by the tumour environment or by the CT, we evaluated the maturation properties of DC from AML patients. Immature DC were treated for 24h by $\text{TNF}\alpha$ + Poly I:C, as we previously proposed (Spisek *et*

al., 2001) and phenotypically analysed. As shown in figure 2a, dramatic increased expressions (statistically significant) of CD80, CD83, CD86 and HLA-ABC were observed for healthy as well as for leukemic donors. HLA-DR expression was slightly up-regulated. By contrast, CD14 expression slightly decreased with maturation for all DC populations, as expected. Thus, no significant difference was observed between leukemic and healthy donors for their mature DC phenotypes.

Functional properties of matured DC in the T cell activation, depends also on the cytokines produced. It is generally reported that IL-12p70 is related to Th1 activation, whereas IL-10 is related to the Th2 (Mohamadzadeh *et al.*, 2001). Thus, we compared the cytokine secretion levels by the matured DC (figure 3). Similar IL-12p70 expressions were noticed whatever the cell origins, whereas significant lower secretion of IL-10 was measured for DC obtained from AML patients before they received their CT.

Sample timing for DC generation

In our study, patients were sampled after aplasia phase, from 21 to 113 days after CT. It has been reported that hematopoietic regeneration phase, after CT cure, was beneficial for Mo-DC generation (de Jong *et al.*, 2002), notably with higher DC production yields when patients were sampled within 2 months after CT. We thus investigated DC production, depending on the delay between the last CT treatment and the blood sample. When blood was sampled within 21 days to 60 days after CT, DC production was successful in 15 attempts out of 16 (table 2b). By contrast, after 60 days post CT, DC generation was impeded since it succeeded in only one third of the attempts (2 out of 6). We then determined PBMC number according to the time elapsed (figure 4a). We noticed a negative correlation between the PBMC number and the delay since the last CT ($p=0.0230$). The same observation was made with the DC

generated number ($p=0.0442$) (figure 4b). As expected, DC number was correlated with PBMC number ($p=0.0094$) (figure 4c).

Since DC generation was favoured from 21 to 60 days after CT, we investigated DC activation during this period. Likewise, DC maturation was analysed in relation to the delay from the last CT treatment. Markers analysed were CD80, CD83, CD86, HLA-ABC and HLA-DR expression as well as IL-12p70 and IL-10 cytokine secretion. As showed in figure 5a, a significant negative correlation was noticed between CD86 expression and the delay elapsed ($p=0.0332$). Although not statistically significant, we also noted a decrease in CD80 expression with time after CT. However, no correlation was noted for CD83, HLA-ABC and HLA-DR expressions and the delay after CT. Analysis of IL-12p70 and IL-10 secretion according to time from the last CT cure reveals no propensity between cytokine secretion and time elapsed after CT (figure 5b).

T cell stimulatory capacities

We finally checked the T cell stimulatory capacities of DC produced from patients sampled from 21 days to 60 days after CT. Patient DC were compared in an allogeneic MLR, with healthy donor DC, for their stimulatory capacities. As shown in figure 6, patient DC stimulated T cells as efficiently as healthy donor DC.

Discussion

Efficiency of AML treatments is restricted by high relapse frequency. Thus, additional therapeutic modalities are explored to maintain patients under CR. There are evidences, nowadays that T cell response is implicated in haematological malignancy relapse prevention (Horowitz *et al.*, 1990; Molldrem *et al.*, 2000; Tatsumi *et al.*, 2001). Immunotherapy protocols, likely to elicit CTL response able to eliminate residual tumoral cells are then of great interest, and new AML treatments with DC are under investigation.

Leukemic blasts which could be differentiated into DC with phenotypical and functional properties (Charbonnier *et al.*, 1999; Choudhury *et al.*, 1999; Cignetti *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2001), makes them potent APC for T cell activation. However, despite numerous protocols for blast differentiation (Charbonnier *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2001; Mackensen *et al.*, 2000; Panoskaltsis, 2005; Panoskaltsis *et al.*, 2002) this strategy is still questionable in consideration of reproducibility difficulty and incertitude as for leukemic DC effect (Roddie *et al.*, 2006). We thus favored DC production from non-leukemic monocytes (cured patients). Mo-DC generation in AML patients was investigated at different treatment stages. Before CT, DC were generated in about 70% of the patients tested (15 out of 21). Yet, because of the lack of non specific chromosomal rearrangements or aberrant lymphoid marker expression, the origin of the DC was not systematically verified and leukemic-DC contaminations remain possible in Mo-DC preparations. By contrast, in healthy donors, DC generation was successful in more than 90% of the attempts (14 out of 15). Interestingly, before CT, DC generation failed with 5 samples that were free of blast. This suggests that the monocyte functionality is rather altered by AML disease than blast contamination.

We then analyzed the impact of CT cures on DC activation. In various cancer suffering patients, *in vitro* DC activation has been investigated after CT treatments (Curti *et al.*, 2004; Schutt *et al.*, 2005; Syme *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2000). These studies

mainly showed the feasibility to generate DC. Besides, from healthy donors, Mohty *et al.* analyzed the impact of thalidomide on DC production, with no impact on monocyte differentiation, but differential effect on DC stimulatory function according to thalidomide concentration (Mohty *et al.*, 2002). In AML, lots of works were conducted from blast differentiation, e.g. before CT treatment. However, to the best of our knowledge, only one study deals with DC generation from non-leukemic monocytes after CT cure, from patients in complete remission of AML (de Jong *et al.*, 2002). The authors noted higher culture yield when blood was sampled within two months after CT and significantly less DC generation after two months. Yet, no accurate data concerning Mo-DC maturation and functionality after CT are available. Our data showed that, compared to healthy donor controls, there is low difference to produce immature DC in AML patients before and after CT treatments. We only noted that the expressions of CD14 and HLA-DR were weakly reduced for AML patient, suggesting environmental but not chemotherapeutic effect on immature DC phenotypes. Also, phagocytic properties of these cells are not altered. In addition, these immature DC from CT cured patients are easily activated in mature DC after treatment with inflammatory and/or pathogen-like signals. Cytarabine and idarubicin were the shared treatments for all AML patients. Half of the patients also received methotrexate and purenitol as a second line of chemotherapy. Thus, these treatments do not seem to have incidence on the production and maturation of the dendritic cells and their functional properties.

However, because the DC vaccination protocols that would be engaged require large functional DC number ($\sim 10^8$ cells) early after CT cure, we therefore investigated the optimal timing for DC production after CT treatment. In order to avoid leukocyte depletion phase (see (Mackall, 1999) for review), we set DC production from 20 days up to 113 days after the treatment. After CT, DC generation succeeded in 17 out of 22 attempts. Interestingly, DC production was almost always feasible from 20 to 60 days after CT treatment (15 out of 16).

By contrast, when patients were sampled 2 months or longer after treatment, DC generation was achieved with only one third of the samples (2 out of 6). Furthermore, the DC number and the PBMC number generated were higher when patients were sampled early after the end of aplasia (two to three weeks after CT). Thus, as previously described by Schui and collaborators (de Jong *et al.*, 2002), hematopoietic regeneration appears as a favorable time for DC generation in AML patients. Interestingly, our results also highlight a better DC maturation during hematopoietic regeneration, with in particular a negative correlation between CD86 co-stimulatory molecule expression and the delay elapsed from CT. From 20 to 60 days post CT treatment is the optimal timing for Mo-DC generation. Immature DC produced in this time were functionally active with phagocytosis capacities, and the IL-12p70 cytokine secretion and high T cell stimulatory properties after maturation.

As we presently showed, DC production is optimal as early after the end of aplasia. Thus DC-preparation for immunological treatment must be planned after aplasia, but not later than the second month following CT cures. In the case of AML, whereas reduced T cell population has been shown after CT (Wendelbo *et al.*, 2004), the T cells remaining had an increased proliferative responsiveness following anti-CD3 + anti CD28 stimulation. Thus, this T cell population could then be able to respond to mature DC stimulation. Consequently, vaccination with AML antigen loaded DC, early after CT could be used to deliberately skewed T cell reconstitution towards anti-tumoral response. Reasonably, cytokine “sink” elimination as well as CD4+CD25+ regulatory T cell impairment described after CT treatment (Beyer *et al.*, 2005; Gattinoni *et al.*, 2005; Klebanoff *et al.*, 2005), although not yet for AML patients, might contribute to the enhancement of the immune response following vaccination.

In conclusion, we provide here new elements for DC preparation from AML patient in CR after CT treatment, in the view of antitumor vaccination. Further experiments will have to be

leded to determine if DC preparation as well as "favorable" T cell populations (CTL, but not regulatory T cells) soon after CT cure, allow the development of efficient anti-leukemic immune response *in vivo*.

References

- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103, 620-625.
- Beyer, M., Kochanek, M., Darabi, K., Popov, A., Jensen, M., Endl, E., Knolle, P. A., Thomas, R. K., von Bergwelt-Baildon, M., Debey, S., *et al.* (2005). Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 106, 2018-2025.
- Bocchia, M., Bronte, V., Colombo, M. P., De Vincentiis, A., Di Nicola, M., Forni, G., Lanata, L., Lemoli, R. M., Massaia, M., Rondelli, D., *et al.* (2000). Antitumor vaccination: where we stand. *Haematologica* 85, 1172-1206.
- Bruserud, O., and Wendelboe, O. (2001). Biological treatment in acute myelogenous leukaemia: how should T-cell targeting immunotherapy be combined with intensive chemotherapy? *Expert Opin Biol Ther* 1, 1005-1016.
- Buggins, A. G., Milojkovic, D., Arno, M. J., Lea, N. C., Mufti, G. J., Thomas, N. S., and Hirst, W. J. (2001). Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-kappaB, c-Myc, and pRb pathways. *J Immunol* 167, 6021-6030.
- Charbonnier, A., Gaugler, B., Sainty, D., Lafage-Pochitaloff, M., and Olive, D. (1999). Human acute myeloblastic leukemia cells differentiate in vitro into mature dendritic cells and induce the differentiation of cytotoxic T cells against autologous leukemias. *Eur J Immunol* 29, 2567-2578.
- Choudhury, B. A., Liang, J. C., Thomas, E. K., Flores-Romo, L., Xie, Q. S., Agusala, K., Sutaria, S., Sinha, I., Champlin, R. E., and Claxton, D. F. (1999). Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood* 93, 780-786.

Cignetti, A., Vallario, A., Roato, I., Circosta, P., Allione, B., Casorzo, L., Ghia, P., and Caligaris-Cappio, F. (2004). Leukemia-derived immature dendritic cells differentiate into functionally competent mature dendritic cells that efficiently stimulate T cell responses. *J Immunol* 173, 2855-2865.

Curti, A., Isidori, A., Ferri, E., Terragna, C., Neyroz, P., Cellini, C., Ratta, M., Baccarani, M., and Lemoli, R. M. (2004). Generation of dendritic cells from positively selected CD14⁺ monocytes for anti-tumor immunotherapy. *Leuk Lymphoma* 45, 1419-1428.

Figdor, C. G., de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., and Melief, C. J. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 10, 475-480.

Gattinoni, L., Finkelstein, S. E., Klebanoff, C. A., Antony, P. A., Palmer, D. C., Spiess, P. J., Hwang, L. N., Yu, Z., Wrzesinski, C., Heimann, D. M., *et al.* (2005). Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 202, 907-912.

Gregoire, M., Ligeza-Poisson, C., Juge-Morineau, N., and Spisek, R. (2003). Anti-cancer therapy using dendritic cells and apoptotic tumour cells: pre-clinical data in human mesothelioma and acute myeloid leukaemia. *Vaccine* 21, 791-794.

Harrison, B. D., Adams, J. A., Briggs, M., Brereton, M. L., and Yin, J. A. (2001). Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 97, 2764-2771.

Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., Kolb, H. J., Rimm, A. A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., and *et al.* (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75, 555-562.

Imoto, S., Murayama, T., Gomyo, H., Mizuno, I., Sugimoto, T., Nakagawa, T., and Koizumi, T. (2000). Long-term molecular remission induced by donor lymphocyte infusions for recurrent acute myeloblastic leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26, 809-810.

Klebanoff, C. A., Khong, H. T., Antony, P. A., Palmer, D. C., and Restifo, N. P. (2005). Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends Immunol* 26, 111-117.

Kohler, T., Plettig, R., Wetzstein, W., Schmitz, M., Ritter, M., Mohr, B., Schaekel, U., Ehninger, G., and Bornhauser, M. (2000). Cytokine-driven differentiation of blasts from patients with acute myelogenous and lymphoblastic leukemia into dendritic cells. *Stem Cells* 18, 139-147.

Li, L., Reinhardt, P., Schmitt, A., Barth, T. F., Greiner, J., Ringhoffer, M., Dohner, H., Wiesneth, M., and Schmitt, M. (2005). Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens. *Cancer Immunol Immunother* 54, 685-693.

Lowenberg, B., Griffin, J. D., and Tallman, M. S. (2003). Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 82-101.

Mackall, C. L. (1999). T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review. *Oncologist* 4, 370-378.

Mohty, M., Stoppa, A. M., Blaise, D., Isnardon, D., Gastaut, J. A., Olive, D., and Gaugler, B. (2002). Differential regulation of dendritic cell function by the immunomodulatory drug thalidomide. *J Leukoc Biol* 72, 939-945.

Molldrem, J. J., Lee, P. P., Wang, C., Felio, K., Kantarjian, H. M., Champlin, R. E., and Davis, M. M. (2000). Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med* 6, 1018-1023.

Nestle, F. O., Farkas, A., and Conrad, C. (2005). Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr Opin Immunol* 17, 163-169.

Panoskaltzis, N. (2005). Dendritic cells in MDS and AML--cause, effect or solution to the immune pathogenesis of disease? *Leukemia* 19, 354-357.

Panoskaltzis, N., Belanger, T. J., Liesveld, J. L., and Abboud, C. N. (2002). Optimal cytokine stimulation for the enhanced generation of leukemic dendritic cells in short-term culture. *Leuk Res* 26, 191-201.

Pulendran, B. (2004). Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res* 29, 187-196.

Ridgway, D. (2003). The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest* 21, 873-886.

Roddie, H., Klammer, M., Thomas, C., Thomson, R., Atkinson, A., Sproul, A., Waterfall, M., Samuel, K., Yin, J., Johnson, P., and Turner, M. (2006). Phase I/II study of vaccination with dendritic-like leukaemia cells for the immunotherapy of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 133, 152-157.

Schui, D. K., Singh, L., Schneider, B., Knau, A., Hoelzer, D., and Weidmann, E. (2002). Inhibiting effects on the induction of cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells pulsed with lysates from acute myeloid leukemia blasts. *Leuk Res* 26, 383-389.

Schutt, P., Buttkereit, U., Brandhorst, D., Lindemann, M., Schmiedl, S., Grosse-Wilde, H., Seeber, S., Nowrousian, M. R., Opalka, B., and Moritz, T. (2005). In vitro dendritic cell generation and lymphocyte subsets in myeloma patients: influence of thalidomide and high-dose chemotherapy treatment. *Cancer Immunol Immunother* 54, 506-512.

Smith, M., Barnett, M., Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C., and Kern, W. (2004). Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 50, 197-222.

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.

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

Syme, R. M., Duggan, P., Stewart, D., and Gluck, S. (2001). Generation of dendritic cells ex vivo: differences in steady state versus mobilized blood from patients with breast cancer, with lymphoma, and from normal donors. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 621-630.

Wendelbo, O., Nesthus, I., Sjo, M., Paulsen, K., Ernst, P., and Bruserud, O. (2004). Functional characterization of T lymphocytes derived from patients with acute myelogenous leukemia and chemotherapy-induced leukopenia. *Cancer Immunol Immunother* 53, 740-747.

Yi, Q., Desikan, R., Barlogie, B., and Munshi, N. (2002). Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 117, 297-305.

Zheng, C., Pisa, P., Stromberg, O., Blennow, E., and Hansson, M. (2000). Generation of dendritic cells from peripheral blood of patients at different stages of chronic myeloid leukemia. *Med Oncol* 17, 270-278.

Figure legends

Table 1. Patient characteristics.

Table 2. DC generation and chemotherapy treatments. Data from table (a) are summarized in table (b).

Figure 1. DC generation. Monocytes were isolated by plastic adherence. Then, differentiation was carried for 6 days with GM-CSF and IL-4. At day 6, DC characterized by morphology and trypan blue exclusion were numbered. (a) DC generation yield was expressed as number of DC at day 6 in relation to the blood sample volume. (b) DC viability was calculated on the base of TO-PRO-3-iodide staining.

Figure 2. DC characterization. (a) Phenotypic characterization of immature and mature DC. DC were gated according to their morphological properties and viability (based on TO-PRO-3 iodide staining). Only viable cells were included in the final analysis. Markers analyzed were CD80, CD83, CD86, HLA-ABC HLA-DR and CD14. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI). (b) DC phagocytosis properties. Immature and 24h TNF α + Poly I:C activated DC from CR remission patients or healthy donors were assessed for phagocytosis. DC were incubated with FITC-dextran for 2 hours. Then phagocytosis was determined by flow cytometry.

Figure 3. Cytokine secretion. IL-12p70 and IL-10 secreted by mature DC were determined by ELISA.

Figure 4. DC generation and the delay from the last CT treatment. PBMC number **(a)** or DC number at day 6 **(b)** according to the time elapsed, in days, between the last CT treatment and the blood sample. **(c)** DC number generated as a function of PBMC number.

Figure 5. DC maturation and the delay from the last CT treatment. **(a)** DC marker expression according to the time elapsed, in days, between the last CT treatment and the blood sample. **(b)** Cytokine secretion according to the time elapsed, in days, between the last CT treatment and the blood sample.

Figure 6. T cell stimulatory capacities. The capacity of DC to stimulate a T cell-response was analyzed in a mixed leukocyte reaction. Increasing numbers of DC treated with TNF α + poly I:C for 24 hours were used to stimulate allogeneic T lymphocytes. Proliferation of allogeneic T lymphocytes was determined after 4 days by ^3H -thymidine incorporation over a period of 18 hours. Four CR patients were sampled within 60 days from the last CT treatment. Three healthy donors were used as proliferation control.

Patients	Sex/Age ^a	FAB	Cytogenetic	% blasts ^b	Chemotherapy
1	F/74	M2	Complex	76	Cy, Id
2	M/64	M5	46, XY[20]	40	-
3	F/51	M4	46, XX, inv 16[8]	13	-
4	F/64	M2	46, XX[20]	0	Cy, Id, Met, Pu
5	F/52	M1	46, XX[20]	60	-
6	M/67	M5	48, XY, +8, +8[5], 46, XY[1]	0	Cy, Id, Lo, Met, Pu
7	M/30	M5	47, XY t(11;17), 46, XY[1]	30	-
8	F/62	M0	46, XX, d(7)(q32)	0	Cy, Id, Lo, Met, Pu
9	M/68	M2	46, XY[20]	3,5	Cy, Id, Lo, Met, Pu
10	M/61	M6	47, XY + 8[2]	0	-
11	M/38	M2	46, XY[20]	0	Cy, Id
12	F/45	M1	42, X, -X, -3, -4, -5, del(12), add(15)	0	-
13	M/60	M3	46, XY, t(15;17)	0	Atra, Da, Met, Pu
14	M/67	M2	46, XY[20]	22	Cy, Id
15	F/66	M2	ND	0	-
16	F/53	M2	46, XY[20]	0	Ida, Cy, Lo, Met, Pu
17	M/24	M6	46, XY[20]	13	-
18	M/48	M6	Complex	0	-
19	M/68	M2	ND	0	Cy, Id, Met, Pu
20	M/49	M1	ND	0	-
21	F/23	M1	46, XX, t(8;21)	56	Cy, Da
22	M/63	M2	46, XY	11	Cy, Ida, Lo, Met, Pu

^a: age at diagnostic. ^b: blast % in blood.

Am, amsacrine; ATRA, all-trans retinoic acid; Cy, cytarabine; Da, daunorubicin; Id, idarubicin; Lo, lomustine; Met, methotrexate; MGBG, methyl-glyoxal bis-guanylhydrazone; Mi, mitoxantrone; Pu, purenitol.

Table 1

DC generation			
Patients	Before CT	After chemotherapy	
		Differentiation	Time*
1	Pass	Pass	55
2	Pass	ND	-
3	Pass	ND	-
4	Pass	Fail	84
5	Pass	ND	-
6	Pass	Pass; pass	38; 58
7	Pass	ND	-
8	Fail	Pass; pass	58; 113
9	Pass	Pass; fail	39; 94
10	Fail	ND	-
11	Pass	Pass; pass	21; 27
12	Fail	ND	-
13	Fail	Pass; pass; fail	65; 39; 79
14	Pass	Failed, Pass; pass	26, 36; 43
15	Fail	ND	-
16	Pass	Pass	30
17	Fail	ND	-
18	Pass	ND	-
19	Pass	Fail	100
20	Pass	ND	-
21	Pass	Pass	52
22	ND	Pass; pass; pass	30; 30; 60

CT: chemotherapy. * Time in day from the last CT treatment and the blood sampling. Pass: when at least 10 000 DC were generated per blood ml. Fail: when less than 10 000 DC were generated per blood ml. ND: not done.

DC generation				
	Before CT	After CT		Healthy donors
		Within 60 days	Post 60 days	
Pass	15	15	2	14
Fail	6	1	4	1

Table 2

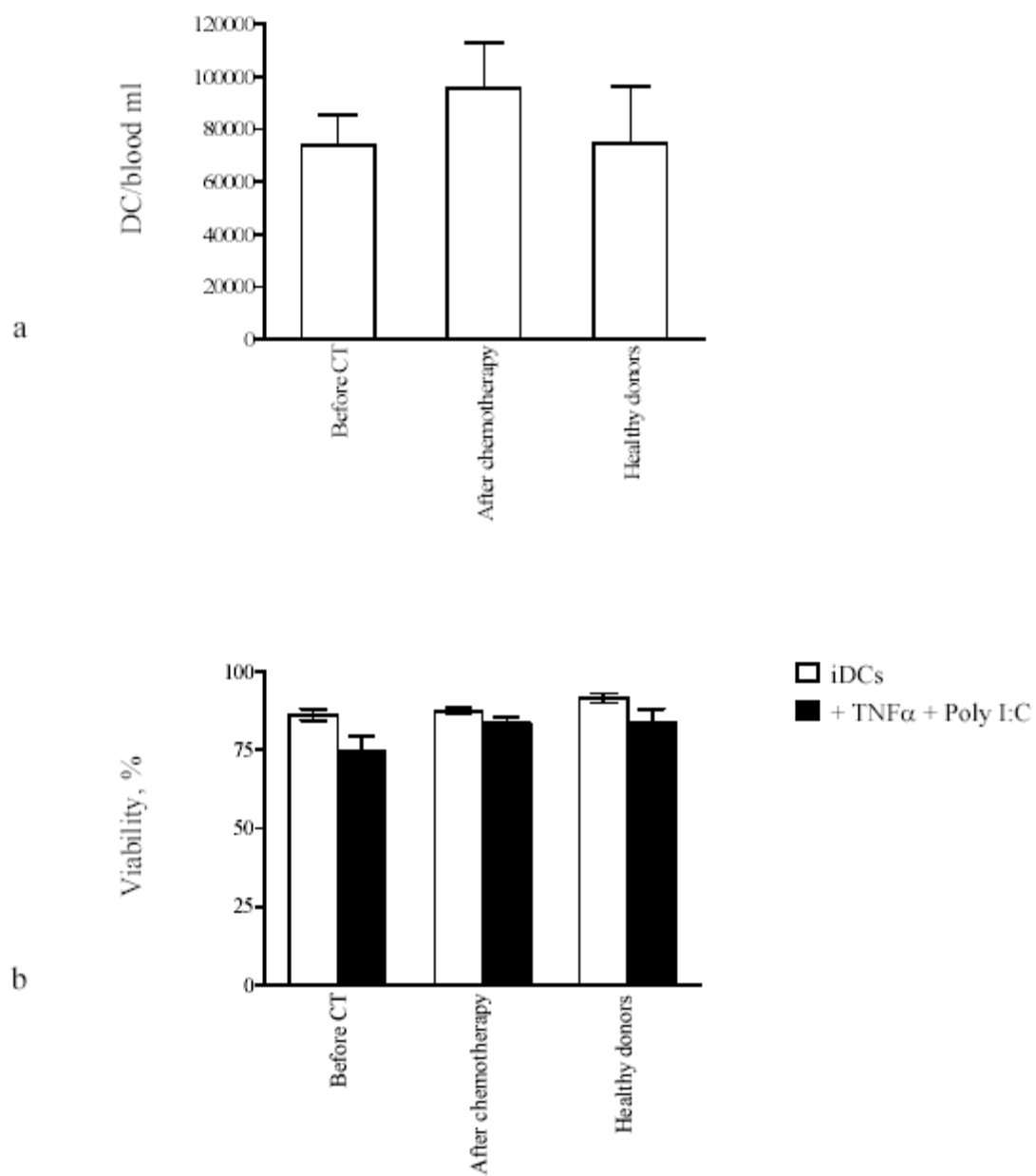


Figure 1

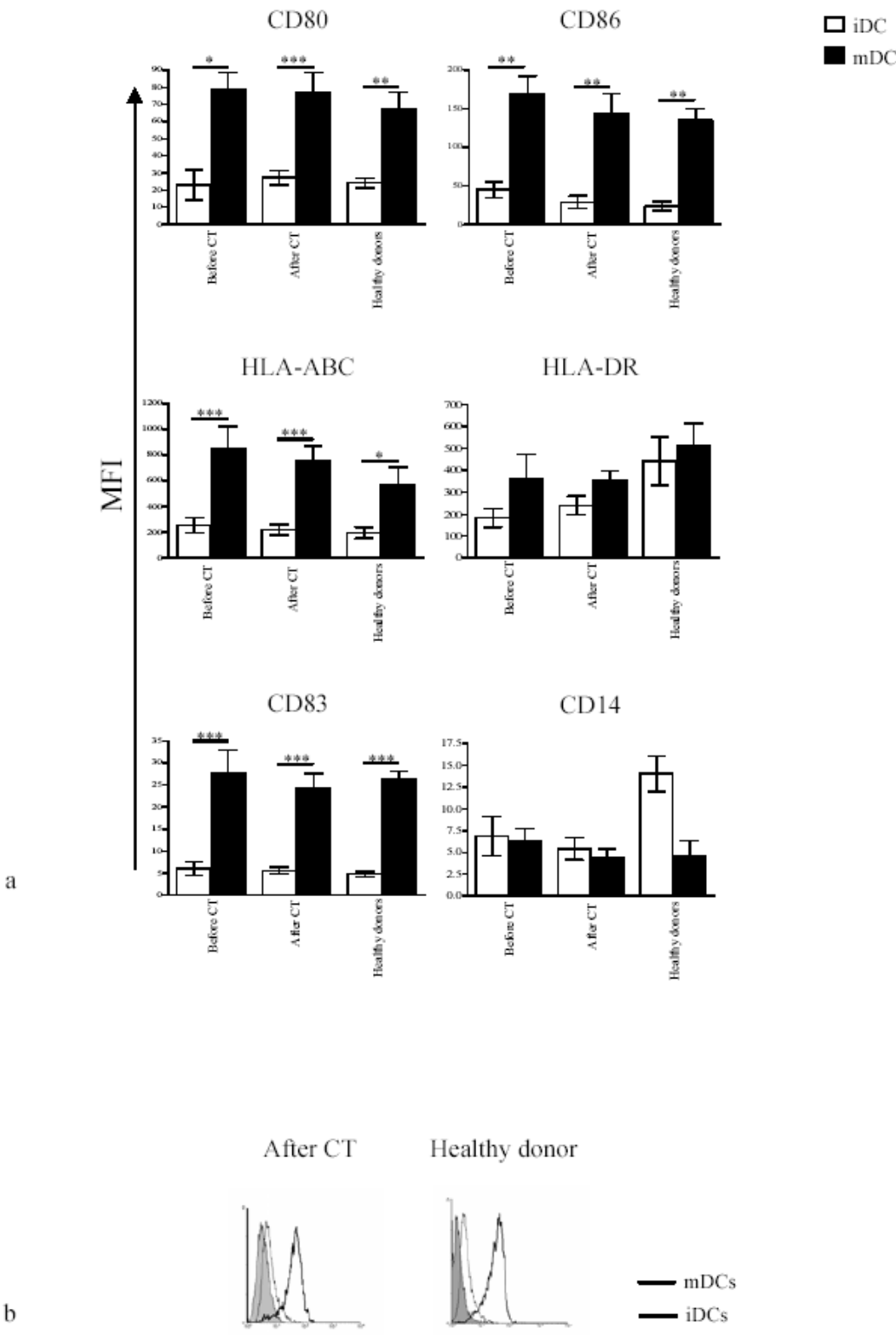


Figure 2

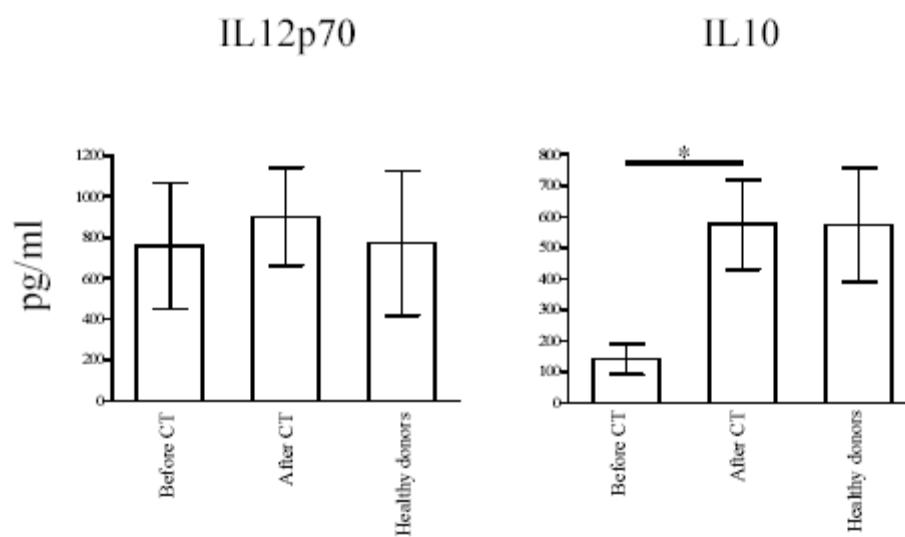


Figure 3

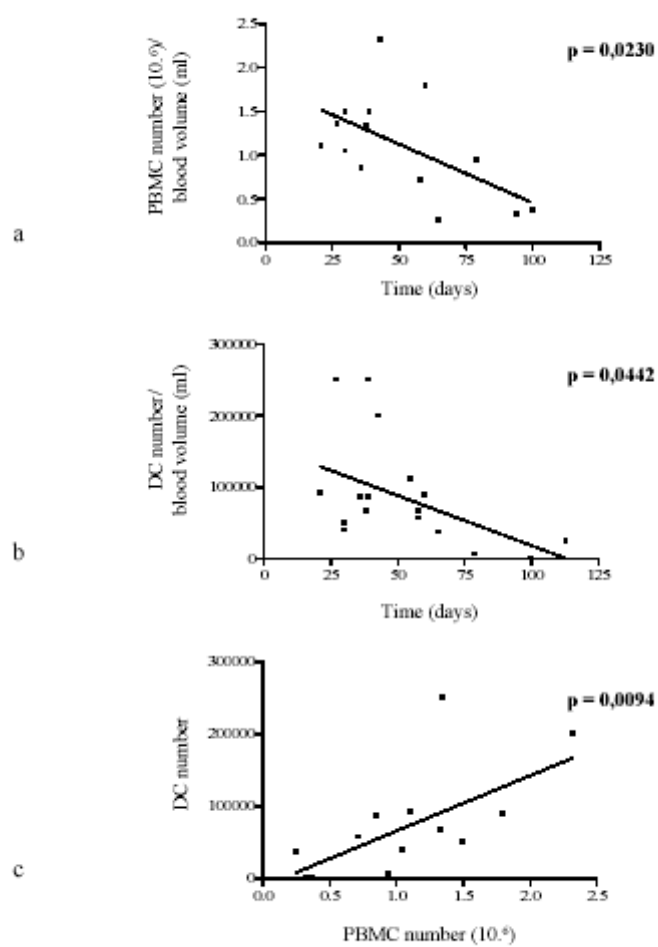


Figure 4

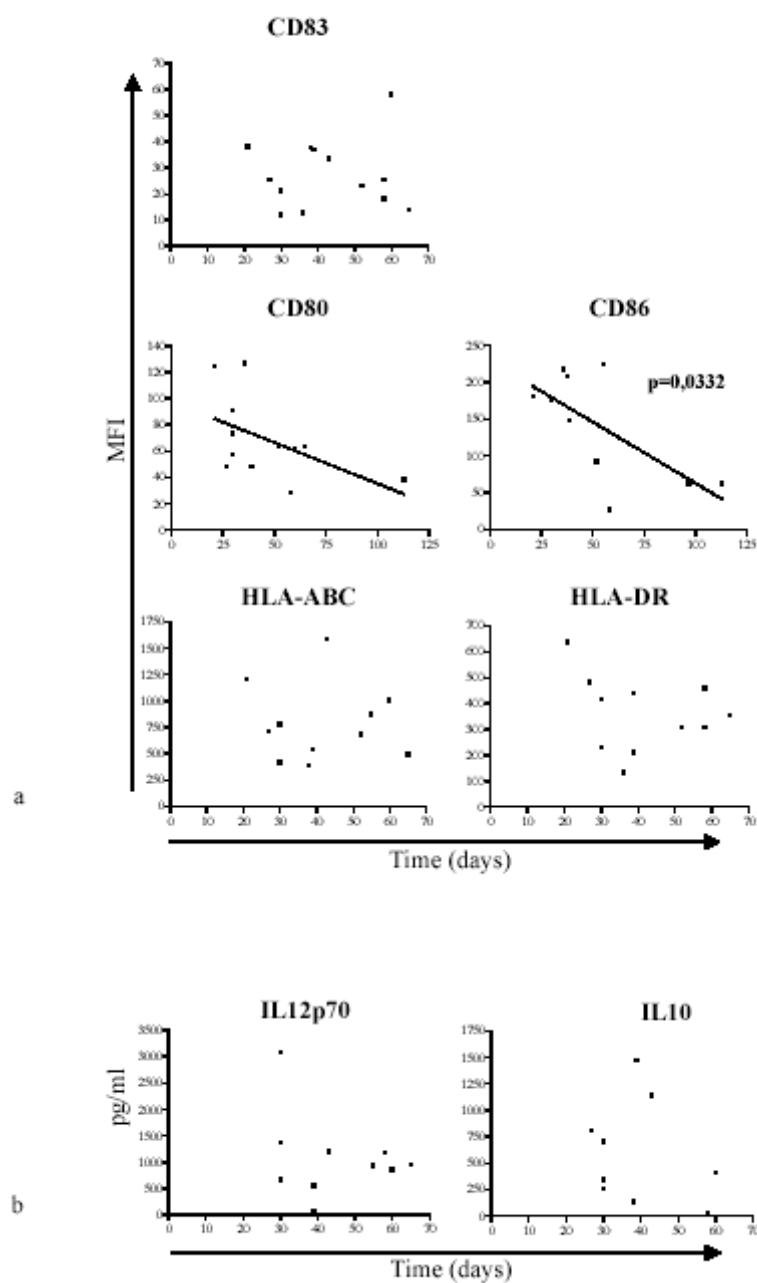


Figure 5

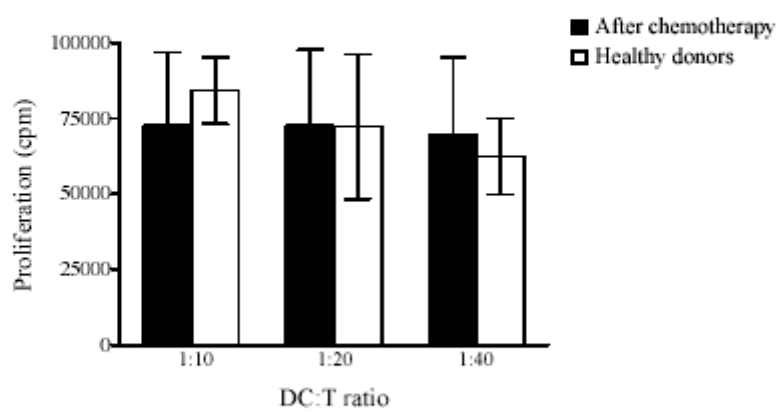


Figure 6

III. Production de clones T CD8 dirigés contre deux épitopes dérivés de l'AFP (α -foetoprotéine) et présentés dans le contexte HLA-A*0201

En collaboration avec l'équipe du Dr. Nicolas Ferry (INSERM CIC 04).

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est un cancer de pronostic très sombre, avec un taux de survie inférieur à 10% à 5 ans. Par ailleurs, son incidence est croissante du fait de la pandémie de l'hépatite C (Bruix *et al.*, 2004; Thomas et Zhu, 2005). Différentes stratégies thérapeutiques existent (transplantation hépatique, résection chirurgicale, destructions percutanées par alcoolisation ou radiofréquence) mais elles ne sont applicables qu'à peu de patients. De plus, à l'exception du traitement par transplantation hépatique, le risque de récurrence est élevé même après traitement curatif. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques est donc nécessaire.

Plusieurs essais d'immunothérapie du CHC ont mis en évidence l'induction de réponses immunologiques et cliniques. En 2000, une équipe rapporte un essai randomisé d'immunothérapie adoptive, portant sur 150 patients, par injection de lymphocytes T activés *in vitro* avec de l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 (Takayama *et al.*, 2000). Le traitement diminue la fréquence des récurrences et prolonge la durée de vie sans récurrence. En revanche, il n'améliore pas la survie globale. L'injection de cellules tumorales, en présence de GM-CSF, d'IL-2 et du Bacille de Calmette et Guérin, permet de diminuer la fréquence des récurrences et de prolonger la survie globale des patients (Kuang *et al.*, 2004). Enfin, des essais de vaccinations, avec des DC chargées par du lysat tumoral ont été réalisés, avec des bénéfices cliniques toutefois limités (Iwashita *et al.*, 2003; Ladhams *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Stift *et al.*, 2003). L'ensemble de ces résultats démontre l'innocuité de l'immunothérapie dans le cadre du CHC et justifie le développement de nouvelles méthodologies.

L' α -foetoprotéine (AFP) est une protéine exprimée naturellement par les tissus embryonnaires. Son expression est perdue au cours du développement mais elle peut être ré exprimée chez 40 à 60% des patients atteints de CHC. Quatre épitopes immunodominants dérivés de l'AFP et présentés dans le contexte HLA-A*0201 ont été identifiés : hAFP₁₃₇₋₁₄₅ (PLFQVPEPV), hAFP₁₅₈₋₁₆₆ (FMNKFIYEI), hAFP₃₂₅₋₃₃₄ (GLSPNLNRFL), et hAFP₅₄₂₋₅₅₀

GVALQTMKQ (Butterfield *et al.*, 2001). Des expériences dans des modèles animaux ont démontré l'efficacité anti-tumorale de la vaccination dirigée contre l'AFP (Grimm *et al.*, 2000; Tatsumi *et al.*, 2001; Vollmer *et al.*, 1999). Chez l'homme, des réponses lymphocytaires sont observées après l'injection des 4 peptides dérivés de l'AFP chez des patients atteints de CHC (Butterfield *et al.*, 2003b). La vaccination de patients avec des DC chargées avec ces 4 peptides a été rapportée dernièrement. Sur 10 patients vaccinés, 6 présentent une expansion significative de lymphocytes T spécifiques. Par contre, les réponses cliniques restent limitées. Dans cet essai néanmoins, les DC sont préparées sans agent de maturation.

Dès lors, nous proposons un essai de vaccination de patients atteints de CHC par DC matures chargées avec les peptides dérivés de l'AFP. Dans le cadre de ce projet, nous avons généré des clones T CD8 dirigés contre 2 des épitopes identifiés : hAFP₁₃₇₋₁₄₅ (PLFQVPEPV) et hAFP₁₅₈₋₁₆₆ (FMNKFIYEI). Ces clones ont été obtenus après sensibilisation de populations lymphocytaires issues de donneurs sains par les DC autologues chargées avec les peptides synthétiques correspondants. Ils seront utilisés dans le protocole clinique (PHRC national pour son financement, étude en phase pré clinique) pour s'assurer du chargement des DC injectées.

Ces clones représentent également un outil intéressant, pour l'étude de l'expression de l'AFP par les cellules tumorales ou de sa présentation croisée par les DC. Nous présentons ici la caractérisation de ces clones en analysant leur réponse contre les cellules T2 chargées en peptides et contre des lignées de CHC exprimant l'AFP.

III.1. Génération-maturation des DC

Les DC sont générées à partir de monocytes issus du sang de donneurs volontaires sains consentants (HLA-A2+) de l'EFS de Nantes. Les cellules mononucléées sont purifiées par centrifugation sur gradient de ficoll et les monocytes sont enrichis par élutriation. Le pourcentage de monocytes, déterminé par l'expression du marqueur CD14, est supérieur à 80% (figure 13a). Les monocytes sont alors ensemencés à une concentration de 2.10^6 cellules par ml, en présence de GM-CSF (500UI/ml) et d'IL-4 (40ng/ml). Après 6 jours de culture, les DC immatures sont remises en culture à une concentration de 10^6 cellules par ml, dans du milieu frais, en présence de GM-CSF et d'IL-4. La maturation des DC (24h) est assurée par la combinaison $TNF\alpha$ (20 ng/ml) + Poly I:C (50 μ g/ml). Elle est contrôlée par l'analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs CD80, CD83, CD86, HLA-ABC et CD14 (figure 13b).

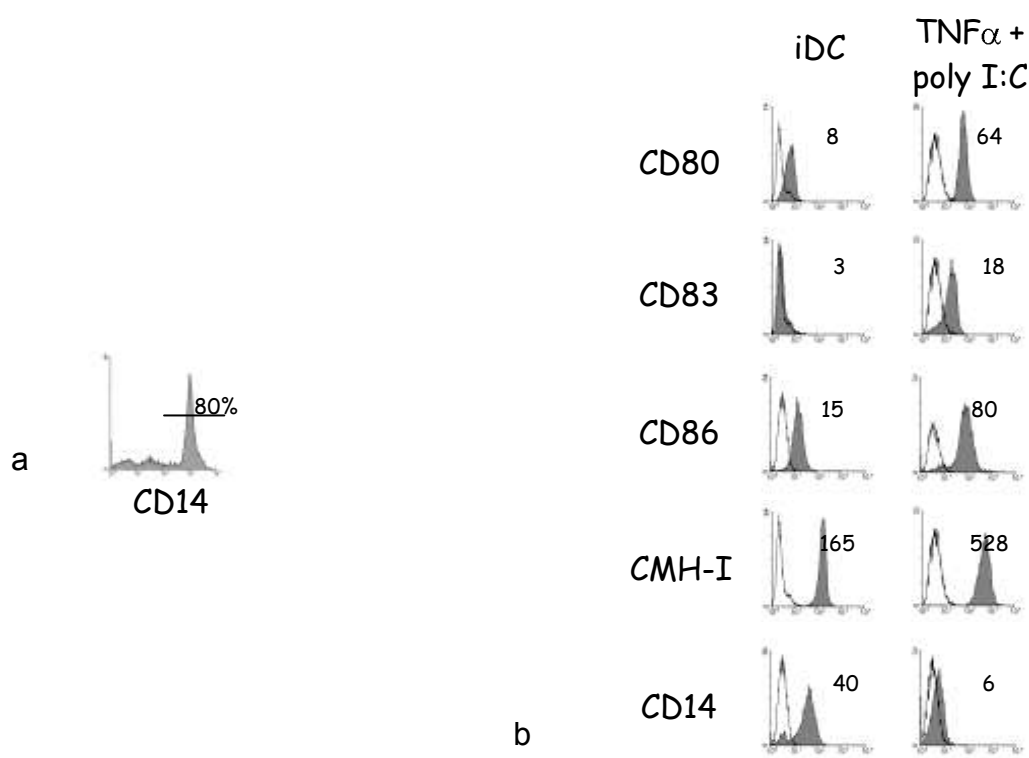


Figure 13 : Analyse par cytométrie de la purification des monocytes (a) et de la génération et de la maturation des DC (b). Les contrôles isotypiques sont représentés par les histogrammes blancs, les marqueurs d'intérêt par les histogrammes gris. Le pourcentage de cellules (a) ou les médianes de fluorescence (b) sont précisées.

III.2 Purification des lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T CD8 sont purifiés à partir du sang grâce à l'addition de cocktail d'anticorps RosetteSep (StemCell Technologies) et centrifugation sur gradient de ficoll. Le pourcentage de lymphocytes, déterminé par l'expression du marqueur CD8, est supérieur à 70%. Ils sont congelés à ce stade en présence de SVF + DMSO 10% à raison de 50.10^6 cellules /ml.

III.3 Sensibilisation des lymphocytes T CD8 autologues

Après maturation, les DC sont chargées pendant 2h à 37°C avec 10µg/ml de peptides synthétiques dérivés de l'AFP. Quatre préparations de DC sont réalisées. Les DC et les lymphocytes T sont alors co-cultivés en plaque 96 puits à fond rond, en milieu RPMI + 6% sérum humain + 1% Pénicilline/Streptomycine + 1% de L-Glutamine, en présence d'IL-6 (5ng/ml) et d'IL-12 (5ng/ml) au cours de la première stimulation, puis en présence d'IL-2 (10U/ml) et d'IL-7 (5ng/ml) pour les 2 stimulations suivantes (Fonteneau *et al.*, 2001). Les stimulations sont réalisées à une semaine d'intervalle. La fréquence des lymphocytes T spécifiques, vis-à-vis des peptides de l'AFP, est estimée en réponse à ces peptides présentés par la lignée T2 (lignée TAP déficiente).

Après 3 stimulations, la fréquence des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux est déterminée par cytométrie en flux (figure 14). Un double marquage CD8/IFN γ , révèle alors la présence de lymphocytes T spécifiques des épitopes hAFP₁₃₇₋₁₄₅ (0,3%) et hAFP₁₅₈₋₁₆₆ (3,1%).

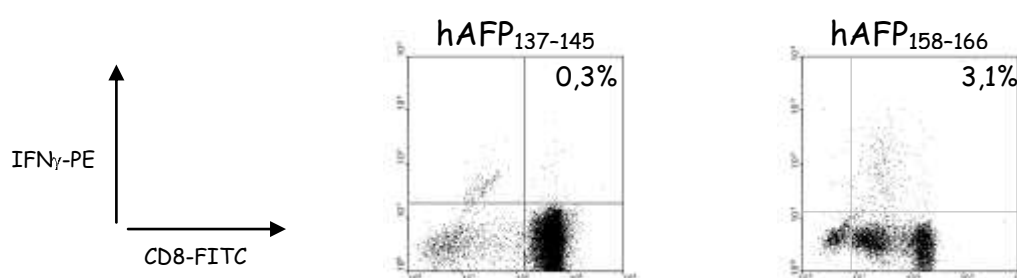


Figure 14 : Analyse de la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T CD8, après 3 sensibilisations, vis-à-vis des deux peptides hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et hAFP₁₅₈₋₁₆₆, présentés par la lignée T2. La sécrétion d'IFN γ est analysée par marquage intracellulaire par cytométrie en flux.

III.4 Clonage des lymphocytes T CD8

Nous avons ensuite procédé au clonage des lymphocytes T CD8, dirigés contre les deux épitopes, hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et hAFP₁₅₈₋₁₆₆, générés après 3 stimulations. La population de lymphocytes T, dirigés contre l'épitope hAFP₁₃₇₋₁₄₅, a été préalablement enrichie par un tri immunomagnétique par multimères avant clonage.

Pour cela, les monomères HLA-A*0201/AFP₁₃₇₋₁₄₅ sont incubés 1h, à température ambiante, avec des billes coatées en streptavidine (Dynabeads M-280 streptavidin; DYNAL). Les multimères ainsi générés sont lavés avec du PBS 0,1% BSA. Pour le tri, 5.10^6 lymphocytes sont incubés pendant 4h à 4°C avec les multimères. Après 10 lavages, les lymphocytes triés sont alors amplifiés. Ils sont ensemencés dans du milieu RPMI complémenté avec 6% de sérum humain. Leur croissance est assurée par de la phytohemagglutinin-L (1µg/ml), de l'IL-2 (150U/ml) ainsi que des cellules "feeder" irradiées : cellules mononucléées (10^5 /puits) et des cellules LAZ, une lignée B immortalisée, (10^4 /puits). Le milieu, avec IL-2 mais sans phytohemagglutinin-L, est renouvelé tous les 3 jours.

Le clonage est ensuite réalisé en plaque 96 puits à fond rond. Les lymphocytes sont ensemencés à 0,3 cellules par puits et sont amplifiés comme vu précédemment. Après deux semaines de culture, la spécificité des clones, CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆, est vérifiée contre des cellules T2 chargées (figure 15) et par marquage tétramère (figure 16). Pour la tétramérisation, les monomères biotinylés sont incubés 1h, à température ambiante, avec de la streptavidine associée à la phycoerythrin, au ratio moléculaire 4:0,8. Les lymphocytes sont ensuite marqués avec les tétramères (10µg/ml) et un anticorps anti-CD8 (5µg/ml), dans du PBS 0,1% BSA puis analysés par cytométrie en flux.

La production d'IFN γ en réponse à différentes concentrations en peptide est présentée dans la figure 17.

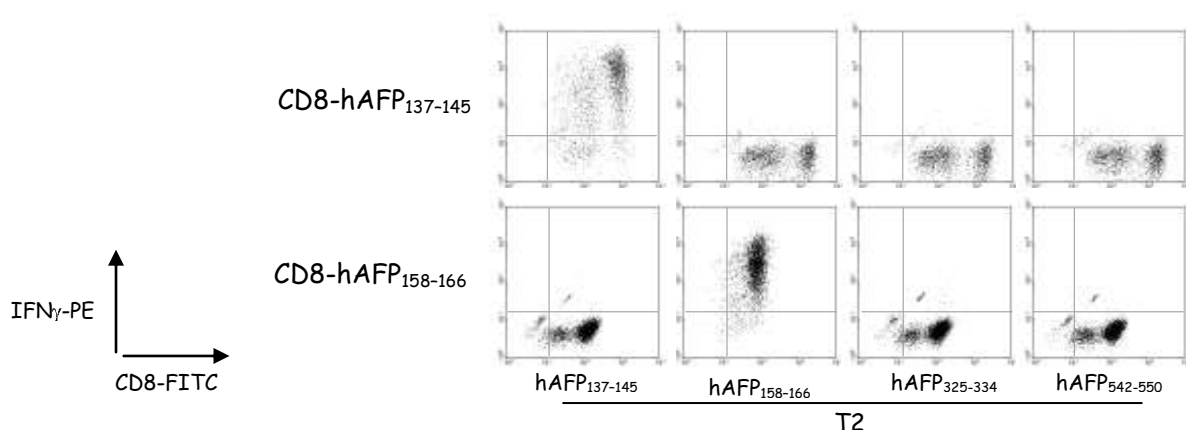


Figure 15 : Analyse de la spécificité des deux clones lymphocytaires, CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆, générés. Les lymphocytes T CD8, sensibilisés par des DC chargées avec les peptides hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et hAFP₁₅₈₋₁₆₆, puis clonés par dilution limite sont testés pour leur spécificité contre des cellules T2 chargées avec les peptides hAFP₁₃₇₋₁₄₅, hAFP₁₅₈₋₁₆₆, hAFP₃₂₅₋₃₃₄, et hAFP₅₄₂₋₅₅₀. La sécrétion d'IFN γ est analysée par marquage intracellulaire par cytométrie en flux.

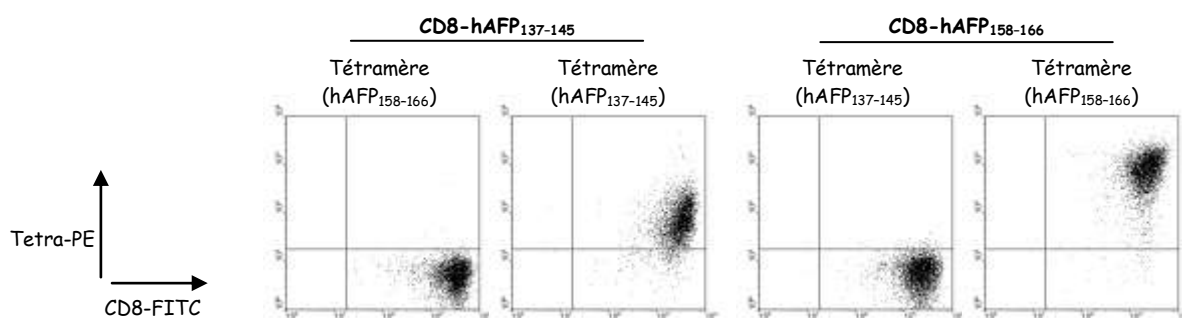


Figure 16 : Marquage tétramère des clones lymphocytaires T CD8 sensibilisés par des DC chargées avec les peptides hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et hAFP₁₅₈₋₁₆₆ puis clonés par dilution limite.

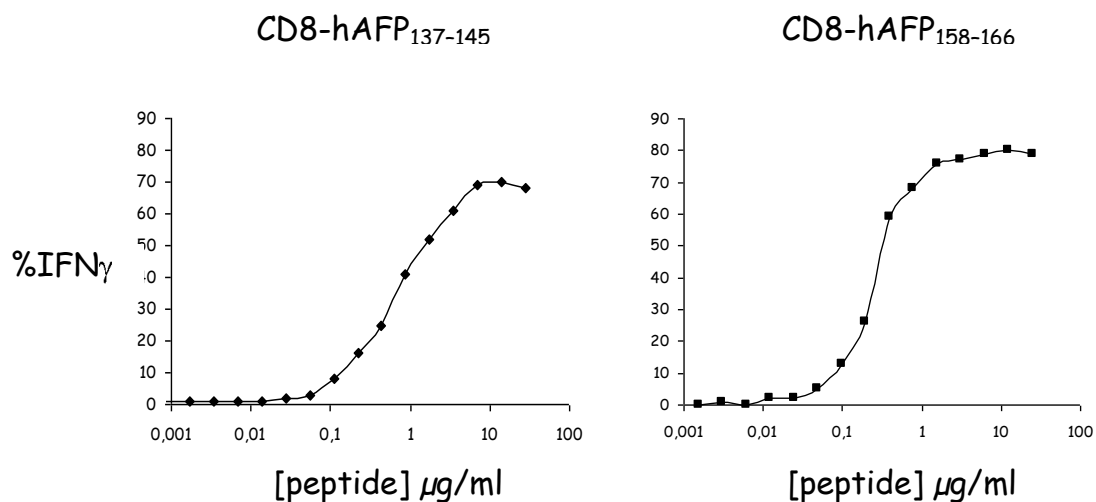


Figure 17 : Production d'IFN_γ par les clones CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆, en réponse à différentes concentrations en peptide. Les cellules T2 sont chargées avec différentes concentrations de peptides et sont cultivées avec les clones T CD8. La sécrétion d'IFN_γ est analysée par marquage intracellulaire par cytométrie en flux.

Nous avons ensuite analysé la production de $TNF\alpha$ et d'IL-2 par les clones lymphocytaires T, CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆ (figure 18). Les clones sont cultivés avec des cellules T2 chargées. Le pourcentage de cellules produisant du $TNF\alpha$ et de l'IL-2 respectivement est de 11% et de 1% avec le clone CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅, il atteint 38% et 6% avec le clone CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆.

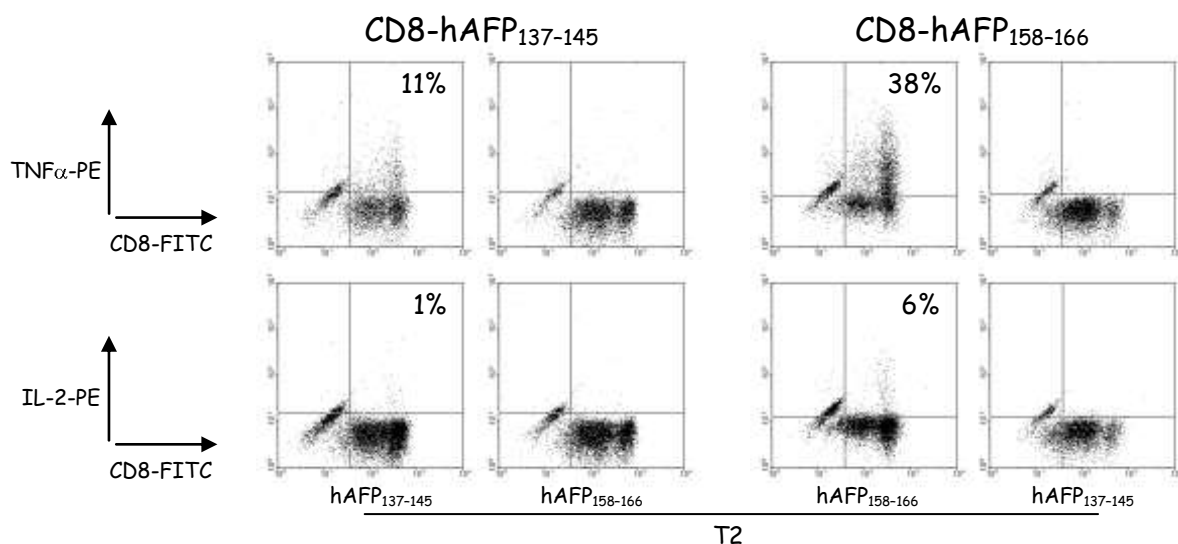


Figure 18 : Analyse de la production de $TNF\alpha$ et d'IL-2 par les clones CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆ en réponse aux cellules T2 chargées. La sécrétion de $TNF\alpha$ et d'IL-2 est analysée par marquage intracellulaire par cytométrie en flux.

Enfin, nous avons analysé la réponse des clones vis à vis de cellules tumorales de CHC exprimant l'AFP. Deux lignées sont utilisées, la lignée HepG2 d'haplotype HLA-A2 et la lignée Hep3B, contrôle, d'haplotype non A2 (figure 19). Les clones CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆ sont cultivés avec les cellules tumorales, à différents ratios (4:1 ; 2:1 ; 1:1). Les cellules tumorales peuvent être traitées au préalable avec de l'IFN γ , 500U/ml 48h, pour augmenter l'expression des molécules du CMH-I et la présentation des antigènes. L'activation des clones est déterminée par la sécrétion d'IFN γ , par cytométrie en flux.

Aucune sécrétion d'IFN γ n'est observée après culture du clone CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ avec les cellules HepG2, et ce, quel que soit le ratio effecteur:cible (figure 19a). Le prétraitement des cellules tumorales avec de l'IFN γ est, par ailleurs, sans effet sur l'activation de ce clone. Avec le clone CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆ par contre, le pourcentage de cellules sécrétrices d'IFN γ atteint respectivement 4,7%, 2,8% et 1,3% aux ratios 4:1, 2:1, et 1:1. Le prétraitement des cellules tumorales améliore la production d'IFN γ qui concerne alors 7%, 5,8% et 2% lymphocytes T CD8 (figure 19b).

III.5. Cytotoxicité des clones CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆

La cytotoxicité des clones, vis-à-vis des cellules T2 chargées ou des cellules tumorales, est déterminée par un test de relarguage du ⁵¹Cr (figure 20). Les cellules cibles chargées avec du ⁵¹Cr sont cultivées avec les clones T CD8. La lyse des cellules cibles est alors déterminée par le relarguage du ⁵¹Cr.

Une lyse spécifique des cellules T2 est observée avec les deux clones aux quatre ratios effecteur:cible testés (figure 20a). L'activité cytotoxique des clones CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆ vis-à-vis des cellules tumorales est, elle, plutôt faible (<10%) (figure 20b). Le prétraitement des cellules tumorales avec de l'IFN γ permet d'augmenter la lyse des cellules tumorales avec respectivement 17% et 26% de lyse pour les clones CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆ au plus fort ratio testé. La lyse la plus importante est obtenue après chargement des cellules tumorales en peptide avec respectivement 43% et 69% de lyse avec les clones CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆.

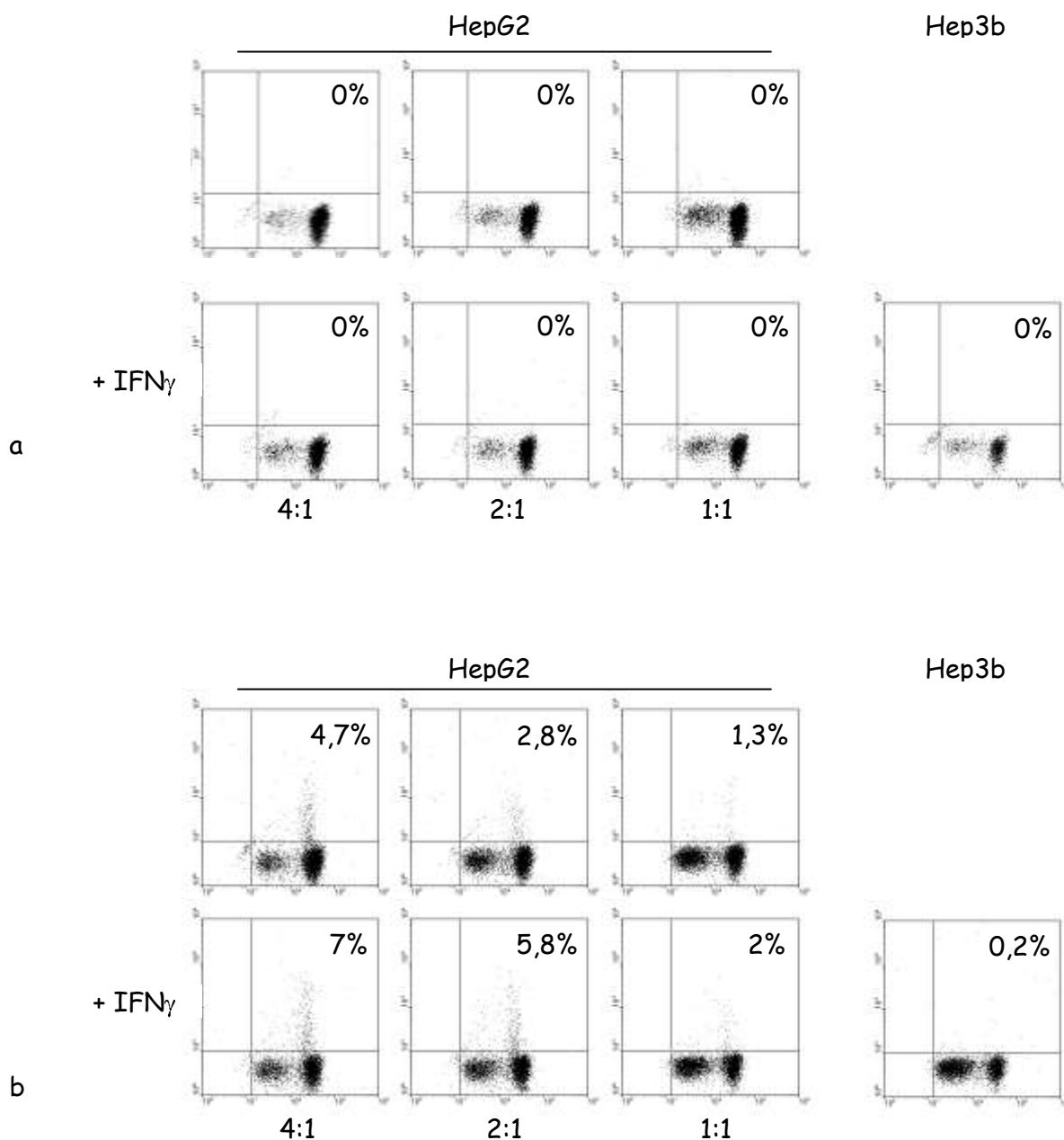


Figure 19 : Analyse de la production d'IFN γ par les clones CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ (a) et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆ (b) en réponse aux cellules tumorales HepG2 et Hep3B. La production d'IFN γ est déterminée par marquage intracellulaire par cytométrie en flux. Les cellules tumorales sont traitées ou non au préalable par de l'IFN γ (500U/ml, 48h). Trois ratios effecteur:cible sont testés (4:1 ; 2:1 ; 1:1).

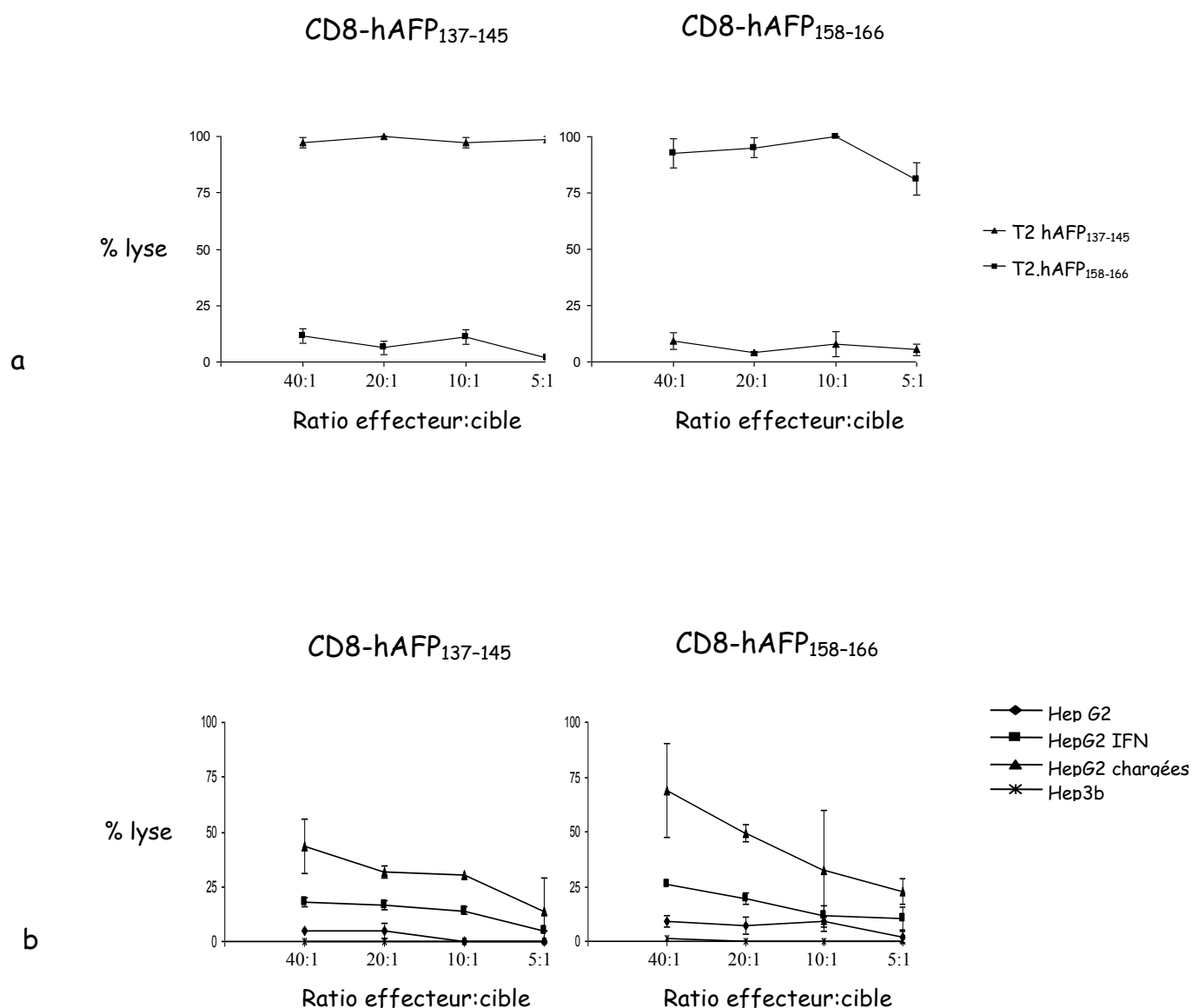


Figure 20 : Analyse de la cytotoxicité des clones CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆ vis-à-vis des cellules T2 chargées (a) et des lignées tumorales HepG2 et Hep3B (b). Les cellules cibles (cellules T2 et cellules tumorales) sont chargées en ⁵¹Cr et cultivées en présence des clones CD8-hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et CD8-hAFP₁₅₈₋₁₆₆. Quatre ratios effecteur:cible sont testés. La lyse cellulaire est déterminée par le relarguage du ⁵¹Cr. Les cellules tumorales sont traitées ou non par de l'IFN γ (500U/ml, 48h) et peuvent être chargées avec les peptides hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et hAFP₁₅₈₋₁₆₆ spécifiques des clones utilisés.

III.6. Conclusion :

Nous décrivons ici la production et la caractérisation de deux clones T CD8 spécifiques des épitopes hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et hAFP₁₅₈₋₁₆₆, présentés dans le contexte HLA-A*0201. Ces deux clones sont capables de reconnaître des lignées de CHC exprimant l'AFP. Le clonage de populations lymphocytaires spécifiques des épitopes CD8-hAFP₃₂₅₋₃₃₄ et CD8-hAFP₅₄₂₋₅₅₀ n'a cependant pas été possible. Des réponses T ont pourtant été décrites avec ces deux épitopes immunodominants (Butterfield *et al.*, 2003a; Liu *et al.*, 2006b). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par les différences concernant les techniques de sensibilisation et d'analyse des populations lymphocytaires, entre nos conditions et celles rapportées dans la littérature.

Les clones générés ont un intérêt pratique immédiat puisqu'ils seront utilisés dans le protocole clinique de préparation des DC, pour en contrôler le chargement. Ils constituent en outre un outil intéressant pour l'étude de l'expression et du processing de l'AFP.

IV. Analyse de l'influence de l'expression de la molécule HO-1 (Heme Oxygenase 1) sur la maturation des DC.

Article: Chauveau C, Remy S*, Royer PJ*, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert FX, Tesson L, Brion R, Beriou G, Gregoire M, Josien R, Cuturi MC, Anegon I. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood*. 2005 106(5):1694-1702.

*contribution équivalente.

En collaboration avec l'équipe du Dr. I. Anegon, (INSERM U643).

Nous analysons l'impact de l'expression de la molécule HO-1 sur la maturation des DC. L'enzyme HO-1 dégrade l'hème en biliverdine, CO et Fe^{2+} . Elle est induite par des signaux inflammatoires ou un stress oxydatif et exerce des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires par l'intermédiaire de ses métabolites. Chez les macrophages, cette enzyme est capable d'inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS (Leblond et Inoue, 1989). Des expériences chez l'animal ont démontré son implication dans la tolérance des greffes (Otterbein *et al.*, 2003).

Nous nous intéressons dans cette étude à l'implication de l'enzyme HO-1 dans la physiologie des DC. Nous montrons d'abord que cette enzyme est exprimée naturellement par les DC immatures et que son expression est inhibée avec la maturation. Nous avons ensuite investigué l'influence de la molécule HO-1 sur la maturation des DC. Pour cela, nous avons utilisé un inducteur, le CoPP (Cobalt Protoporphyrin), et un inhibiteur le SnPP (Tin Protoporphyrin) de cette enzyme. Nos résultats montrent que l'induction de l'HO-1 inhibe la maturation phénotypique des DC, la sécrétion d'IL-12p70 et les capacités allostimulatrices des DC. La sécrétion d'IL-10 est quant à elle maintenue.

Nous démontrons ici, pour la première fois, la capacité de l'enzyme HO-1 à réguler la physiologie des DC.

Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression

Christine Chauveau, Séverine Rémy, Pierre Joseph Royer, Marcelo Hill, Séverine Tanguy-Royer, François-Xavier Hubert, Laurent Tesson, Régis Brion, Gaëlle Beriou, Marc Gregoire, Régis Josien, Maria Cristina Cuturi, and Ignacio Anegón

Heme oxygenase-1 (HO-1) is an intracellular enzyme that degrades heme and inhibits immune responses and inflammation *in vivo*. In most cell types, HO-1 is inducible by inflammatory stimuli and oxidative stress. Here we demonstrate that human monocyte-derived immature dendritic cells (iDCs) and several but not all freshly isolated rat splenic DC subsets and rat bone marrow-derived iDCs, spontaneously express HO-1. HO-1 expression drastically decreases during human and rat DC maturation induced *in vitro*. In

human tissues, iDCs also express HO-1, whereas mature DCs do not. Induction of HO-1 expression with cobalt protoporphyrin (CoPP) in human and rat DCs inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced phenotypic maturation and secretion of proinflammatory cytokines, resulting in the inhibition of alloreactive T-cell proliferation. CoPP-treated DCs, however, retain the ability to produce the anti-inflammatory cytokine interleukin 10 (IL-10). Reactive oxygen species induced by LPS in DCs were inhibited by induction of HO-1. In

conclusion, we identify, for the first time, the capacity of HO-1 to block maturation of DCs and to inhibit proinflammatory and allogeneic immune responses while preserving IL-10 production. This novel immune function for HO-1 may be of interest for the inhibition of immune responses in autoimmune diseases, transplantation, and other conditions involving activation of the immune system. (Blood. 2005;106:1694-1702)

© 2005 by The American Society of Hematology

Introduction

Heme oxygenases (HOs) are the rate-limiting intracellular enzymes that degrade heme to biliverdin, free divalent iron, and CO (for a review, see Otterbein and Choi¹). Three distinct HO enzymes have been identified: HO-1, HO-2, and HO-3.¹ HO-1 is a stress responsive gene whose expression is induced by a variety of stimuli including heme, heavy metals, inflammatory cytokines, and nitric oxide.¹ HO-1 is known for its cytoprotective effect against oxidative injuries and inflammation.¹ Induction of HO-1 expression by pharmacologic activators or gene transfer has had therapeutic effects in a variety of conditions or disorders involving the immune system, including transplantation and inflammatory disorders.²⁻⁸ Biliverdin and its metabolite, bilirubin, are known for their antioxidant⁹ and immunosuppressive effects.¹⁰ HO-1 and CO have been shown to inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced expression of proinflammatory cytokines and to increase LPS-induced expression of interleukin 10 (IL-10) in macrophages.^{11,12} Moreover, IL-10 induces HO-1 expression in macrophages.¹³⁻¹⁵ We previously reported that overexpression of HO-1, obtained with an HO-1-encoding adenovirus in rats having heart transplants, results in long-term allograft survival associated with an inhibition of cellular allogeneic immune responses, which could be mediated by adenoviral transduction of dendritic cells (DCs).⁶

DCs play a central role in the induction of immunity and tolerance (for a review, see Steinman et al¹⁶). In the absence of inflammation, immature DCs (iDCs) located in peripheral tissues specialize in taking up innocuous and cell-associated self antigens.

They continuously capture antigens and migrate to draining lymph nodes where they can induce tolerance.¹⁶ In the presence of danger signals, DCs undergo maturation, a process involving up-regulation of surface major histocompatibility complex (MHC) class II and costimulatory molecules, secretion of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, and the acquired ability to stimulate differentiation of naive T cells into effector cells.

Our working hypothesis was that DCs can express HO-1, which can regulate DC functions. In this study, we demonstrate that human and rat iDCs express HO-1 and that HO-1 expression is down-regulated by maturation stimuli. Our results also demonstrate that induction of HO-1 expression renders DCs refractory to LPS-induced maturation, but preserves IL-10 secretion, suggesting that HO-1 may be used to regulate DC functions.

Materials and methods

Animals

Six- to 10-week-old Lewis.1A and Lewis.1W rats (Centre Janvier, Le Genest Saint-Isles, France) were used.

Cell preparation, culture, and treatments

Rat DCs. Rat splenic OX62⁺ DCs were purified as previously described.¹⁷ Briefly, spleen fragments were digested with collagenase D (Roche,

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unit 643 and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITER), Nantes, France; and INSERM U601, Nantes, France.

Submitted February 4, 2005; accepted April 28, 2005. Prepublished online as Blood First Edition Paper, May 26, 2005; DOI 10.1182/blood-2005-02-0494.

Supported by the Fondation Progreffe, EU grant QLK3-CT-2001-00422 (I.A.) and Agence pour la Recherche contre le Cancer (ARC, nationale; M.G.). S.R. and P.J.R. contributed equally to this work.

The online version of the article contains a data supplement.

Reprints: Ignacio Anegón, INSERM U643, CHRU Nantes, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes, France; e-mail: ianegon@nantes.inserm.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2005 by The American Society of Hematology

Meylan, France). Low-density cells were isolated by centrifugation on a Nycodenz density gradient (Nycomed, Oslo, Norway). Cells were positively selected (>90% purity)¹⁷ using anti-rat OX62-magnetic-activated cell sorting (MACS) microbeads and MiniMACS selection columns (Miltenyi Biotec, Paris, France).

Rat plasmacytoid DCs (pDCs) were purified by spleen digestion in collagenase D, followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Amersham, Les Ulis, France). T-cell and partial B-cell depletion was then performed by incubating cells with the anti-T-cell receptor $\alpha\beta$ (anti-TCR $\alpha\beta$) and $\gamma\delta$ monoclonal antibodies (mAbs) R7.3 and V65 followed by incubation with a mixture of anti-mouse and anti-rat IgG-coated magnetic beads (DynaL Biotec, Oslo, Norway). Rat CD4⁺CD45RB⁺ pDCs (>98% purity) were then sorted using the CD45RB-fluorescein isothiocyanate (FITC) and CD4-phycoerythrin (PE) mAbs (BD Pharmingen, San Diego, CA) with a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Aria cell sorter (BD Biosciences; donated by the Cr  dit Agricole).

Rat bone marrow-derived DCs (BMDCs) were obtained as previously described.¹⁸ Briefly, bone marrow cells were cultured in medium supplemented with supernatant from COS cells transfected with rat IL-4 cDNA or murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) cDNA (final concentration of 4 ng/mL and 1.5 ng/mL of each cytokine, respectively). Cultures were fed with GM-CSF and IL-4 on days 3 and 6. At day 8, adherent immature bone marrow DCs (iBMDCs; <1% T cells, 1% B cells, 1% macrophages) were used. BMDC maturation was induced by a 48-hour treatment with 500 U/mL human tumor necrosis factor α (TNF- α ; BASF/Knoll, Ludwigshafen Germany), 25 μ g/mL polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)), 0.5 μ g/mL LPS (both from Sigma, St Louis, MO), 10 μ M cytosine phosphate guanine (CpG; motif 2006, Sigma-Genosys), or 0.5 μ g/mL CD40L (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) in the presence of 1 μ g/mL enhancer anti-Flag mAb (Sigma). Nonadherent mature DCs were collected for analysis.

Human monocyte-derived DCs. Human iDCs were generated as previously described.¹⁹ Briefly, monocytes were enriched by elutriation (>85% CD14⁺) and cultured 6 days in medium supplemented with IL-4 (40 ng/mL; AbCys, Paris, France), and GM-CSF (500 IU/mL; AbCys). Next, iDCs were harvested and cultured (10^6 cells/mL) in plates coated with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (Sigma) to prevent cells from adhering. Maturation was induced by a 48-hour incubation using 20 ng/mL TNF- α (AbCys), 50 μ g/mL poly(I:C) (Sigma), or 0.5 μ g/mL CD40L (Alexis) in the presence of 1 μ g/mL enhancer anti-Flag mAb (Sigma) or 1 μ g/mL LPS (Sigma).

T cells. Rat lymph node T cells were prepared using nylon wool columns followed by negative selection of cells expressing CD45RA (clone OX33), CD45RB (clone His 24), CD11b/c (clone OX42), and CD161 (clone 3.2.3), with specific mAbs (all from BD Pharmingen), followed by anti-mouse IgG-coated magnetic beads (DynaL Biotec). Purity was routinely 98% or higher.

Treatment of DCs with metalloprotoporphyrins or IL-10 and LPS

Rat or human iDCs were pulsed for 2 hours with 50 μ M cobalt protoporphyrin (CoPP) or tin protoporphyrin (SnPP; Porphyrin Products, Logan, UT), an inducer and an inhibitor of HO-1, respectively.^{20,22} The cells were then washed twice and cultured for 16 hours. Protoporphyrins were protected from light at all times. This same protocol has already been shown to be effective in inducing and inhibiting HO-1 activity.²³ Human iDCs were cultured for 18 hours with 20 ng/mL recombinant human IL-10 (AbCys). DCs treated with metalloprotoporphyrin or IL-10 were then cultured for a further 24 hours with LPS (1 μ g/mL for human DCs [*Escherichia coli* 026:B6; Sigma] and 0.5 μ g/mL for rat DCs [*E. coli* 011:B4; InvivoGen, San Diego, CA]). Supernatants and cells were subsequently harvested for cytokine and phenotypic analysis, respectively. DC viability was analyzed by flow cytometry by staining with TO-PRO-3 iodide (Molecular Probes, Eugene, OR).

Mixed leukocyte reaction

Increasing numbers of treated DCs were cultured in triplicate in round-bottom 96-well plates with 10^5 allogeneic rat T lymphocytes or human peripheral blood lymphocytes (PBLs; <1% CD14⁺ cells purified by elutriation). Proliferation was determined 4 days later by uptake of ³H-thymidine (Amersham, Orsay, France; 0.5 μ Ci/well [0.0185 MBq]) during the last 8 hours of culture.

Immunohistology and confocal image analysis

Human chronically infected tonsils and healthy, normal skin (kindly provided by Dr K. Renaudeau and Dr B. Dreno, CHU de Nantes) were embedded in cutting compound (Tissue-Tek, Elkhart, IN), frozen in isopentane and cryosectioned (5 μ m). Tissue sections and DC cytopins were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Slides were incubated with anti-MHC class II, anti-SIRP-1 (OX41), anti-CD5 (OX 19) (all from the European Collection of Cell Culture, Salisbury, United Kingdom), anti-CD4, anti-CD45RB (both from BD Pharmingen), anti-DC-SIGN (R&D Systems, Minneapolis, MN), or PE-coupled anti-DC-LAMP (Immunotech, Marseille, France) Abs. Slides were next incubated with a biotinylated anti-mouse Ab and a streptavidin-Alexa 568 conjugate (except for anti-DC-LAMP). Tissue sections incubated with anti-DC-SIGN and biotinylated anti-mouse Abs were first incubated with 10% mouse serum. Negative controls included anti-human CD16 mAb (IgG1) and a mouse IgG1 isotype control (BD Pharmingen) for rat cells and human cells/tissues, respectively. Cells or tissues were postfixed with 4% PFA, permeabilized with 0.5% saponin, incubated with a rabbit anti-rat HO-1 or mouse anti-human HO-1 Ab (Stressgen, Victoria, BC, Canada), followed by incubation with secondary FITC-labeled Abs. Cell nuclei were counterstained with TO-PRO-3 iodide (Molecular Probes) and slides were mounted in ProLong AntiFade reagent (Molecular Probes). Slides were analyzed with a Leica confocal microscope (Heidelberg, Germany) and the Leica TCS NT software. Positive cells (a minimum of 400 cells) were counted manually and coexpression of the different cell surface markers was assessed in each of these cells.

The antibilirubin mAb²⁴ (kindly provided by M. Suematsu, Keio University, Tokyo, Japan) was used to analyze HO-1 enzymatic activity in 0.1% Triton-permeabilized DCs. Staining was performed as described.

Cell extracts and Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described.⁵ Briefly, cell protein extracts were boiled, electrophoresed on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and blotted. Membranes were blocked and incubated with either a rabbit anti-rat, a mouse anti-human HO-1 (Stressgen) Ab or a mouse anti- β tubulin mAb (Calbiochem, San Diego, CA). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase-labeled secondary Abs (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and detection performed by enhanced chemoluminescence (Amersham).

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). RNA was treated with DNase and reverse transcribed. Reverse transcription (RT) quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed with a GenAmp 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using SYBR Green PCR core reagents (Applied Biosystems). Rat and human primer sequences were used to target HO-1 and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT).^{6,25} The PCR method and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} quantification method, after normalization to HPRT values, have been previously described.⁶ The transcript accumulation index (TAI) is defined as the fold change in mRNA levels in a given sample (Q) relative to levels in a calibrator (CB)—in this case iDCs. The calibrator is the 1 $\times$ expression of each gene. The TAI is calculated as follows: $TAI = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = (C_{t,Target} - C_{t,HPRT})_Q - (C_{t,Target} - C_{t,HPRT})_{CB}$. Specific amplifications were checked by amplicon melting curves.

Flow cytometry

Rat DCs were stained with the following PE- or FITC-conjugated mAbs: anti-MHC class II, anti-CD80, anti-CD86 (all from BD PharMingen) and anti-CD54 (Serotec, Oxford, United Kingdom). Human DCs were stained with the following PE- or FITC-conjugated mAbs: anti-CD80, anti-CD83, anti-CD86, and anti-HLA-ABC (all from Immunotech). Staining was assessed using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest software (Becton Dickinson, Pont de Claix, France). PE- or FITC-labeled mouse anti-IgG1 Abs (Immunotech) were used as negative controls.

Cytokine measurement

Rat and human DCs were cultured for 2 days with various stimuli. Supernatants were serially diluted, and cytokine concentration assessed in duplicate by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Rat ELISA kits for IL-6, IL-10, TNF- α (OptEIA set; BD PharMingen) and IL-12 p40 (Biosource, Camarillo, CA) as well as human IL-12p70 and IL-10 ELISA kits (BD PharMingen) were used.

Measurement of reactive oxygen species

Rat iBMDs or human iDCs were treated with CoPP or SnPP, cultured for 48 hours, and incubated or not with LPS for 15 minutes. DCs were incubated with 10 mM *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) for 45 minutes prior to incubation with LPS. DCs were then incubated with 5 μ M of the oxidative sensitive dye CM-H2DCFDA (Molecular Probes) for 15 minutes. Samples were then washed and analyzed by cytofluorimetry.

Statistical analysis

Statistical significance was assessed using the nonparametric one-way ANOVA test with a posttest. Differences were considered significant when $P < .05$.

Results

Expression of HO-1 in rat and human iDCs

To investigate the capacity of DCs to express HO-1, we analyzed several previously described rat splenic DC subpopulations^{17,26} and BMDs,¹⁸ as well as human monocyte-derived DCs. Western blot analysis showed that freshly isolated and purified rat splenic OX62⁺ DCs and pDCs (OX62⁻), and rat iBMDs expressed HO-1 (Figure 1A). Splenic B cells were used as negative controls (Figure 1A). Purified rat OX62⁺ DCs include 2 distinct subsets.¹⁷ A subpopulation of CD4⁻CD11b⁺SIRP-1⁻CD5⁻ DCs, which are effective at presenting antigens to CD4⁺ but not to CD8⁺ T cells, produce large amounts of IL-12 but not interferon α (IFN- α), and induce Th1 responses.¹⁷ The second subpopulation of OX62⁺ DCs are CD4⁺CD11b⁺SIRP-1⁺CD5⁺ cells that are effective at presenting antigens to CD4⁺ and CD8⁺ T cells, produce low amounts of IL-12 and IFN- α , and induce Th2/Th0 responses.¹⁷ Intracellular staining with an anti-HO-1 Ab revealed that the CD4⁻ DC population did not express HO-1 and that HO-1 expression was restricted to the CD4⁺ DC population ($32\% \pm 12\%$ expressed HO-1, $n = 3$; Figure 1B). HO-1-expressing cells also expressed MHC class II antigens and were only found among SIRP-1⁺ and CD5⁺ cells (Figure S1; see the Supplemental Materials link at the top of the online article, at the *Blood* website). HO-1 expression was detected in $74\% \pm 12\%$ ($n = 2$) of freshly isolated CD45RB⁺ pDCs (CD4⁺CD11b⁻; Figure 1B). HO-1 expression was also detected in $80\% \pm 20\%$ ($n = 5$) of iBMDs (Figure 1B). All rat iBMDs that expressed HO-1 also expressed bilirubin, which can only derive from heme degradation (Figure 1C). Bilirubin was

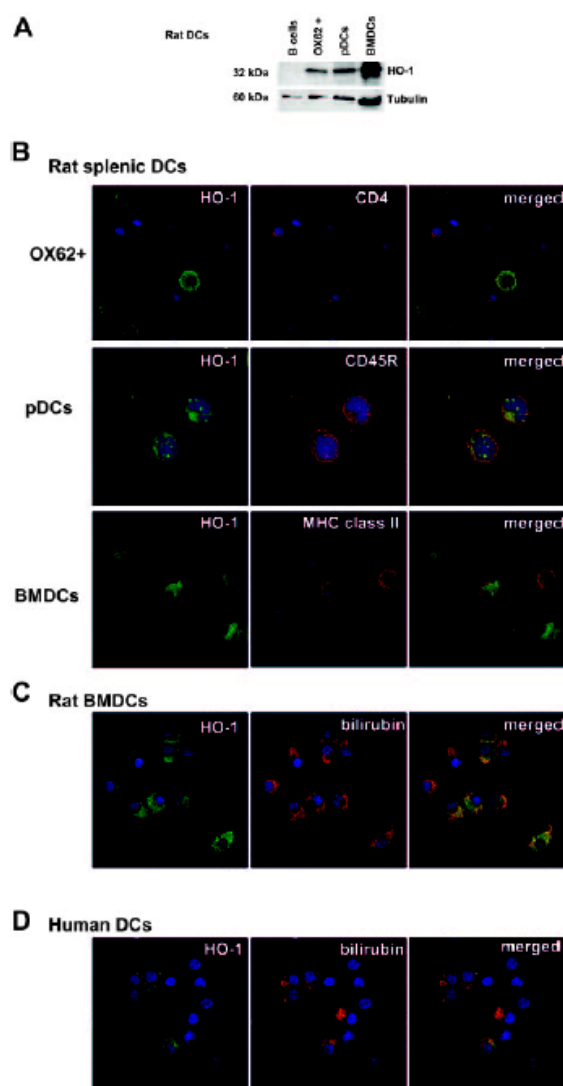


Figure 1. Rat and human DCs express functional HO-1. (A) Western blot analysis of HO-1 expression in rat freshly isolated splenic OX62⁺ DCs, freshly isolated plasmacytoid dendritic cells (pDCs), and BMDs cultured for 8 days was performed using an anti-HO-1 antibody. Purified splenic B cells were used as a negative control. An anti- β tubulin antibody was used as a loading control. (B) Confocal micrographs show rat HO-1⁺ cells (green fluorescence); CD4⁺, CD45RB⁺, or MHC class II⁺ cells (red fluorescence); and merged images with dual labeling. Cell nuclei were counterstained with TO-PRO-3 (blue; objective, $\times 63/1.4$). (C) Rat immature bone marrow-derived DCs express functional HO-1 as shown by the presence of HO-1⁺ cells (green fluorescence) also reactive with an antibilirubin mAb (red fluorescence). Merged images display dual labeling. Cell nuclei were counterstained with TO-PRO-3 (blue; objective, $\times 63/1.4$). (D) Human immature monocyte-derived DCs express functional HO-1 as shown by the presence of HO-1⁺ cells (green fluorescence) also reactive with an antibilirubin mAb (red fluorescence). Merged images display dual labeling. Cell nuclei were counterstained with TO-PRO-3 (blue; objective, $\times 63/1.4$). Similar results were obtained for each DC cell type in 2 to 5 independent experiments.

undetectable in other cells lacking HO-1, such as 293 cells (data not shown).

HO-1 expression was also detected in most immature human monocyte-derived DCs as well as intracellular staining of bilirubin, demonstrating HO activity (Figure 1D).

In conclusion, these data establish that certain but not all rat iDC subsets and human monocyte-derived iDCs express functional HO-1.

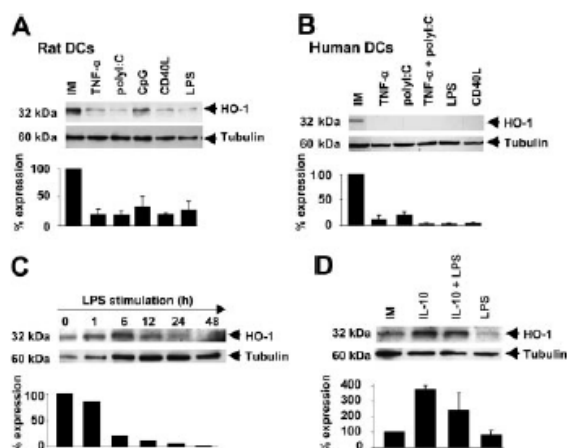


Figure 2. HO-1 expression decreases during rat and human DC maturation. (A) Western blot analysis of HO-1 expression in rat immature (IM) BMDCs and following maturation with TNF- α , poly(I:C), CpG, CD40L, and LPS was carried out using an anti-HO-1 antibody. Anti- β tubulin was used as a loading control. Bar graph shows densitometry analysis $\pm$ SD of HO-1 signals after normalization with β -tubulin from 3 different experiments. (B) Western blot analysis of HO-1 expression in human immature (IM) monocyte-derived DCs and human DCs following maturation induction with TNF- α , poly(I:C), CD40L, and LPS, performed using an anti-HO-1 antibody. Anti- β tubulin was used as a loading control. Bar graph shows densitometry analysis $\pm$ SD of HO-1 signals, after normalization with β -tubulin, from 2 different experiments. (C) Time-course Western blot analysis of HO-1 expression in human immature (IM) monocyte-derived DCs and human DCs following maturation induction with LPS, performed with an anti-HO-1 antibody. Anti- β tubulin was used as a loading control. Bar graph shows densitometry analysis of HO-1 signals after normalization with β -tubulin. (D) Human immature (IM) monocyte-derived DCs were cultured with or without 20 ng/mL of IL-10 for 18 hours and then with or without 1 μ g/mL of LPS for 24 hours. Western blot was performed with an anti-HO-1. Anti- β tubulin was used as a loading control. Histograms show densitometry analysis $\pm$ SD of HO-1 signals after normalization with β tubulin, from 2 different experiments.

HO-1 expression decreases during rat and human DC maturation

HO-1 expression was analyzed after maturation of rat and human iDCs induced by poly(I:C), LPS, or CpG, as well as by stimulation with inflammatory and lymphocyte stimuli, such as TNF- α or CD40L, respectively. DC maturation was confirmed in each experiment by an enhanced expression of MHC II, CD80, and CD86, and by secretion of the cytokines IL-12, IL-6, TNF- α , and IL-10. HO-1 expression by rat BMDCs was significantly decreased compared to control untreated DCs after maturation induced by all of the stimuli tested (mean decrease $\pm$ SD): TNF- α , 83% $\pm$ 1%; poly(I:C), 82% $\pm$ 7.4%; CpG, 69% $\pm$ 2%; CD40L, 81% $\pm$ 2.5%; and LPS, 73% $\pm$ 15% ($n = 3$ for each, $P < .05$; Figure 2A). Inhibition of HO-1 expression on DC maturation was also observed in rat splenic OX62 $^{+}$ DCs and pDCs (data not shown).

As observed in rat BMDCs, HO-1 expression in human monocyte-derived DCs was strongly decreased (mean decrease $\pm$ SD) during DC maturation in response to TNF- α (90% $\pm$ 8.5%), poly(I:C) (81% $\pm$ 7%), TNF- α plus poly(I:C) (98.5% $\pm$ 4%), LPS (98.5% $\pm$ 2%), and CD40L (97% $\pm$ 3%; $n = 2$ for each; Figure 2B).

Kinetic analysis of HO-1 levels after LPS stimulation of human DCs showed levels comparable to those of untreated DCs at 1 hour and drastically reduced levels at 6, 12, 24, and 48 hours of stimulation (20%, 11%, 6%, and 2% versus untreated cells; Figure 2C).

Moreover, expression of HO-1 in rat and human iDCs and its strong decrease following maturation ($> 85\%$, $P < .05$, $n = 3$)

was confirmed by measuring HO-1 mRNA by quantitative real-time RT-PCR (Figure S2).

These data demonstrate that HO-1 expression in rat and human DCs is inhibited at the transcriptional or mRNA (or both) levels by Toll-like receptor (TLR), inflammatory, and lymphocyte stimuli.

HO-1 expression is increased by IL-10

Because IL-10 is potent at maintaining DCs in an immature state,^{16,27} we analyzed whether HO-1 expression could be increased by IL-10. As compared to LPS-treated DCs or untreated iDCs (100%; $n = 2$), pretreatment with IL-10 increased HO-1 expression levels (mean $\pm$ SD) in iDCs (378% $\pm$ 23%) and in IL-10 plus LPS-treated DCs (240% $\pm$ 113%; Figure 2D). The inhibitory effect of IL-10 on LPS-induced DC phenotypic maturation was confirmed by FACS (Figure S3).

These data demonstrate that inhibition of DC maturation by IL-10 is associated with an increase in HO-1 expression.

HO-1 is expressed by immature DC-SIGN $^{+}$ but not by mature DC-LAMP $^{+}$ DCs in human tissues

We next investigated whether this dichotomy in HO-1 expression between iDCs and mature DCs also exists *in vivo* using chronically infected tonsils and healthy skin. Two specific DC markers were used to identify DCs in human tissue sections: DC-SIGN, a C-type lectin expressed in interstitial iDCs but not Langerhan cells,^{28,29} and DC-LAMP, a marker of mature DCs.³⁰ As previously described,²⁸⁻³⁰ human skin displayed many DC-SIGN $^{+}$ cells in the dermis but not in the epidermis (Figure 3) and DC-LAMP $^{+}$ cells were absent (data not shown). Many HO-1 $^{+}$ cells were observed in the dermis and an almost complete overlap was observed between HO-1 $^{+}$ and DC-SIGN $^{+}$ cells (Figure 3).

In contrast, and as previously described for human chronically infected tonsils,²⁸⁻³⁰ DC-LAMP was expressed by numerous cells (Figure 3), whereas DC-SIGN was nearly absent (data not shown). Only a few weakly HO-1 $^{+}$ cells were found in this tissue (Figure

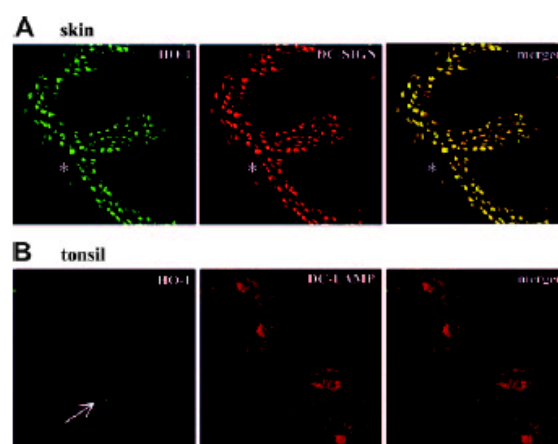


Figure 3. Detection of HO-1 $^{+}$ and HO-1 $^{-}$ DCs in human tissues. (A) Confocal micrographs of cryostat sections from human skin show HO-1 $^{+}$ cells (green fluorescence), DC-SIGN $^{+}$ cells (red fluorescence), and merged images with dual labeling. Dermal iDCs show complete overlap of HO-1 and DC-SIGN expression. The epidermis (*) shows very low or absent expression of both HO-1 and DC-SIGN. (objective, $\times 40/1.0$). (B) Confocal micrographs of cryostat sections from a chronically infected human tonsil show few weakly HO-1 $^{+}$ cells (green fluorescence, arrow), DC-LAMP $^{+}$ cells (red fluorescence), and merged images with dual labeling. Tonsil mature DCs expressing DC-LAMP do not express HO-1 (objective, $\times 63/1.4$). Results are representative of 3 different skin and tonsils analyzed in the same way.

3). Double staining showed that DC-LAMP⁺ cells were HO-1⁺ (Figure 3).

An irrelevant isotype-matched mAb did not show any reactivity with either tissue (Figure S4).

Thus, analysis of human tissues shows that iDCs express HO-1 in vivo, whereas mature DCs do not.

HO-1 induction renders rat and human DCs refractory to LPS-induced maturation

Next, we investigated whether HO-1 activity during maturation could play a functional role in the regulation of DC responses to pathogens.

To examine the effect of HO-1 activity on LPS-induced DC maturation, we pulsed-treated human iDCs and rat iBMDs with CoPP or SnPP. CoPP is a strong inducer of *HO-1* gene transcription,²⁰⁻²² whereas SnPP irreversibly binds and inactivates HO-1 enzymatic activity.²²

CoPP and SnPP 48-hour pulse treatments were not toxic to DCs, as determined by flow cytometric analysis of physical parameters and TO-PRO-3 staining (Figure S5). Porphyrin-pulsed DCs were cultured for 16 hours in the absence or presence of LPS. Expression of HO-1 in human (Figure 4A) and rat (data not shown) DCs was determined by Western blot analysis 24 hours later. HO-1 expression was strongly increased following treatment with CoPP and treatment with LPS partially abrogated this increase. SnPP slightly increased HO-1 levels, likely through a feedback mechanism due to inhibition of HO-1 activity, as previously described in other cells.³¹

Analysis of mRNA levels by quantitative RT-PCR showed that CoPP alone induced a 70- to 124-fold increase in HO-1 transcript levels versus those in iDCs, and a 29- to 69-fold increase when associated with LPS in rat DCs. A strong increase in HO-1 mRNA was also detected in CoPP-treated human DCs. Transcript levels increased 18- to 99-fold with CoPP alone and 29- to 67-fold when associated with LPS.

CoPP-pulsed human and rat DCs were refractory to LPS-induced maturation, as assessed by phenotypic analysis. A statistically significant inhibition of cell surface marker expression was observed in CoPP-pretreated rat and human iDCs compared to untreated and SnPP-pretreated cells incubated with LPS (Figure 4B-C; Table S1).

SnPP inhibition of HO-1 activity had no effect on DC maturation, suggesting that inhibition of HO-1 activity does not act as an inducer of DC maturation in the absence of specific DC maturation stimuli. The absence of an effect of SnPP on LPS-induced DC maturation is probably due to the inhibition of HO-1 expression on LPS stimulation.

Thus, induction of HO-1 in DCs resulted in a blockade of DC phenotypic maturation induced by LPS.

HO-1 induction inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and maintains IL-10 production by DCs exposed to an inflammatory signal

DC maturation results in secretion of diverse cytokines that mediate many of the functional effects of DCs on other cell

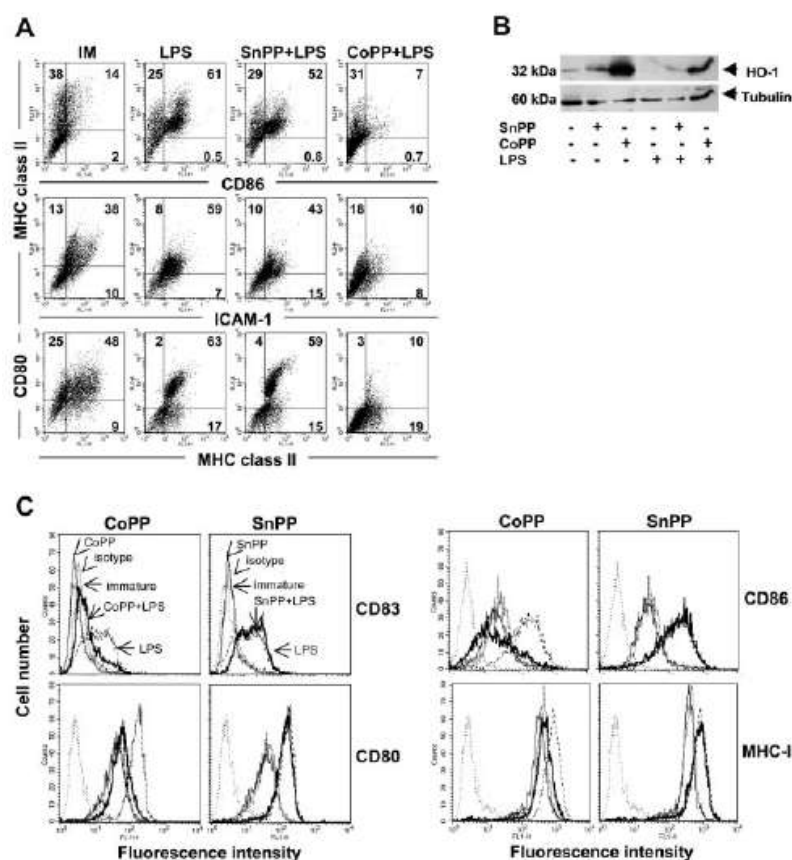


Figure 4. Induction of HO-1 renders DCs refractory to LPS-induced phenotypic maturation. (A) Western blot analysis of HO-1 levels in human iDCs treated or not with SnPP or CoPP for 2 hours, cultured for 16 hours, and then for a further 24 hours in the presence or absence of LPS. Anti- β tubulin was used as a loading control. (B) Flow cytometry analysis showing the phenotype of immature (IM) rat BMDs treated or not with SnPP or CoPP for 2 hours, cultured for 16 hours, and then for a further 24 hours with or without LPS for 24 hours. Expression of MHC class II, CD80, CD86, and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) was assessed. Similar results were obtained in 5 independent experiments. Numbers within graph quadrants are percentage of positive cells. (C) Flow cytometry analysis showing the phenotype of immature human DCs treated or not with SnPP or CoPP for 2 hours, cultured for 16 hours, and then stimulated or not with LPS for 24 hours. Thin gray line indicates untreated immature DCs; dashed line, untreated DCs stimulated with LPS; thin black line, treatment with CoPP or SnPP; bold line, treatment with CoPP or SnPP and stimulated with LPS; and dotted line, isotype. Expression of CD83, CD80, CD86, and MHC class I was assessed. Similar results were obtained in 3 independent experiments.

populations. Production of the LPS-induced proinflammatory cytokines IL-12 p40, IL-6, and TNF- α significantly decreased when rat DCs were pulsed with the HO-1 inducer CoPP, whereas treatment with SnPP had no effect (Figure 5A). In contrast, HO-1 induction did not inhibit secretion of the LPS-induced anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 5A).

Similarly to rat DCs, a strong decrease in LPS-induced IL-12 p70 production associated with a preservation of IL-10 was also observed following CoPP treatment of human DCs (Figure 5B).

Treatment of immature rat and human DCs with SnPP or CoPP alone (no LPS) did not induce iDCs to secrete cytokines (Figure 5A-B).

These results show that HO-1 induction modulates LPS-induced DC maturation by decreasing proinflammatory cytokines production and preserving IL-10 secretion.

HO-1 induction decreases the capacity of rat and human DCs to stimulate MLRs

To further assess the effect of HO-1 on DC function, we determined whether HO-1 induction modified the T-cell allostimulatory capacity of rat and human DCs. Rat BMDCs that had been treated with

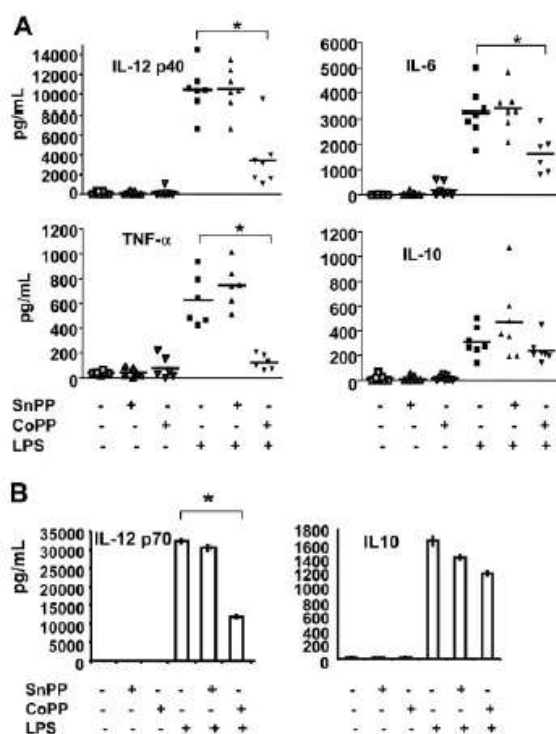


Figure 5. Induction of HO-1 affects cytokine expression in rat and human DCs. (A) ELISA was used to assess the production of IL-12 p40, IL-6, TNF- α , and IL-10 in the supernatants of rat BMDCs treated or not with SnPP or CoPP for 2 hours, cultured for 16 hours, and then for a further 24 hours in the presence or absence of LPS. Induction of HO-1 inhibited expression of IL-12 p40, TNF- α , and IL-6 in DCs but did not alter IL-10 secretion. Horizontal bars represent the mean of individual values. Statistical significance compared to LPS-treated cells is indicated as $^*P < .001$. (B) ELISA was used to assess the production of IL-12 p70 and IL-10 in the supernatants of human DCs treated or not with SnPP or CoPP for 2 hours, cultured for 16 hours, and then for a further 24 hours in the presence or absence of LPS. Induction of HO-1 inhibited expression of IL-12 p70 but did not alter IL-10 secretion. Data presented are mean $\pm$ SD of triplicate analysis of one experiment and are representative of 3 independent experiments. Statistical significance compared to LPS-treated cells is indicated as $^*P < .01$.

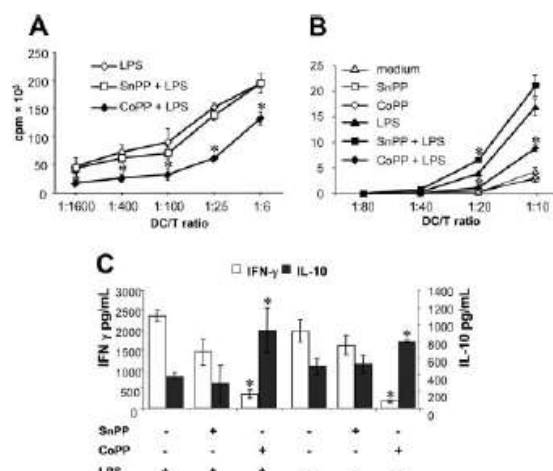


Figure 6. Induction of HO-1 inhibits the allogeneic stimulatory capacity of rat and human DCs. (A) Rat BMDCs and (B) human DCs were treated or not with SnPP or CoPP for 2 hours, cultured for 16 hours, and then for a further 24 hours in presence or absence of LPS. Thereafter, DCs were cultured with allogeneic T cells at different ratios for 4 days and proliferating T cells were labeled with 3 H-thymidine for 8 hours before being harvested and counted. Results are shown as means $\pm$ SD of triplicate values after subtraction of spontaneous 3 H-thymidine. Statistical significance compared with LPS-treated DCs is indicated as $^*P < .05$. Similar results were obtained in 6 independent experiments for rat DCs and in 2 for human DCs. cpm indicates counts per minute. (C) In parallel, supernatants were collected after 48 hours from rat MLRs and analyzed by ELISA to determine levels of IFN- γ and IL-10. Data presented are mean $\pm$ SD of triplicate analysis of one experiment and are representative of 5 independent experiments. Statistical significance compared with LPS-treated DCs is indicated as $^*P < .01$.

LPS after induction of HO-1 by CoPP were poor stimulators in mixed lymphocyte reactions (MLRs) compared with control LPS-treated DCs, whereas HO-1 inhibition by SnPP treatment had no effect on rat allogeneic T-cell proliferation (Figure 6A).

Human DCs pretreated with CoPP and then with LPS were also poor stimulators in MLRs compared to LPS-treated DCs, and SnPP-pretreated DCs only increased proliferation at one T/DC (Figure 6B). MLR proliferation of rat (data not shown) or human (Figure 6B) DCs not matured with LPS was unmodified by pretreatment with SnPP or CoPP.

We also investigated cytokine production in supernatants from rat MLRs (Figure 6C). When DCs were treated with CoPP, IFN- γ production was significantly reduced and IL-10 significantly increased compared with control LPS-treated DCs. When DCs were treated with SnPP, IFN- γ and IL-10 production were unmodified compared to control DCs (Figure 6C). In MLRs using DCs not exposed to LPS but pretreated with CoPP, a reduction in IFN- γ production was observed, whereas IL-10 was increased and SnPP, on the other hand, had no effect (Figure 6C).

These results demonstrate that HO-1 induction not only inhibits the allostimulatory capacity of DCs, but also changes the cytokines produced during DC/T-cell interactions.

HO-1 induction decreases ROS levels in DCs

Increased levels of reactive oxygen species (ROS) have been shown to be involved in activation of DCs by different stimuli, and antioxidants inhibit DC activation.³² To assess potential intracellular mechanisms for HO-1 inhibition of DC maturation, we analyzed ROS levels in DCs pretreated with CoPP or SnPP, and matured with LPS, a stimulus known to increase ROS in DCs³² (Figure 7). ROS levels were increased following treatment with LPS. SnPP

decrease T-cell proliferation and production of IFN- γ in MLRs, whereas expression of IL-10 was increased. IL-10 has been shown to block MLRs and is considered as the main cytokine for the induction and maintenance of anergy or tolerance.^{40,48,49} Moreover, IL-10 expression in MLRs is linked to the generation of Tr1 cells.⁵⁰ Further work is in progress to determine whether IL-10 acts downstream of HO-1, mediating suppression of DC maturation and possibly induction of tolerance. Alternatively, the inhibition of MLRs could also be related to the heme degradation end product CO, because CO was shown to inhibit T-lymphocyte proliferation.⁵¹ These results indicate that HO-1 is not only a marker of iDCs but could also affect DC functions by inhibiting Th1 responses and by inducing T-cell anergy. It is tempting to hypothesize that the beneficial effect of HO-1 overexpression in autoimmune disease,⁵² allotransplantation,^{6,53} and graft-versus-host disease⁵⁴ (GVHD) may be associated with the ability of HO-1 to block DC maturation or inhibit Th1 responses and induce T-cell anergy.

In agreement with the known antioxidant properties of HO-1 (for a review, see Otterbein and Choi¹), induction of HO-1 resulted in decreased ROS levels following LPS stimulation of DCs. Because ROS levels are inversely correlated to the degree of DC maturation⁵⁵ and because antioxidants block DC maturation,³² the decrease in ROS levels by HO-1 could be involved in the inhibition of DC maturation. There are multiple downstream targets of ROS

that will need to be analyzed to explain the inhibitory action of HO-1 on DC maturation. Although SnPP further increased ROS levels in LPS-treated cells, it is possible that the DC maturation process is fully activated by the levels reached with LPS alone.

In conclusion, we demonstrate, for the first time, that human and rat iDCs express HO-1 and that HO-1 expression is strongly down-regulated during DC maturation, thus suggesting a potential role for HO-1 in DC biology. We present evidence that induction of HO-1 expression not only suppressed the expression of cell surface molecules and proinflammatory cytokines but, importantly, maintained the expression of IL-10. This implies that HO-1 could selectively induce tolerogenic DCs.

The physiologic relevance of the present *in vitro* findings is strongly supported by the fact that mice lacking functional HO-1⁵⁶ and one human who had HO-1 deficiency^{57,58} have been associated with an inflammatory phenotype, and by results showing that overexpression of HO-1 inhibits allogeneic immune responses.⁵⁻⁷

Acknowledgments

We are grateful to all of the researchers who kindly contributed with reagents or tissues.

References

- Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L1029-1037.
- Willis D, Moore A, Frederick R, Willoughby D. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med*. 1996;2:87-90.
- Hancock WW, Buelow R, Sayegh MH, Turka LA. Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med*. 1998;4:1392-1396.
- Soares MP, Lin Y, Anrather J, et al. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med*. 1998;4:1073-1077.
- Chauveau C, Bouchet D, Roussel J, et al. Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection. *Am J Transplant*. 2002;2:581-592.
- Braudeau C, Bouchet D, Tesson L, et al. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther*. 2004;11:701-710.
- Araujo JA, Meng L, Tward AD, et al. Systemic rather than local heme oxygenase-1 overexpression improves cardiac allograft outcomes in a new transgenic mouse. *J Immunol*. 2003;171:1572-1580.
- Abraham NG. Therapeutic applications of human heme oxygenase gene transfer and gene therapy. *Curr Pharm Des*. 2003;9:2513-2524.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987;235:1043-1046.
- Yamashita K, McDaid J, Ollinger R, et al. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J*. 2004;18:765-767.
- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*. 2000;6:422-428.
- Inoue S, Suzuki M, Nagashima Y, et al. Transfer of heme oxygenase 1 cDNA by a replication-deficient adenovirus enhances interleukin 10 production from alveolar macrophages that attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Hum Gene Ther*. 2001;12:967-979.
- Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med*. 2002;8:240-246.
- Ricchetti GA, Williams LM, Foxwell BM. Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositide-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*. 2004;76:719-726.
- Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis. Antiinflammatory monocyte-macrophage responses *in vitro*, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res*. 2003;94:119-126.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.
- Voisine C, Hubert FX, Trinite B, Heslan M, Josien R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol*. 2002;169:2284-2291.
- Peche H, Trinite B, Martinet B, Cuturi MC. Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from rat bone marrow progenitors. *Am J Transplant*. 2005;5:225-267.
- Spisek R, Bretaudeau L, Barbioux I, Mella K, Gregoire M. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother*. 2001;50:417-427.
- Drummond GS, Kappas A. Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:6466-6470.
- Smith A, Alam J, Esciba PV, Morgan WT. Regulation of heme oxygenase and metallothionein gene expression by the heme analogs, cobalt-, and tin-protoporphyrin. *J Biol Chem*. 1993;268:7365-7371.
- Kappas A, Drummond GS. Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins. *J Clin Invest*. 1986;77:335-339.
- Taille C, El-Benna J, Lanone S, et al. Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *J Biol Chem*. 2004;279:28681-28688.
- Shimizu S, Izumi Y, Yamazaki M, Shimizu K, Yamaguchi T, Nakajima H. Anti-bilirubin monoclonal antibody; I: preparation and properties of monoclonal antibodies to covalently coupled bilirubin-albumin. *Biochim Biophys Acta*. 1988;967:255-260.
- Braudeau C, Bouchet D, Toquet C, et al. Generation of heme oxygenase-1-transgenic rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228:466-471.
- Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan M, Josien R. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II⁺ CD4⁺CD11b⁺OX40⁺ and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol*. 2004;172:7485-7494.
- Nolan KF, Strong V, Soler D, et al. IL-10-conditioned dendritic cells, decommissioned for recruitment of adaptive immunity, elicit innate inflammatory gene products in response to danger signals. *J Immunol*. 2004;172:2201-2209.
- Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, et al. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol*. 2000;1:353-357.
- Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*. 2002;168:2118-2126.
- de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity*. 1998;9:325-336.
- Sardana MK, Kappas A. Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potentially inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:2464-2468.

32. Verhasselt V, Vanden Berghe W, Vanderheyde N, Willems F, Haegeman G, Goldman M. N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF- κ B inhibition. *J Immunol*. 1999;162:2569-2574.
33. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:151-161.
34. Kim HP, Wang X, Galbati F, Ryter SW, Choi AM. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J*. 2004;18:1080-1089.
35. Huang XL, Ling YL, Ling YQ, Zhou JL, Liu Y, Wang QH. Heme oxygenase-1 in cholecystokinin-octapeptide attenuated injury of pulmonary artery smooth muscle cells induced by lipopolysaccharide and its signal transduction mechanism. *World J Gastroenterol*. 2004;10:1789-1794.
36. Tsukiji T, Takahashi T, Mizobuchi S, et al. Gene expression of heme oxygenase-1 during glial activation by lipopolysaccharide. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2000;107:187-196.
37. Camhi SL, Alam J, Wiegand GW, Chin BY, Choi AM. Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18:226-234.
38. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194:863-869.
39. Piemonti L, Monti P, Allavena P, et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol*. 1999;162:6473-6481.
40. Steinbrink K, Wolff M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*. 1997;159:4772-4780.
41. Damidov A, Taylor JR, Grammer SF, Streilein JW. Comparison of effects of transforming growth factor-beta and cyclosporin A on antigen-presenting cells of blood and epidermis. *J Invest Dermatol*. 1991;96:401-407.
42. Penna G, Adorini L. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*. 2000;164:2405-2411.
43. Banchereau J, Paczesny S, Blanco P, et al. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;987:180-187.
44. Van Parijs L, Perez VL, Bluckians A, Maki RG, London CA, Abbas AK. Role of interleukin 12 and costimulators in T cell anergy in vivo. *J Exp Med*. 1997;186:1119-1128.
45. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-252.
46. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:233-258.
47. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity*. 1998;8:89-95.
48. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ cells. *J Exp Med*. 1996;184:19-29.
49. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*. 1998;102:98-106.
50. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Treg cells. *Blood*. 2005;105:1162-1169.
51. Song R, Mahidhara RS, Zhou Z, et al. Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol*. 2004;172:1220-1226.
52. DeVry CG, Valdez M, Gao L, et al. RDP58, a novel immunomodulatory peptide, ameliorates clinical signs of disease in the Lewis rat model of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2004;152:33-43.
53. Woo J, Iyer S, Cornejo MC, et al. Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32). *Transpl Immunol*. 1998;6:84-93.
54. Woo J, Iyer S, Mori N, Buelow R. Alleviation of graft-versus-host disease after conditioning with cobalt-protoporphyrin, an inducer of heme oxygenase-1. *Transplantation*. 2000;69:623-633.
55. Matsue H, Edelbaum D, Shalhevet D, et al. Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J Immunol*. 2003;171:3010-3018.
56. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:10925-10930.
57. Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S, Nakanishi I. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol*. 2002;33:125-130.
58. Yachie A, Niida Y, Wada T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*. 1999;103:129-135.

DISCUSSION-PERSPECTIVES

Le travail présenté ici a contribué à la mise en place de protocoles de production de DC pour un usage clinique. De nombreux cancers restent réfractaires aux traitements conventionnels, ce qui rend nécessaire le développement de nouvelles approches thérapeutiques. La pertinence de l'immunothérapie par DC a été largement démontrée *in vitro* et dans différents modèles animaux. Dès lors, la vaccination anti-tumorale par DC est testée chez l'homme. Le seuil de 1000 patients traités est franchi en 2003. Plusieurs auteurs dressent un premier bilan de ces vaccinations (Banchereau et Palucka, 2005; Figdor *et al.*, 2004; Nestle *et al.*, 2005; Ridgway, 2003; Schuler *et al.*, 2003).

Malgré l'induction de réponses immunologiques, l'efficacité clinique de la vaccination reste décevante et met en évidence la nécessité d'améliorer la méthodologie d'obtention *ex vivo* des DC à des fins de vaccination. En particulier, la standardisation des protocoles de production apparaît aujourd'hui comme une priorité. Les modes de préparation des DC, très différents d'un laboratoire à l'autre, compliquent la comparaison des résultats. Certains paramètres sont difficilement standardisables puisqu'ils sont inhérents à la stratégie choisie par chaque équipe. C'est le cas par exemple pour le choix des précurseurs, des méthodes de chargement ou des agents de maturation. Par contre, la variabilité peut aussi provenir de l'utilisation de réactifs ou de produits thérapeutiques annexes, qui peuvent eux faire l'objet de standardisation. Dans un premier temps, nous avons donc établi des conditions de culture standardisées, favorables à l'obtention de DC pour une utilisation clinique (Royer *et al.*, 2006). Ce mode de production est à la base de deux essais cliniques concernant la LAM (figure 21) et le CHC (figure 22).

L'essai "LAM" consiste en la vaccination de patients en deuxième rémission complète, avec des DC dérivées de monocytes, chargées en blastes leucémiques apoptotiques. Les DC sont préparées à partir de monocytes prélevés chez des patients en deuxième rémission. L'impact de la maladie et du traitement chimiothérapeutique sur les capacités de différenciation des monocytes doit donc être considéré. Nous avons ainsi investigué la production de DC chez des patients atteints de LAM après chimiothérapie. Nous avons pu définir une fenêtre, de 1 à 2 mois après la dernière cure de chimiothérapie, favorable à la production de DC (article en préparation). Cette étude nous permet de définir les modalités de prélèvements des patients pour l'immunothérapie anti-tumorale.

La présence de fortes proportions de Treg a été rapportée dans l'environnement tumoral ou le sang périphérique de patients atteints de différents types de cancer (Zou, 2006).

Ces populations régulatrices participent à la suppression de la réponse immune et sont responsables, en partie du moins, de la faible incidence de réponses anti-tumorales après traitement par immunothérapie. Le traitement par chimiothérapie (fludarabine), de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, peut induire une réduction de la fréquence et une suppression de la fonctionnalité des Treg (Beyer *et al.*, 2005). Dans le cadre de la LAM, l'augmentation de la fréquence des Treg a été rapportée récemment (Wang *et al.*, 2005). Nous souhaitons donc déterminer l'impact de la chimiothérapie, sur les paramètres quantitatifs et qualitatifs des populations de Treg, chez des patients atteints de LAM. Ce travail actuellement en cours, est mené en collaboration avec l'UPRES EA 1257 de Rennes.

Les clones T CD8, hAFP₁₃₇₋₁₄₅ et hAFP₁₅₈₋₁₆₆, permettront de contrôler le chargement des DC générées pour l'essai clinique (Étude de phase I/II d'immunothérapie des carcinomes hépatocellulaires par induction d'une réponse anti alpha fœtoprotéine). Ces clones sont aussi un outil intéressant pour l'étude de l'expression de l'AFP par les cellules tumorales et pour l'analyse du processing de cet antigène. La production de populations lymphocytaires spécifiques des deux épitopes restants, CD8-hAFP₃₂₅₋₃₃₄ et CD8-hAFP₅₄₂₋₅₅₀, est en cours actuellement au sein de l'UMR_S 649 à Nantes.

Enfin, nous avons montré l'implication de l'enzyme HO-1 dans la physiologie des DC. L'expression de cette enzyme diminue au cours de la maturation. Son induction est, quant à elle, capable d'inhiber la maturation des DC (Chauveau *et al.*, 2005). Des études récentes suggèrent une interrelation entre l'HO-1 et l'IL-10. En effet, l'IL-10 peut exercer ses effets *via* l'HO-1 (Lee et Chau, 2002; Otterbein *et al.*, 2003). Réciproquement, l'expression d'HO-1 induit la production d'IL-10 (Drechsler *et al.*, 2006; Otterbein *et al.*, 2000). Dans notre étude, nous montrons que l'IL-10 est capable d'induire l'HO-1 tandis que l'induction d'HO-1 se traduit par une inhibition de la sécrétion de l'IL-12p70 et un maintien de la production d'IL-10. Nous travaillons actuellement à déterminer l'organisation de la relation IL-10/HO-1 chez les DC.

Un nombre croissant d'étude montre l'implication de l'enzyme HO-1 dans la résistance tumorale. Cette enzyme peut être surexprimée par exemple dans les cancers du rein (Goodman *et al.*, 1997) ou de la prostate (Maines et Abrahamsson, 1996). Les propriétés anti-apoptotiques de l'HO-1 favorisent alors la croissance tumorale et la résistance des cellules cancéreuses aux traitements chimio ou radiothérapeutiques. En outre, l'HO-1 serait impliquée

dans les phénomènes d'angiogénèse, assurant la vascularisation de la tumeur (Fang *et al.*, 2004). L'expression de l'HO-1 par les macrophages à proximité des tumeurs peut être corrélée avec l'angiogénèse (Nishie *et al.*, 1999). Par contre, il n'existe aucune donnée concernant l'expression de l'HO-1 par les DC présentes au niveau des sites tumoraux. Cette perspective, qui pourrait représenter un nouveau mécanisme d'échappement tumoral, mériterait donc d'être investiguée.

Si les résultats cliniques des premiers essais de vaccination par DC ont été décevants, des points positifs peuvent être néanmoins relevés. L'induction de réponses immunes est observée chez plus de la moitié des patients traités. Les réponses objectives ne concernent que 10% des patients, mais ce chiffre reste supérieur aux autres stratégies de vaccination (Rosenberg *et al.*, 2004).

Objectivement, les applications de la vaccination par DC semble être l'élimination des cellules tumorales résiduelles plutôt que l'élimination d'une tumeur établie. Les propriétés immunomodulatrices des tumeurs sont connues aujourd'hui. Elle motivent la combinaison de la vaccination avec les thérapies conventionnelles (chimio ou la radiothérapie) ou avec des thérapies plus novatrices (élimination de Treg, blocage de la molécule CTLA-4). En outre, d'autres opportunités restent à explorer comme l'activation des DC *in vivo* ou l'injection de DC capables d'activer diverses populations leucocytaires (lymphocytes, NK). Les connaissances concernant les DC ont aussi beaucoup évolué depuis les premières vaccinations. La production de ces cellules, selon des conditions standardisées, de grade clinique peut se révéler très complexe. Elle nécessite aujourd'hui un important travail de transfert des protocoles établis en recherche, aux contraintes de production pour un usage thérapeutique.

Dernièrement, des résultats tout à fait remarquables ont été rapportés dans un essai de vaccination par DC chez des patients atteints de mélanome (Dillman *et al.*, 2006). Sur 21 patients vaccinés, 18 sont encore en vie sans progression tumorale, plus de 2 ans après la dernière injection. Cet essai est encore en cours et très peu d'informations sont données sur le protocole de vaccination. Il faut donc en attendre les résultats définitifs. Néanmoins, il justifie l'intérêt porté aux DC et préfigure peut-être l'immunothérapie anti-tumorale à venir.

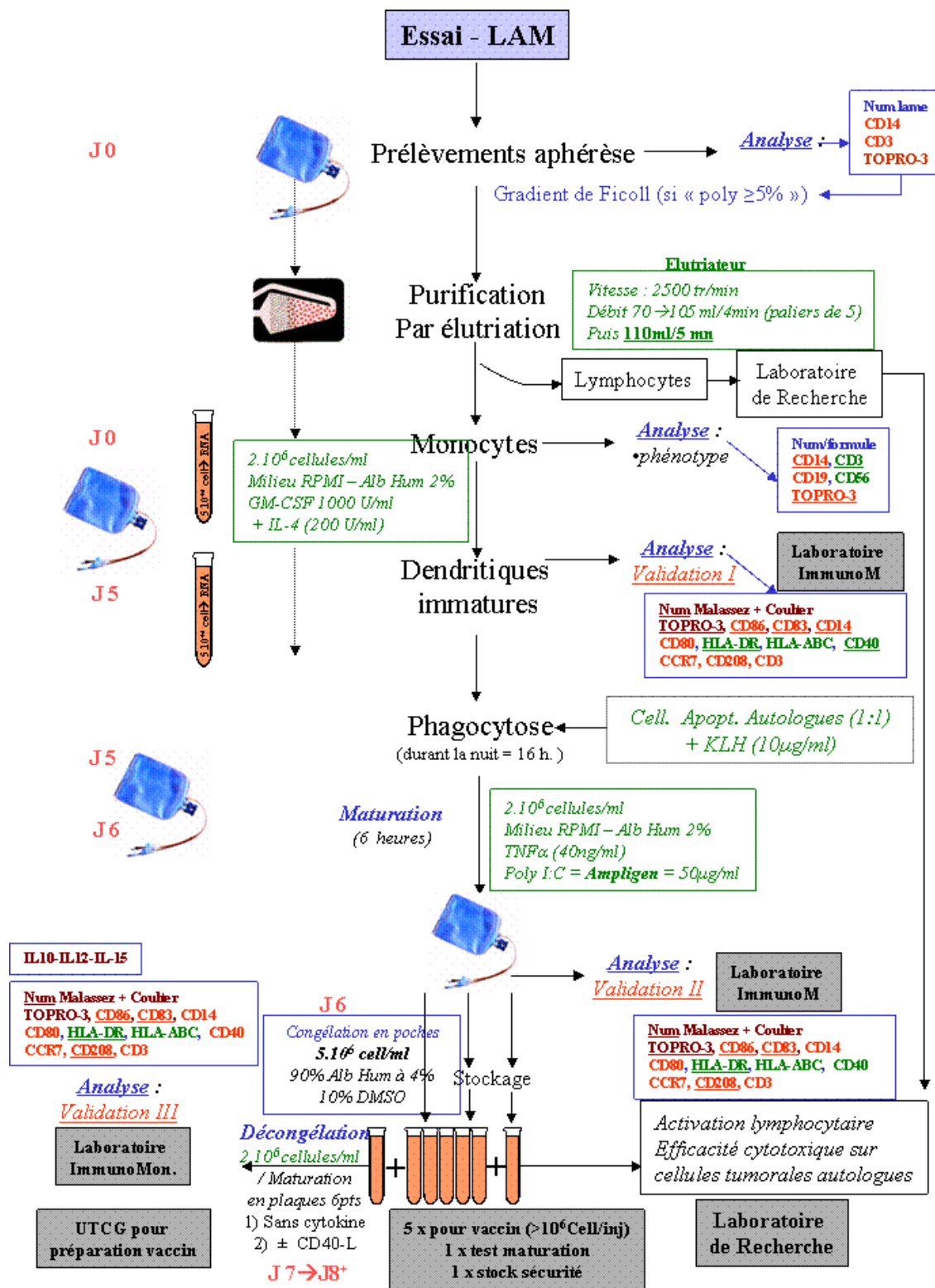


Figure 21 : Protocole de production de l'essai "LAM".

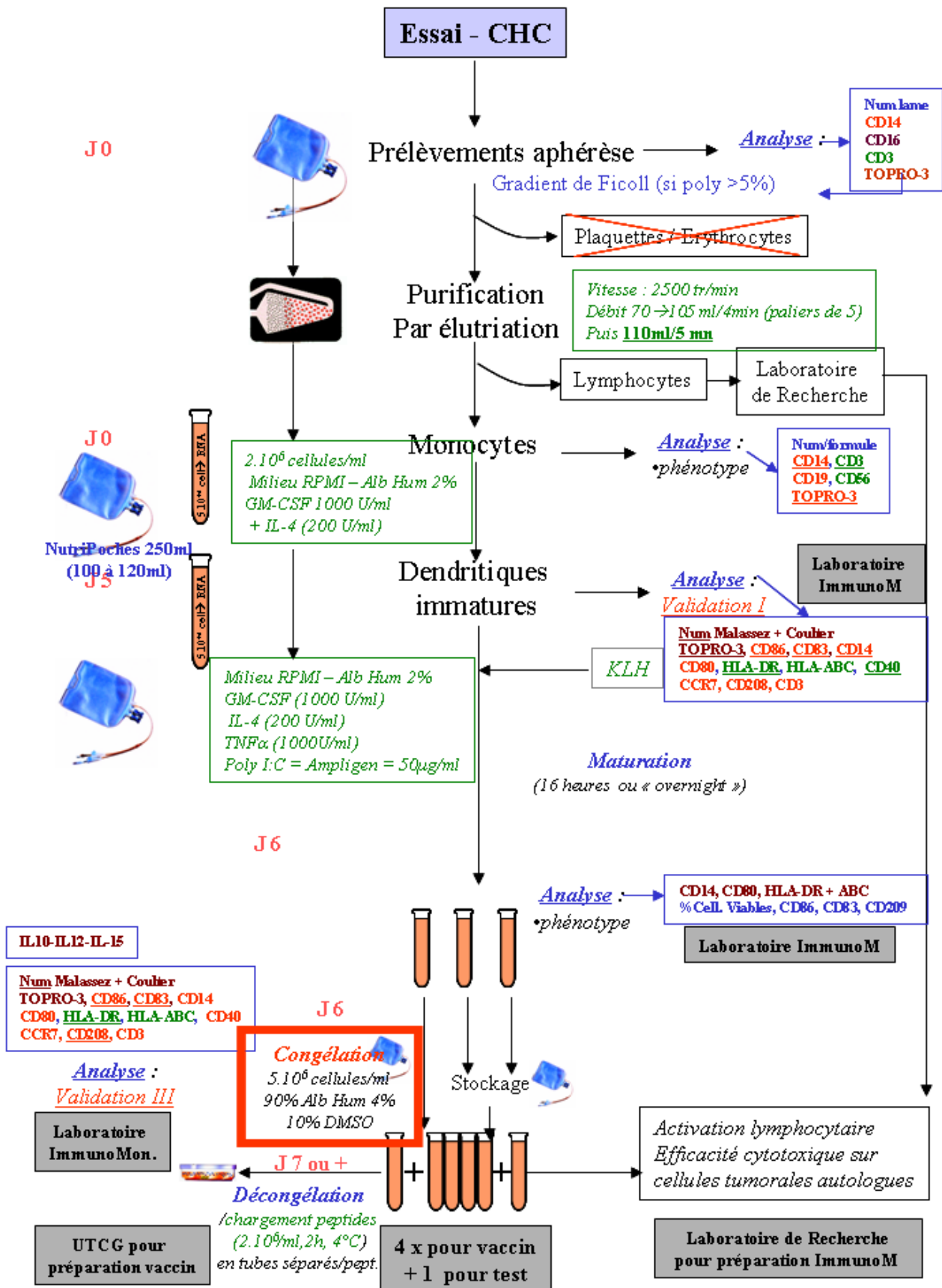


Figure 22 : Protocole de production de l'essai "CHC".

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aalamian, M., Tourkova, I. L., Chatta, G. S., Lilja, H., Huland, E., Huland, H., Shurin, G. V., and Shurin, M. R. (2003). Inhibition of dendropoiesis by tumor derived and purified prostate specific antigen. *J Urol* 170, 2026-2030.

Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumuller, H., Luking, C., Mysliwietz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D. H., Rocken, M., and Mocikat, R. (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 106, 338-344.

Agadjanyan, M. G., Kim, J. J., Trivedi, N., Wilson, D. M., Monzavi-Karbassi, B., Morrison, L. D., Nottingham, L. K., Dentchev, T., Tsai, A., Dang, K., *et al.* (1999). CD86 (B7-2) can function to drive MHC-restricted antigen-specific CTL responses in vivo. *J Immunol* 162, 3417-3427.

Ahmadzadeh, M., and Rosenberg, S. A. (2006). IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 107, 2409-2414.

Akiba, H., Miyahira, Y., Atsuta, M., Takeda, K., Nohara, C., Futagawa, T., Matsuda, H., Aoki, T., Yagita, H., and Okumura, K. (2000). Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J Exp Med* 191, 375-380.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N. (1998a). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1359-1368.

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

Allan, R. S., Smith, C. M., Belz, G. T., van Lint, A. L., Wakim, L. M., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301, 1925-1928.

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

Arbuckle, E., Langlois, N. E., Eremin, O., and Heys, S. D. (2000). Evidence for Fas counter attack in vivo from a study of colorectal cancer. *Oncol Rep* 7, 45-47.

Arroyo, J. C., Gabilondo, F., Llorente, L., Meraz-Rios, M. A., and Sanchez-Torres, C. (2004). Immune response induced in vitro by CD16- and CD16+ monocyte-derived dendritic cells in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with dendritic cell vaccines. *J Clin Immunol* 24, 86-96.

Attia, P., Phan, G. Q., Maker, A. V., Robinson, M. R., Quezado, M. M., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., *et al.* (2005). Autoimmunity correlates

with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 23, 6043-6053.

Avigan, D., Vasir, B., Gong, J., Borges, V., Wu, Z., Uhl, L., Atkins, M., Mier, J., McDermott, D., Smith, T., *et al.* (2004). Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. *Clin Cancer Res* 10, 4699-4708.

Babatz, J., Rollig, C., Oelschlagel, U., Zhao, S., Ehninger, G., Schmitz, M., and Bornhauser, M. (2003). Large-scale immunomagnetic selection of CD14⁺ monocytes to generate dendritic cells for cancer immunotherapy: a phase I study. *J Hematother Stem Cell Res* 12, 515-523.

Badawi, A. F. (2000). The role of prostaglandin synthesis in prostate cancer. *BJU Int* 85, 451-462.

Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5, 296-306.

Banchereau, J., Palucka, A. K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K. M., Bhardwaj, N., *et al.* (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61, 6451-6458.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Banchereau, J., Ueno, H., Dhodapkar, M., Connolly, J., Finholt, J. P., Klechevsky, E., Blanck, J. P., Johnston, D. A., Palucka, A. K., and Fay, J. (2005). Immune and clinical outcomes in patients with stage IV melanoma vaccinated with peptide-pulsed dendritic cells derived from CD34⁺ progenitors and activated with type I interferon. *J Immunother* 28, 505-516.

Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., *et al.* (1996). Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14, 737-744.

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

Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12, 1539-1546.

Baumgaertner, P., Rufer, N., Devedre, E., Derre, L., Rimoldi, D., Geldhof, C., Voelter, V., Lienard, D., Romero, P., and Speiser, D. E. (2006). Ex vivo detectable human CD8 T-cell responses to cancer-testis antigens. *Cancer Res* 66, 1912-1916.

Bedrosian, I., Mick, R., Xu, S., Nisenbaum, H., Faries, M., Zhang, P., Cohen, P. A., Koski, G., and Czerniecki, B. J. (2003). Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8⁺ T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol* 21, 3826-3835.

- Beg, A. A. (2002). Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 23, 509-512.
- Beissert, S., Hosoi, J., Grabbe, S., Asahina, A., and Granstein, R. D. (1995). IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol* 154, 1280-1286.
- Bendriss-Vermare, N., Burg, S., Kanzler, H., Chaperot, L., Duhon, T., de Bouteiller, O., D'Agostini, M., Bridon, J. M., Durand, I., Sederstrom, J. M., *et al.* (2005). Virus overrides the propensity of human CD40L-activated plasmacytoid dendritic cells to produce Th2 mediators through synergistic induction of IFN- γ and Th1 chemokine production. *J Leukoc Biol* 78, 954-966.
- Benlalam, H., Vignard, V., Khammari, A., Bonnin, A., Godet, Y., Pandolfino, M. C., Jotereau, F., Dreno, B., and Labarriere, N. (2006). Infusion of Melan-A/Mart-1 specific tumor-infiltrating lymphocytes enhanced relapse-free survival of melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.*
- 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.
- Berard, F., Blanco, P., Davoust, J., Neidhart-Berard, E. M., Nouri-Shirazi, M., Taquet, N., Rimoldi, D., Cerottini, J. C., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2000). Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 192, 1535-1544.
- Berger, T. G., Strasser, E., Smith, R., Carste, C., Schuler-Thurner, B., Kaempgen, E., and Schuler, G. (2005). Efficient elutriation of monocytes within a closed system (Elutra) for clinical-scale generation of dendritic cells. *J Immunol Methods* 298, 61-72.
- Berhanu, A., Huang, J., Alber, S. M., Watkins, S. C., and Storkus, W. J. (2006). Combinational FLt3 ligand and granulocyte macrophage colony-stimulating factor treatment promotes enhanced tumor infiltration by dendritic cells and antitumor CD8(+) T-cell cross-priming but is ineffective as a therapy. *Cancer Res* 66, 4895-4903.
- Bertho, N., Adamski, H., Toujas, L., Debove, M., Davoust, J., and Quillien, V. (2005). Efficient migration of dendritic cells toward lymph node chemokines and induction of T(H)1 responses require maturation stimulus and apoptotic cell interaction. *Blood* 106, 1734-1741.
- Beyer, M., Kochanek, M., Darabi, K., Popov, A., Jensen, M., Endl, E., Knolle, P. A., Thomas, R. K., von Bergwelt-Baildon, M., Debey, S., *et al.* (2005). Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 106, 2018-2025.
- Blank, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Rollinghoff, M., and Moll, H. (1993). Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis* 167, 418-425.

- Blom, B., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (2000). Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192, 1785-1796.
- Boccaccio, C., Jacod, S., Kaiser, A., Boyer, A., Abastado, J. P., and Nardin, A. (2002). Identification of a clinical-grade maturation factor for dendritic cells. *J Immunother* 25, 88-96.
- Bocchia, M., Bronte, V., Colombo, M. P., De Vincentiis, A., Di Nicola, M., Forni, G., Lanata, L., Lemoli, R. M., Massaia, M., Rondelli, D., *et al.* (2000). Antitumor vaccination: where we stand. *Haematologica* 85, 1172-1206.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C., and Steinman, R. M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.
- Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M. K., Moltedo, B., Moran, T. M., and Steinman, R. M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199, 815-824.
- Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y. J., and O'Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 197, 101-109.
- Braun, D., Longman, R. S., and Albert, M. L. (2005). A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 106, 2375-2381.
- Briere, F., Bendriss-Vermare, N., Delale, T., Burg, S., Corbet, C., Rissoan, M. C., Chaperot, L., Plumas, J., Jacob, M. C., Trinchieri, G., and Bates, E. E. (2002). Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63, 1081-1093.
- Bruix, J., Boix, L., Sala, M., and Llovet, J. M. (2004). Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 5, 215-219.
- Bruserud, O., and Wendelboe, O. (2001). Biological treatment in acute myelogenous leukaemia: how should T-cell targeting immunotherapy be combined with intensive chemotherapy? *Expert Opin Biol Ther* 1, 1005-1016.
- Buggins, A. G., Milojkovic, D., Arno, M. J., Lea, N. C., Mufti, G. J., Thomas, N. S., and Hirst, W. J. (2001). Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-kappaB, c-Myc, and pRb pathways. *J Immunol* 167, 6021-6030.
- Burnet, F. M. (1967). Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1, 1171-1174.
- Butterfield, L. H., Meng, W. S., Koh, A., Vollmer, C. M., Ribas, A., Dissette, V. B., Faull, K., Glaspy, J. A., McBride, W. H., and Economou, J. S. (2001). T cell responses to HLA-

A*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein. *J Immunol* 166, 5300-5308.

Butterfield, L. H., Ribas, A., Dissette, V. B., Amarnani, S. N., Vu, H. T., Oseguera, D., Wang, H. J., Elashoff, R. M., McBride, W. H., Mukherji, B., *et al.* (2003a). Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 9, 998-1008.

Butterfield, L. H., Ribas, A., Dissette, V. B., Lee, Y., Yang, J. Q., De la Rocha, P., Duran, S. D., Hernandez, J., Seja, E., Potter, D. M., *et al.* (2006). A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four alpha-fetoprotein peptides. *Clin Cancer Res* 12, 2817-2825.

Butterfield, L. H., Ribas, A., Meng, W. S., Dissette, V. B., Amarnani, S., Vu, H. T., Seja, E., Todd, K., Glaspy, J. A., McBride, W. H., and Economou, J. S. (2003b). T-cell responses to HLA-A*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res* 9, 5902-5908.

Campoli, M., Chang, C. C., and Ferrone, S. (2002). HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 20 Suppl 4, A40-45.

Camporeale, A., Boni, A., Iezzi, G., Degl'Innocenti, E., Grioni, M., Mondino, A., and Bellone, M. (2003). Critical impact of the kinetics of dendritic cells activation on the in vivo induction of tumor-specific T lymphocytes. *Cancer Res* 63, 3688-3694.

Casares, N., Pequignot, M. O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., *et al.* (2005). Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 202, 1691-1701.

Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M. C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A., and Vicari, A. (2000). Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* 22, 345-369.

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

Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388, 782-787.

Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1, 305-310.

Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-923.

- Chabot, V., Reverdiau, P., Iochmann, S., Rico, A., Senecal, D., Goupille, C., Sizaret, P. Y., and Sensebe, L. (2006). CCL5-enhanced human immature dendritic cell migration through the basement membrane in vitro depends on matrix metalloproteinase-9. *J Leukoc Biol* 79, 767-778.
- Chapiro, J., Claverol, S., Piette, F., Ma, W., Stroobant, V., Guillaume, B., Gairin, J. E., Morel, S., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., *et al.* (2006). Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol* 176, 1053-1061.
- Charbonnier, A., Gaugler, B., Sainty, D., Lafage-Pochitaloff, M., and Olive, D. (1999). Human acute myeloblastic leukemia cells differentiate in vitro into mature dendritic cells and induce the differentiation of cytotoxic T cells against autologous leukemias. *Eur J Immunol* 29, 2567-2578.
- Chauveau, C., Remy, S., Royer, P. J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F. X., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M., *et al.* (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106, 1694-1702.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
- Chen, Z., Moyana, T., Saxena, A., Warrington, R., Jia, Z., and Xiang, J. (2001). Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *Int J Cancer* 93, 539-548.
- Choudhury, B. A., Liang, J. C., Thomas, E. K., Flores-Romo, L., Xie, Q. S., Agusala, K., Sutaria, S., Sinha, I., Champlin, R. E., and Claxton, D. F. (1999). Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood* 93, 780-786.
- Cignetti, A., Vallario, A., Roato, I., Circosta, P., Allione, B., Casorzo, L., Ghia, P., and Caligaris-Cappio, F. (2004). Leukemia-derived immature dendritic cells differentiate into functionally competent mature dendritic cells that efficiently stimulate T cell responses. *J Immunol* 173, 2855-2865.
- Claxton, D. F., McMannis, J., Champlin, R., and Choudhury, A. (2001). Therapeutic potential of leukemia-derived dendritic cells: preclinical and clinical progress. *Crit Rev Immunol* 21, 147-155.
- Colombat, P., Salles, G., Brousse, N., Eftekhari, P., Soubeyran, P., Delwail, V., Deconinck, E., Haioun, C., Foussard, C., Sebban, C., *et al.* (2001). Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood* 97, 101-106.
- Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3, 609-620.

- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10, 942-949.
- Curiel, T. J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K. L., Daniel, B., Zimmermann, M. C., *et al.* (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 9, 562-567.
- Curti, A., Isidori, A., Ferri, E., Terragna, C., Neyroz, P., Cellini, C., Ratta, M., Baccarani, M., and Lemoli, R. M. (2004). Generation of dendritic cells from positively selected CD14+ monocytes for anti-tumor immunotherapy. *Leuk Lymphoma* 45, 1419-1428.
- Dannull, J., Su, Z., Rizzieri, D., Yang, B. K., Coleman, D., Yancey, D., Zhang, A., Dahm, P., Chao, N., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2005). Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 115, 3623-3633.
- Dauer, M., Obermaier, B., Hertel, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., Schnurr, M., Endres, S., and Eigler, A. (2003). Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 170, 4069-4076.
- Dauer, M., Schad, K., Hertel, J., Junkmann, J., Bauer, C., Kiefl, R., Endres, S., and Eigler, A. (2005). FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *J Immunol Methods* 302, 145-155.
- de Jong, E. C., Smits, H. H., and Kapsenberg, M. L. (2005). Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 26, 289-307.
- de Jong, E. C., Vieira, P. L., Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Tanaka, Y., Wierenga, E. A., Yazdanbakhsh, M., and Kapsenberg, M. L. (2002). Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol* 168, 1704-1709.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34, 2480-2488.
- De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1997). Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 27, 1229-1235.
- De Vries, I. J., Krooshoop, D. J., Scharenborg, N. M., Lesterhuis, W. J., Diepstra, J. H., Van Muijen, G. N., Strijk, S. P., Ruers, T. J., Boerman, O. C., Oyen, W. J., *et al.* (2003a). Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 63, 12-17.
- de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., Barentsz, J. O., Verdijk, P., van Krieken, J. H., Boerman, O. C., Oyen, W. J., Bonenkamp, J. J., Boezeman, J. B., Adema, G. J., *et al.* (2005). Magnetic

resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotechnol* 23, 1407-1413.

de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., Scharenborg, N. M., Engelen, L. P., Ruiter, D. J., Gerritsen, M. J., Croockewit, S., Britten, C. M., Torensma, R., Adema, G. J., *et al.* (2003b). Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clin Cancer Res* 9, 5091-5100.

Delamarre, L., Holcombe, H., and Mellman, I. (2003). Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med* 198, 111-122.

Delluc, S., Tourneur, L., Michallet, A. S., Boix, C., Varet, B., Fradelizi, D., Guillet, J. G., and Buzyn, A. (2005). Autologous peptides eluted from acute myeloid leukemia cells can be used to generate specific antileukemic CD4 helper and CD8 cytotoxic T lymphocyte responses in vitro. *Haematologica* 90, 1050-1062.

Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J., and Jeannin, P. (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 17, 353-362.

Dhodapkar, M. V., and Steinman, R. M. (2002). Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 100, 174-177.

Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193, 233-238.

Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Sapp, M., Desai, H., Fossella, C., Krasovsky, J., Donahoe, S. M., Dunbar, P. R., Cerundolo, V., Nixon, D. F., and Bhardwaj, N. (1999). Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* 104, 173-180.

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Mortarini, R., Baldassari, P., Guidetti, A., Gallino, G. F., Del Vecchio, M., Ravagnani, F., Magni, M., Chaplin, P., *et al.* (2004). Boosting T cell-mediated immunity to tyrosinase by vaccinia virus-transduced, CD34(+)-derived dendritic cell vaccination: a phase I trial in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 10, 5381-5390.

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.

Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188, 373-386.

- Dillman, R. O., Beutel, L. D., Barth, N. M., de Leon, C., O'Connor, A. A., DePriest, C., and Nayak, S. K. (2002). Irradiated cells from autologous tumor cell lines as patient-specific vaccine therapy in 125 patients with metastatic cancer: induction of delayed-type hypersensitivity to autologous tumor is associated with improved survival. *Cancer Biother Radiopharm* 17, 51-66.
- Dillman, R. O., Selvan, S. R., and Schiltz, P. M. (2006). Patient-specific dendritic-cell vaccines for metastatic melanoma. *N Engl J Med* 355, 1179-1181.
- Djerbi, M., Screpanti, V., Catrina, A. I., Bogen, B., Biberfeld, P., and Grandien, A. (1999). The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* 190, 1025-1032.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-800.
- Drechsler, Y., Dolganiuc, A., Norkina, O., Romics, L., Li, W., Kodys, K., Bach, F. H., Mandrekar, P., and Szabo, G. (2006). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of acute alcohol on IL-10 induction involving p38 MAPK activation in monocytes. *J Immunol* 177, 2592-2600.
- Dudley, M. E., and Rosenberg, S. A. (2003). Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 666-675.
- Dustin, M. L., and Cooper, J. A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 1, 23-29.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.
- Elkord, E., Williams, P. E., Kynaston, H., and Rowbottom, A. W. (2005). Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology* 114, 204-212.
- Engering, A., Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaurex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguet, V., and van Kooyk, Y. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 168, 2118-2126.
- Escobar, A., Lopez, M., Serrano, A., Ramirez, M., Perez, C., Aguirre, A., Gonzalez, R., Alfaro, J., Larrondo, M., Fodor, M., *et al.* (2005). Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin Exp Immunol* 142, 555-568.
- Evan, G. I., and Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.

- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 1206-1212.
- Fang, J., Akaike, T., and Maeda, H. (2004). Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 9, 27-35.
- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., and Guyre, P. M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157, 541-548.
- Faradji, A., Bohbot, A., Schmitt-Goguel, M., Siffert, J. C., Dumont, S., Wiesel, M. L., Piemont, Y., Eischen, A., Bergerat, J. P., Bartholeyns, J., and et al. (1994). Large scale isolation of human blood monocytes by continuous flow centrifugation leukapheresis and counterflow centrifugation elutriation for adoptive cellular immunotherapy in cancer patients. *J Immunol Methods* 174, 297-309.
- Felzmann, T., Witt, V., Wimmer, D., Ressmann, G., Wagner, D., Paul, P., Huttner, K., and Fritsch, G. (2003). Monocyte enrichment from leukapheresis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection. *Cytotherapy* 5, 391-398.
- Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., and Munz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195, 343-351.
- Fields, R. C., Shimizu, K., and Mule, J. J. (1998). Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9482-9487.
- Figdor, C. G., de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., and Melief, C. J. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 10, 475-480.
- Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., Breen, J. K., Strang, G., Ruegg, C. L., and Engleman, E. G. (2001a). Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol* 167, 7150-7156.
- Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., Wu, L., and Engleman, E. G. (2001b). Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* 166, 4254-4259.
- 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.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.

- 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.
- Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D. P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2, 1096-1103.
- Gajewski, T. F., Meng, Y., and Harlin, H. (2006). Immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother* 29, 233-240.
- Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5, 1249-1255.
- Gattinoni, L., Finkelstein, S. E., Klebanoff, C. A., Antony, P. A., Palmer, D. C., Spiess, P. J., Hwang, L. N., Yu, Z., Wrzesinski, C., Heimann, D. M., *et al.* (2005). Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 202, 907-912.
- Gatza, E., and Okada, C. Y. (2006). Adjuvant IL-15 does not enhance the efficacy of tumor cell lysate-pulsed dendritic cell vaccines for active immunotherapy of T cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother* 55, 420-432.
- Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., and Trinchieri, G. (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 174, 727-734.
- Gershon, R. K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723-737.
- Gershon, R. K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21, 903-914.
- Gett, A. V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Geginat, J. (2003). T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4, 355-360.
- Gilboa, E., and Vieweg, J. (2004). Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* 199, 251-263.
- Gildea, L. A., Morris, R. E., and Newman, S. L. (2001). *Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *J Immunol* 166, 1049-1056.
- Giordano, D., Magaletti, D. M., and Clark, E. A. (2006). Nitric oxide and cGMP protein kinase (cGK) regulate dendritic-cell migration toward the lymph-node-directing chemokine CCL19. *Blood* 107, 1537-1545.
- Gitlitz, B. J., Belldegrun, A. S., Zisman, A., Chao, D. H., Pantuck, A. J., Hinkel, A., Mulders, P., Moldawer, N., Tso, C. L., and Figlin, R. A. (2003). A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J Immunother* 26, 412-419.

- Goldszmid, R. S., Idoyaga, J., Bravo, A. I., Steinman, R., Mordoh, J., and Wainstok, R. (2003). Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4⁺ and CD8⁺ T cell immunity against B16 melanoma. *J Immunol* 171, 5940-5947.
- Goodman, A. I., Choudhury, M., da Silva, J. L., Schwartzman, M. L., and Abraham, N. G. (1997). Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 214, 54-61.
- Goxe, B., Latour, N., Bartholeyns, J., Romet-Lemonne, J. L., and Chokri, M. (1998). Monocyte-derived dendritic cells: development of a cellular processor for clinical applications. *Res Immunol* 149, 643-646.
- Gregoire, M., Ligeza-Poisson, C., Juge-Morineau, N., and Spisek, R. (2003). Anti-cancer therapy using dendritic cells and apoptotic tumour cells: pre-clinical data in human mesothelioma and acute myeloid leukaemia. *Vaccine* 21, 791-794.
- Gregoriadis, G. (1999). DNA vaccines: a role for liposomes. *Curr Opin Mol Ther* 1, 39-42.
- Grimm, C. F., Ortmann, D., Mohr, L., Michalak, S., Krohne, T. U., Meckel, S., Eisele, S., Encke, J., Blum, H. E., and Geissler, M. (2000). Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 119, 1104-1112.
- Groothuis, T. A., and Neefjes, J. (2005). The many roads to cross-presentation. *J Exp Med* 202, 1313-1318.
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P., and Ley, T. J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21, 589-601.
- 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.
- Gutzmer, R., Kother, B., Zwirner, J., Dijkstra, D., Purwar, R., Wittmann, M., and Werfel, T. (2006). Human Plasmacytoid Dendritic Cells Express Receptors for Anaphylatoxins C3a and C5a and Are Chemoattracted to C3a and C5a. *J Invest Dermatol*.
- Hallahan, D. E., Spriggs, D. R., Beckett, M. A., Kufe, D. W., and Weichselbaum, R. R. (1989). Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10104-10107.
- Harrison, B. D., Adams, J. A., Briggs, M., Brereton, M. L., and Yin, J. A. (2001). Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 97, 2764-2771.
- Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-3287.

- Heiser, A., Coleman, D., Dannull, J., Yancey, D., Maurice, M. A., Lallas, C. D., Dahm, P., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2002). Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 109, 409-417.
- Hennemann, B., Rehm, A., Kottke, A., Meidenbauer, N., and Andreesen, R. (1997). Adoptive immunotherapy with tumor-cytotoxic macrophages derived from recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhuGM-CSF) mobilized peripheral blood monocytes. *J Immunother* 20, 365-371.
- Henry, F., Bretaudeau, L., Hequet, A., Barbieux, I., Lieubeau, B., Meflah, K., and Gregoire, M. (1999). Role of antigen-presenting cells in long-term antitumor response based on tumor-derived apoptotic body vaccination. *Pathobiology* 67, 306-310.
- Hersey, P., Menzies, S. W., Halliday, G. M., Nguyen, T., Farrelly, M. L., DeSilva, C., and Lett, M. (2004). Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 53, 125-134.
- Hiraoka, K., Yamamoto, S., Otsuru, S., Nakai, S., Tamai, K., Morishita, R., Ogihara, T., and Kaneda, Y. (2004). Enhanced tumor-specific long-term immunity of hemagglutinating [correction of hemagglutinating] virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 173, 4297-4307.
- Hoene, V., Peiser, M., and Wanner, R. (2006). Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J Leukoc Biol*.
- Holtl, L., Ramoner, R., Zelle-Rieser, C., Gander, H., Putz, T., Papesh, C., Nussbaumer, W., Falkensammer, C., Bartsch, G., and Thurnher, M. (2005). Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother* 54, 663-670.
- Holtl, L., Zelle-Rieser, C., Gander, H., Papesh, C., Ramoner, R., Bartsch, G., Rogatsch, H., Barsoum, A. L., Coggin, J. H., Jr., and Thurnher, M. (2002). Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 8, 3369-3376.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., Kolb, H. J., Rimm, A. A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., and et al. (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75, 555-562.
- Hosken, N. A., Shibuya, K., Heath, A. W., Murphy, K. M., and O'Garra, A. (1995). The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* 182, 1579-1584.

- Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G., and Levy, R. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2, 52-58.
- Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Amblard, F., and Amigorena, S. (2004). Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* 5, 1235-1242.
- Inaba, K., and Inaba, M. (2005). Antigen recognition and presentation by dendritic cells. *Int J Hematol* 81, 181-187.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R. M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178, 479-488.
- Inohara, Chamaillard, McDonald, C., and Nunez, G. (2005). NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 74, 355-383.
- Ishii, K. J., Suzuki, K., Coban, C., Takeshita, F., Itoh, Y., Matoba, H., Kohn, L. D., and Klinman, D. M. (2001). Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* 167, 2602-2607.
- Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S., and Fukuhara, S. (2002). Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 195, 1507-1512.
- Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., *et al.* (1999). A CD1a⁺/CD11c⁺ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 163, 1409-1419.
- Iwashita, Y., Tahara, K., Goto, S., Sasaki, A., Kai, S., Seike, M., Chen, C. L., Kawano, K., and Kitano, S. (2003). A phase I study of autologous dendritic cell-based immunotherapy for patients with unresectable primary liver cancer. *Cancer Immunol Immunother* 52, 155-161.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., and Schoenberger, S. P. (2003). CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.
- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 3388-3393.
- Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J. P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225-234.
- Jenne, L., Arrighi, J. F., Jonuleit, H., Saurat, J. H., and Hauser, C. (2000). Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8⁺ T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Res* 60, 4446-4452.

- Jenne, L., Schuler, G., and Steinkasserer, A. (2001). Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Trends Immunol* 22, 102-107.
- Jerome, V., Graser, A., Muller, R., Kontermann, R. E., and Konur, A. (2006). Cytotoxic T lymphocytes responding to low dose TRP2 antigen are induced against B16 melanoma by liposome-encapsulated TRP2 peptide and CpG DNA adjuvant. *J Immunother* 29, 294-305.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151-155.
- Jilek, S., Merkle, H. P., and Walter, E. (2005). DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 377-390.
- 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.
- Johnson, B. E., and Janne, P. A. (2006). Rationale for a Phase II Trial of Pertuzumab, a HER-2 Dimerization Inhibitor, in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 12, 4436s-4440s.
- Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T. B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P. P., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2001). A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 93, 243-251.
- Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27, 3135-3142.
- Jonuleit, H., and Schmitt, E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 171, 6323-6327.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192, 1213-1222.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F., and Liu, Y. J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194, 863-869.
- Kamath, A. T., Henri, S., Battye, F., Tough, D. F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100, 1734-1741.

- Kaneider, N. C., Kaser, A., Tilg, H., Ricevuti, G., and Wiedermann, C. J. (2003). CD40 ligand-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells by activated platelets. *Int J Immunopathol Pharmacol* 16, 225-231.
- Kedl, R. M., Rees, W. A., Hildeman, D. A., Schaefer, B., Mitchell, T., Kappler, J., and Marrack, P. (2000). T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J Exp Med* 192, 1105-1113.
- Kellermann, S. A., Hudak, S., Oldham, E. R., Liu, Y. J., and McEvoy, L. M. (1999). The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J Immunol* 162, 3859-3864.
- Kennedy-Smith, A. G., McKenzie, J. L., Owen, M. C., Davidson, P. J., Vuckovic, S., and Hart, D. N. (2002). Prostate specific antigen inhibits immune responses in vitro: a potential role in prostate cancer. *J Urol* 168, 741-747.
- Khong, H. T., Wang, Q. J., and Rosenberg, S. A. (2004). Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J Immunother* 27, 184-190.
- Kim, J. J., Bagarazzi, M. L., Trivedi, N., Hu, Y., Kazahaya, K., Wilson, D. M., Ciccarelli, R., Chattergoon, M. A., Dang, K., Mahalingam, S., *et al.* (1997). Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *Nat Biotechnol* 15, 641-646.
- Klebanoff, C. A., Khong, H. T., Antony, P. A., Palmer, D. C., and Restifo, N. P. (2005). Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends Immunol* 26, 111-117.
- Kodaira, Y., Nair, S. K., Wrenshall, L. E., Gilboa, E., and Platt, J. L. (2000). Phenotypic and functional maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate. *J Immunol* 165, 1599-1604.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Koneru, M., Schaer, D., Monu, N., Ayala, A., and Frey, A. B. (2005). Defective proximal TCR signaling inhibits CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. *J Immunol* 174, 1830-1840.
- Kotera, Y., Shimizu, K., and Mule, J. J. (2001). Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res* 61, 8105-8109.
- Kradin, R. L., Kurnick, J. T., Lazarus, D. S., Preffer, F. I., Dubinett, S. M., Pinto, C. E., Gifford, J., Davidson, E., Grove, B., Callahan, R. J., and *et al.* (1989). Tumour-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in treatment of advanced cancer. *Lancet* 1, 577-580.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engemann, H., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G. (2001). Toll-like receptor

expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31, 3026-3037.

Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Zhu, G., Mottram, P., Xu, H., Chen, L., and Zou, W. (2006). Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* 177, 40-44.

Kuang, M., Peng, B. G., Lu, M. D., Liang, L. J., Huang, J. F., He, Q., Hua, Y. P., Totsuka, S., Liu, S. Q., Leong, K. W., and Ohno, T. (2004). Phase II randomized trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine for postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 1574-1579.

Kuchroo, V. K., Das, M. P., Brown, J. A., Ranger, A. M., Zamvil, S. S., Sobel, R. A., Weiner, H. L., Nabavi, N., and Glimcher, L. H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80, 707-718.

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

Ladhams, A., Schmidt, C., Sing, G., Butterworth, L., Fielding, G., Tesar, P., Strong, R., Leggett, B., Powell, L., Maddern, G., *et al.* (2002). Treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma with autologous tumor-pulsed dendritic cells. *J Gastroenterol Hepatol* 17, 889-896.

Landowski, T. H., Qu, N., Buyuksal, I., Painter, J. S., and Dalton, W. S. (1997). Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 90, 4266-4270.

Langenkamp, A., Casorati, G., Garavaglia, C., Dellabona, P., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2002). T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intraclonal functional diversification. *Eur J Immunol* 32, 2046-2054.

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.

Larmonier, N., Merino, D., Nicolas, A., Cathelin, D., Besson, A., Bateman, A., Solary, E., Martin, F., Katsanis, E., and Bonnotte, B. (2006). Apoptotic, necrotic, or fused tumor cells: An equivalent source of antigen for dendritic cell loading. *Apoptosis*.

Larregina, A. T., Morelli, A. E., Tkacheva, O., Erdos, G., Donahue, C., Watkins, S. C., Thomson, A. W., and Falo, L. D., Jr. (2004). Highly efficient expression of transgenic proteins by naked DNA-transfected dendritic cells through terminal differentiation. *Blood* 103, 811-819.

Leblond, C. P., and Inoue, S. (1989). Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat* 185, 367-390.

- Lee, A. W., Truong, T., Bickham, K., Fonteneau, J. F., Larsson, M., Da Silva, I., Somersan, S., Thomas, E. K., and Bhardwaj, N. (2002a). A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine 20 Suppl 4*, A8-A22.
- Lee, K. H., Holdorf, A. D., Dustin, M. L., Chan, A. C., Allen, P. M., and Shaw, A. S. (2002b). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science 295*, 1539-1542.
- Lee, T. S., and Chau, L. Y. (2002). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med 8*, 240-246.
- Lee, W. C., Wang, H. C., Hung, C. F., Huang, P. F., Lia, C. R., and Chen, M. F. (2005). Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial. *J Immunother 28*, 496-504.
- Legge, K. L., and Braciale, T. J. (2003). Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity 18*, 265-277.
- Lehar, S. M., and Bevan, M. J. (2004). Immunology: polarizing a T-cell response. *Nature 430*, 150-151.
- Lemaitre, B. (2004). The road to Toll. *Nat Rev Immunol 4*, 521-527.
- Li, L., Reinhardt, P., Schmitt, A., Barth, T. F., Greiner, J., Ringhoffer, M., Dohner, H., Wiesneth, M., and Schmitt, M. (2005). Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens. *Cancer Immunol Immunother 54*, 685-693.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., and Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol 24*, 99-146.
- Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., and Strom, T. B. (2001). IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med 7*, 114-118.
- Liau, L. M., Prins, R. M., Kiertscher, S. M., Odesa, S. K., Kremen, T. J., Giovannone, A. J., Lin, J. W., Chute, D. J., Mischel, P. S., Cloughesy, T. F., and Roth, M. D. (2005). Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment. *Clin Cancer Res 11*, 5515-5525.
- Lin, C. L., Suri, R. M., Rahdon, R. A., Austyn, J. M., and Roake, J. A. (1998). Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur J Immunol 28*, 4114-4122.
- Lindner, M., and Schirmacher, V. (2002). Tumour cell-dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethylen-glycol versus electro-fusion protocols. *Eur J Clin Invest 32*, 207-217.

- Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 3, 822-829.
- Liu, G., Black, K. L., and Yu, J. S. (2006a). Sensitization of malignant glioma to chemotherapy through dendritic cell vaccination. *Expert Rev Vaccines* 5, 233-247.
- Liu, Y., Daley, S., Evdokimova, V. N., Zdobinski, D. D., Potter, D. M., and Butterfield, L. H. (2006b). Hierarchy of alpha fetoprotein (AFP)-specific T cell responses in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer. *J Immunol* 177, 712-721.
- Liu, Y. J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306.
- Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S., and Linehan, D. C. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169, 2756-2761.
- Lonchay, C., van der Bruggen, P., Connerotte, T., Hanagiri, T., Coulie, P., Colau, D., Lucas, S., Van Pel, A., Thielemans, K., van Baren, N., and Boon, T. (2004). Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14631-14638.
- Lowenberg, B., Griffin, J. D., and Tallman, M. S. (2003). Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 82-101.
- Lyakh, L. A., Sanford, M., Chekol, S., Young, H. A., and Roberts, A. B. (2005). TGF-beta and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells. *J Immunol* 174, 2061-2070.
- Mackall, C. L. (1999). T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review. *Oncologist* 4, 370-378.
- Mackensen, A., Herbst, B., Chen, J. L., Kohler, G., Noppen, C., Herr, W., Spagnoli, G. C., Cerundolo, V., and Lindemann, A. (2000). Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer* 86, 385-392.
- MacLennan, I., and Vinuesa, C. (2002). Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* 17, 235-238.
- Maier, T., Tun-Kyi, A., Tassis, A., Jungius, K. P., Burg, G., Dummer, R., and Nestle, F. O. (2003). Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intranodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells. *Blood* 102, 2338-2344.
- Maines, M. D., and Abrahamsson, P. A. (1996). Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology* 47, 727-733.

- Maio, M., Fonsatti, E., Lamaj, E., Altomonte, M., Cattarossi, I., Santantonio, C., Melani, C., Belli, F., Arienti, F., Colombo, M. P., and Parmiani, G. (2002). Vaccination of stage IV patients with allogeneic IL-4- or IL-2-gene-transduced melanoma cells generates functional antibodies against vaccinating and autologous melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 51, 9-14.
- Malmberg, K. J., and Ljunggren, H. G. (2006). Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. *Semin Cancer Biol* 16, 16-31.
- Maraskovsky, E., Sjolander, S., Drane, D. P., Schnurr, M., Le, T. T., Mateo, L., Luft, T., Masterman, K. A., Tai, T. Y., Chen, Q., *et al.* (2004). NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8+ t-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1+ tumors. *Clin Cancer Res* 10, 2879-2890.
- Marsland, B. J., Battig, P., Bauer, M., Ruedl, C., Lassing, U., Beerli, R. R., Dietmeier, K., Ivanova, L., Pfister, T., Vogt, L., *et al.* (2005). CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity* 22, 493-505.
- Martin-Fontecha, A., Sebastiani, S., Hopken, U. E., Uguccioni, 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.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5, 1260-1265.
- Masse, D., Voisine, C., Henry, F., Cordel, S., Barbieux, I., Josien, R., Meflah, K., Gregoire, M., and Lieubeau, B. (2002). Increased vaccination efficiency with apoptotic cells by silica-induced, dendritic-like cells. *Cancer Res* 62, 1050-1056.
- Mazzoni, A., and Segal, D. M. (2004). Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 75, 721-730.
- McIlroy, D., and Gregoire, M. (2003). Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunol Immunother* 52, 583-591.
- McWilliam, A. S., Nelson, D., Thomas, J. A., and Holt, P. G. (1994). Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 179, 1331-1336.
- Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A., and Luster, A. D. (2003). The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* 170, 5165-5175.
- Melcher, A., Todryk, S., Hardwick, N., Ford, M., Jacobson, M., and Vile, R. G. (1998). Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med* 4, 581-587.

- Menetrier-Caux, C., Montmain, G., Dieu, M. C., Bain, C., Favrot, M. C., Caux, C., and Blay, J. Y. (1998). Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92, 4778-4791.
- Midis, G. P., Shen, Y., and Owen-Schaub, L. B. (1996). Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy. *Cancer Res* 56, 3870-3874.
- Miller, A. M., and Pisa, P. (2005). Tumor escape mechanisms in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 1-7.
- Mocikat, R., Braumuller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmuller, G., *et al.* (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19, 561-569.
- Mohamadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chalouni, C., Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A. K., and Banchereau, J. (2001). Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* 194, 1013-1020.
- Mohty, M., Olive, D., and Gaugler, B. (2002). Leukemic dendritic cells: potential for therapy and insights towards immune escape by leukemic blasts. *Leukemia* 16, 2197-2204.
- Moingeon, P. (2001). Cancer vaccines. *Vaccine* 19, 1305-1326.
- Molldrem, J. J., Lee, P. P., Wang, C., Felio, K., Kantarjian, H. M., Champlin, R. E., and Davis, M. M. (2000). Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med* 6, 1018-1023.
- Morse, M. A., Clay, T. M., Hobeika, A. C., Osada, T., Khan, S., Chui, S., Niedzwiecki, D., Panicali, D., Schlom, J., and Lyster, H. K. (2005). Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules. *Clin Cancer Res* 11, 3017-3024.
- Morton, D. L., Foshag, L. J., Hoon, D. S., Nizze, J. A., Famatiga, E., Wanek, L. A., Chang, C., Davtyan, D. G., Gupta, R. K., Elashoff, R., and *et al.* (1992). Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Ann Surg* 216, 463-482.
- Mullins, D. W., Sheasley, S. L., Ream, R. M., Bullock, T. N., Fu, Y. X., and Engelhard, V. H. (2003). Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control. *J Exp Med* 198, 1023-1034.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., *et al.* (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297, 1867-1870.

- Munn, D. H., Sharma, M. D., and Mellor, A. L. (2004). Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4⁺ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 172, 4100-4110.
- Murphy, G., Tjoa, B., Ragde, H., Kenny, G., and Boynton, A. (1996). Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 29, 371-380.
- Murphy, K. M., and Reiner, S. L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-944.
- Nagata, Y., Ono, S., Matsuo, M., Gnjjatic, S., Valmori, D., Ritter, G., Garrett, W., Old, L. J., and Mellman, I. (2002). Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO-1, by distinct human dendritic cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10629-10634.
- 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.
- Nemunaitis, J., Jahan, T., Ross, H., Sterman, D., Richards, D., Fox, B., Jablons, D., Aimi, J., Lin, A., and Hege, K. (2006). Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAX vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther* 13, 555-562.
- Nersting, J., Svenson, M., Andersen, V., and Bendtzen, K. (2003). Maturation of human dendritic cells by monocyte-conditioned medium is dependent upon trace amounts of lipopolysaccharide inducing tumour necrosis factor alpha. *Immunol Lett* 89, 59-65.
- Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4, 328-332.
- Nestle, F. O., Farkas, A., and Conrad, C. (2005). Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr Opin Immunol* 17, 163-169.
- Nishie, A., Ono, M., Shono, T., Fukushi, J., Otsubo, M., Onoue, H., Ito, Y., Inamura, T., Ikezaki, K., Fukui, M., *et al.* (1999). Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 5, 1107-1113.
- Norbury, C. C. (2006). Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 117, 443-451.
- North, R. J. (1984). The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation. *Adv Immunol* 35, 89-155.
- O'Mahony, D., and Bishop, M. R. (2006). Monoclonal antibody therapy. *Front Biosci* 11, 1620-1635.
- Ormandy, L. A., Hillemann, T., Wedemeyer, H., Manns, M. P., Greten, T. F., and Korangy, F. (2005). Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 65, 2457-2464.

- Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A., and Choi, A. M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6, 422-428.
- Otterbein, L. E., Soares, M. P., Yamashita, K., and Bach, F. H. (2003). Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24, 449-455.
- Paczesny, S., Ueno, H., Fay, J., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2003). Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer. *Semin Cancer Biol* 13, 439-447.
- Pajak, B., Garze, V., Davies, G., Bauer, J., Moser, M., and Chiavaroli, C. (2003). The adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo. *Vaccine* 21, 836-842.
- Panoskaltzis, N. (2005). Dendritic cells in MDS and AML--cause, effect or solution to the immune pathogenesis of disease? *Leukemia* 19, 354-357.
- Panoskaltzis, N., Belanger, T. J., Liesveld, J. L., and Abboud, C. N. (2002). Optimal cytokine stimulation for the enhanced generation of leukemic dendritic cells in short-term culture. *Leuk Res* 26, 191-201.
- Partida-Sanchez, S., Goodrich, S., Kusser, K., Oppenheimer, N., Randall, T. D., and Lund, F. E. (2004). Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity* 20, 279-291.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299, 1033-1036.
- Peguet-Navarro, J., Sportouch, M., Popa, I., Berthier, O., Schmitt, D., and Portoukalian, J. (2003). Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 170, 3488-3494.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S., and Gordon, S. (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14, 123-128.
- Phan, V., Errington, F., Cheong, S. C., Kottke, T., Gough, M., Altmann, S., Brandenburger, A., Emery, S., Strome, S., Bateman, A., *et al.* (2003). A new genetic method to generate and isolate small, short-lived but highly potent dendritic cell-tumor cell hybrid vaccines. *Nat Med* 9, 1215-1219.
- 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.
- Preynat-Seauve, O., Schuler, P., Contassot, E., Beermann, F., Huard, B., and French, L. E. (2006). Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection. *J Immunol* 176, 61-67.
- Qin, H., Zhou, C., Wang, D., Ma, W., Liang, X., Lin, C., Zhang, Y., and Zhang, S. (2006). Enhancement of antitumour immunity by a novel chemotactic antigen DNA vaccine encoding

chemokines and multiepitopes of prostate-tumour-associated antigens. *Immunology* 117, 419-430.

Radoja, S., Saio, M., Schaer, D., Koneru, M., Vukmanovic, S., and Frey, A. B. (2001). CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis. *J Immunol* 167, 5042-5051.

Raez, L. E., Cassileth, P. A., Schlesselman, J. J., Sridhar, K., Padmanabhan, S., Fisher, E. Z., Baldie, P. A., and Podack, E. R. (2004). Allogeneic vaccination with a B7.1 HLA-A gene-modified adenocarcinoma cell line in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22, 2800-2807.

Ramakrishna, V., Treml, J. F., Vitale, L., Connolly, J. E., O'Neill, T., Smith, P. A., Jones, C. L., He, L. Z., Goldstein, J., Wallace, P. K., *et al.* (2004). Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. *J Immunol* 172, 2845-2852.

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.

Reddy, A., Sapp, M., Feldman, M., Subklewe, M., and Bhardwaj, N. (1997). A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 90, 3640-3646.

Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Thery, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189, 371-380.

Reichardt, V. L., Okada, C. Y., Liso, A., Benike, C. J., Stockerl-Goldstein, K. E., Engleman, E. G., Blume, K. G., and Levy, R. (1999). Idiotypic vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study. *Blood* 93, 2411-2419.

Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6, 476-483.

Rescigno, M., Citterio, S., Thery, C., Rittig, M., Medaglini, D., Pozzi, G., Amigorena, S., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5229-5234.

Ribas, A., Camacho, L. H., Lopez-Berestein, G., Pavlov, D., Bulanhagui, C. A., Millham, R., Comin-Anduix, B., Reuben, J. M., Seja, E., Parker, C. A., *et al.* (2005). Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol* 23, 8968-8977.

- Ribas, A., Glaspy, J. A., Lee, Y., Dissette, V. B., Seja, E., Vu, H. T., Tchekmedyian, N. S., Oseguera, D., Comin-Anduix, B., Wargo, J. A., *et al.* (2004). Role of dendritic cell phenotype, determinant spreading, and negative costimulatory blockade in dendritic cell-based melanoma immunotherapy. *J Immunother* 27, 354-367.
- 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.
- Ridgway, D. (2003). The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest* 21, 873-886.
- Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y. J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.
- Ritchie, D., Hermans, I., Yang, J., Walton, J., Matthews, K., Carter, J., Findlay, M., Dady, P., Rawson, P., and Ronchese, F. (2006). Autologous dendritic cells pulsed with eluted peptide as immunotherapy for advanced B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma* 47, 675-682.
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E., and Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9577-9582.
- Robbiani, D. F., Finch, R. A., Jager, D., Muller, W. A., Sartorelli, A. C., and Randolph, G. J. (2000). The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 103, 757-768.
- Rock, K. L., and Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207, 166-183.
- Roddie, H., Klammer, M., Thomas, C., Thomson, R., Atkinson, A., Sproul, A., Waterfall, M., Samuel, K., Yin, J., Johnson, P., and Turner, M. (2006). Phase I/II study of vaccination with dendritic-like leukaemia cells for the immunotherapy of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 133, 152-157.
- Rollins, B. J. (1997). Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
- Romagnoli, G., Nisini, R., Chiani, P., Mariotti, S., Teloni, R., Cassone, A., and Torosantucci, A. (2004). The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function. *J Leukoc Biol* 75, 117-126.
- Ronchetti, A., Rovere, P., Iezzi, G., Galati, G., Heltai, S., Protti, M. P., Garancini, M. P., Manfredi, A. A., Rugarli, C., and Bellone, M. (1999). Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* 163, 130-136.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F. P., Leitman, S., Linehan, W. M., Robertson, C. N., Lee, R. E., Rubin, J. T., and *et al.* (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316, 889-897.

- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., and et al. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 313, 1485-1492.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., and Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10, 909-915.
- Rosenberg, S. A., Yannelli, J. R., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. (1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 86, 1159-1166.
- Roth, M. G. (2006). Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 63-68.
- Roth, W., Isenmann, S., Nakamura, M., Platten, M., Wick, W., Kleihues, P., Bahr, M., Ohgaki, H., Ashkenazi, A., and Weller, M. (2001). Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. *Cancer Res* 61, 2759-2765.
- Rovere, P., Vallinoto, C., Bondanza, A., Crosti, M. C., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rugarli, C., and Manfredi, A. A. (1998). Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* 161, 4467-4471.
- Royer, P. J., Tanguy-Royer, S., Ebstein, F., Sapede, C., Simon, T., Barbieux, I., Oger, R., and Gregoire, M. (2006). Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells. *Scand J Immunol* 63, 401-409.
- Rubartelli, A., Poggi, A., and Zocchi, M. R. (1997). The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol* 27, 1893-1900.
- Rubinstein, M. P., Kadima, A. N., Salem, M. L., Nguyen, C. L., Gillanders, W. E., and Cole, D. J. (2002). Systemic administration of IL-15 augments the antigen-specific primary CD8+ T cell response following vaccination with peptide-pulsed dendritic cells. *J Immunol* 169, 4928-4935.
- Rutault, K., Alderman, C., Chain, B. M., and Katz, D. R. (1999). Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med* 26, 232-238.
- Rutella, S., Danese, S., and Leone, G. (2006). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108, 1435-1440.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.

Salcedo, M., Bercovici, N., Taylor, R., Vereecken, P., Massicard, S., Duriau, D., Vernel-Pauillac, F., Boyer, A., Baron-Bodo, V., Mallard, E., *et al.* (2006). Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunol Immunother* 55, 819-829.

Saleh, M. N., Goldman, S. J., LoBuglio, A. F., Beall, A. C., Sabio, H., McCord, M. C., Minasian, L., Alpaugh, R. K., Weiner, L. M., and Munn, D. H. (1995). CD16⁺ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 85, 2910-2917.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.

Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28, 2760-2769.

Sanderson, K., Scotland, R., Lee, P., Liu, D., Groshen, S., Snively, J., Sian, S., Nichol, G., Davis, T., Keler, T., *et al.* (2005). Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J Clin Oncol* 23, 741-750.

Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., and Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191, 423-434.

Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.

Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.

Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Forster, R., and Groettrup, M. (2002). Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 100, 1354-1361.

Schadendorf, D., Ugurel, S., Schuler-Thurner, B., Nestle, F. O., Enk, A., Brocker, E. B., Grabbe, S., Rittgen, W., Edler, L., Sucker, A., *et al.* (2006). Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* 17, 563-570.

- Schlienger, K., Chu, C. S., Woo, E. Y., Rivers, P. M., Toll, A. J., Hudson, B., Maus, M. V., Riley, J. L., Choi, Y., Coukos, G., *et al.* (2003). TRANCE- and CD40 ligand-matured dendritic cells reveal MHC class I-restricted T cells specific for autologous tumor in late-stage ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 9, 1517-1527.
- Schnurr, M., Chen, Q., Shin, A., Chen, W., Toy, T., Jenderek, C., Green, S., Miloradovic, L., Drane, D., Davis, I. D., *et al.* (2005). Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105, 2465-2472.
- Schnurr, M., Galambos, P., Scholz, C., Then, F., Dauer, M., Endres, S., and Eigler, A. (2001). Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res* 61, 6445-6450.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- Schuler-Thurner, B., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Bender, A., Maczek, C., Jonuleit, H., Roder, C., Haendle, I., Leisgang, W., Dunbar, R., *et al.* (2000). Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 165, 3492-3496.
- Schuler-Thurner, B., Schultz, E. S., Berger, T. G., Weinlich, G., Ebner, S., Woerl, P., Bender, A., Feuerstein, B., Fritsch, P. O., Romani, N., and Schuler, G. (2002). Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 195, 1279-1288.
- Schuler, G., Schuler-Thurner, B., and Steinman, R. M. (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15, 138-147.
- Schultz, E. S., Schuler-Thurner, B., Stroobant, V., Jenne, L., Berger, T. G., Thielemanns, K., van der Bruggen, P., and Schuler, G. (2004). Functional analysis of tumor-specific Th cell responses detected in melanoma patients after dendritic cell-based immunotherapy. *J Immunol* 172, 1304-1310.
- Schulz, O., Edwards, A. D., Schito, M., Aliberti, J., Manickasingham, S., Sher, A., and Reis e Sousa, C. (2000). CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13, 453-462.
- Schutt, P., Buttkereit, U., Brandhorst, D., Lindemann, M., Schmiedl, S., Grosse-Wilde, H., Seeber, S., Nowrousian, M. R., Opalka, B., and Moritz, T. (2005). In vitro dendritic cell generation and lymphocyte subsets in myeloma patients: influence of thalidomide and high-dose chemotherapy treatment. *Cancer Immunol Immunother* 54, 506-512.
- Schwartzentruber, D. J. (2001). Guidelines for the safe administration of high-dose interleukin-2. *J Immunother* 24, 287-293.

- 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.
- Shaif-Muthana, M., McIntyre, C., Sisley, K., Rennie, I., and Murray, A. (2000). Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells. *Cancer Res* 60, 6441-6447.
- Shedlock, D. J., and Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.
- Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M., and Rock, K. L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155-165.
- Sherman, M. L., Datta, R., Hallahan, D. E., Weichselbaum, R. R., and Kufe, D. W. (1991). Regulation of tumor necrosis factor gene expression by ionizing radiation in human myeloid leukemia cells and peripheral blood monocytes. *J Clin Invest* 87, 1794-1797.
- Shevach, E. M. (2002). CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389-400.
- Shi, Y., Evans, J. E., and Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516-521.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Skoberne, M., Beignon, A. S., and Bhardwaj, N. (2004). Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol Med* 10, 251-257.
- Slansky, J. E., Rattis, F. M., Boyd, L. F., Fahmy, T., Jaffee, E. M., Schneck, J. P., Margulies, D. H., and Pardoll, D. M. (2000). Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex. *Immunity* 13, 529-538.
- Small, E. J., Schellhammer, P. F., Higano, C. S., Redfern, C. H., Nemunaitis, J. J., Valone, F. H., Verjee, S. S., Jones, L. A., and Hershberg, R. M. (2006). Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 24, 3089-3094.
- Smith, M., Barnett, M., Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C., and Kern, W. (2004). Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 50, 197-222.
- Somersan, S., Larsson, M., Fonteneau, J. F., Basu, S., Srivastava, P., and Bhardwaj, N. (2001). Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 167, 4844-4852.
- Sozzani, S., Sallusto, F., Luini, W., Zhou, D., Piemonti, L., Allavena, P., Van Damme, J., Valitutti, S., Lanzavecchia, A., and Mantovani, A. (1995). Migration of dendritic cells in

response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol* 155, 3292-3295.

Spisek, R., Bougras, G., Ebstein, F., Masse, D., Meflah, K., McIlroy, D., and Gregoire, M. (2003). Transient exposure of dendritic cells to maturation stimuli is sufficient to induce complete phenotypic maturation while preserving their capacity to respond to subsequent restimulation. *Cancer Immunol Immunother* 52, 445-454.

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.

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

Srivastava, P. (2002). Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 20, 395-425.

Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93, 1634-1642.

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

Stift, A., Friedl, J., Dubsky, P., Bachleitner-Hofmann, T., Schueller, G., Zontsich, T., Benkoe, T., Radelbauer, K., Brostjan, C., Jakesz, R., and Gnant, M. (2003). Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J Clin Oncol* 21, 135-142.

Stock, P., Akbari, O., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2005). Respiratory tolerance is inhibited by the administration of corticosteroids. *J Immunol* 175, 7380-7387.

Strobl, H., Bello-Fernandez, C., Riedl, E., Pickl, W. F., Majdic, O., Lyman, S. D., and Knapp, W. (1997). flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood* 90, 1425-1434.

Stuart, L. M., Lucas, M., Simpson, C., Lamb, J., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2002). Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* 168, 1627-1635.

Stuge, T. B., Holmes, S. P., Saharan, S., Tuettenberg, A., Roederer, M., Weber, J. S., and Lee, P. P. (2004). Diversity and recognition efficiency of T cell responses to cancer. *PLoS Med* 1, e28.

Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2003). Immunological and clinical responses in metastatic

renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 63, 2127-2133.

Subklewe, M., Paludan, C., Tsang, M. L., Mahnke, K., Steinman, R. M., and Munz, C. (2001). Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8(+) killer T cells. *J Exp Med* 193, 405-411.

Sun, J. C., and Bevan, M. J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342.

Syme, R. M., Duggan, P., Stewart, D., and Gluck, S. (2001). Generation of dendritic cells ex vivo: differences in steady state versus mobilized blood from patients with breast cancer, with lymphoma, and from normal donors. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 621-630.

Takayama, T., Sekine, T., Makuuchi, M., Yamasaki, S., Kosuge, T., Yamamoto, J., Shimada, K., Sakamoto, M., Hirohashi, S., Ohashi, Y., and Kakizoe, T. (2000). Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 356, 802-807.

Tanaka, H., Demeure, C. E., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (2000). Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med* 192, 405-412.

Tatsumi, T., Takehara, T., Kanto, T., Miyagi, T., Kuzushita, N., Sugimoto, Y., Jinushi, M., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M., and Hayashi, N. (2001). Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 61, 7563-7567.

Thomas, M. B., and Zhu, A. X. (2005). Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol* 23, 2892-2899.

Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., *et al.* (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 190, 1669-1678.

Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R. E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., *et al.* (2005). Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123, 157-170.

Trakatelli, M., Tounouz, M., Blocklet, D., Dodoo, Y., Gordower, L., Laporte, M., Vereecken, P., Sales, F., Mortier, L., Mazouz, N., *et al.* (2006). A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces CD8+ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 55, 469-474.

Trefzer, U., Herberth, G., Wohlan, K., Milling, A., Thiemann, M., Sharav, T., Sparbier, K., Sterry, W., and Walden, P. (2005). Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment

of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. *Vaccine* 23, 2367-2373.

Trefzer, U., Herberth, G., Wohlan, K., Milling, A., Thiemann, M., Sherev, T., Sparbier, K., Sterry, W., and Walden, P. (2004). Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients. *Int J Cancer* 110, 730-740.

Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R. A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19, 641-644.

Trombetta, E. S., and Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23, 975-1028.

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.

Turville, S. G., Cameron, P. U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R. W., and Cunningham, A. L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 3, 975-983.

Tuting, T., Wilson, C. C., Martin, D. M., Kasamon, Y. L., Rowles, J., Ma, D. I., Slingsluff, C. L., Jr., Wagner, S. N., van der Bruggen, P., Baar, J., *et al.* (1998). Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN- α . *J Immunol* 160, 1139-1147.

Ugurel, S., Rappl, G., Tilgen, W., and Reinhold, U. (2001). Increased soluble CD95 (sFas/CD95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 7, 1282-1286.

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

Uronen-Hansson, H., Steeghs, L., Allen, J., Dixon, G. L., Osman, M., van der Ley, P., Wong, S. Y., Callard, R., and Klein, N. (2004). Human dendritic cell activation by *Neisseria meningitidis*: phagocytosis depends on expression of lipooligosaccharide (LOS) by the bacteria and is required for optimal cytokine production. *Cell Microbiol* 6, 625-637.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269-1274.

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71-81.

- van den Broeke, L. T., Daschbach, E., Thomas, E. K., Andringa, G., and Berzofsky, J. A. (2003). Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. *J Immunol* 171, 5842-5852.
- 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 Stipdonk, M. J., Hardenberg, G., Bijker, M. S., Lemmens, E. E., Droin, N. M., Green, D. R., and Schoenberger, S. P. (2003). Dynamic programming of CD8⁺ T lymphocyte responses. *Nat Immunol* 4, 361-365.
- Vegh, Z., Kew, R. R., Gruber, B. L., and Ghebrehiwet, B. (2006). Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR. *Mol Immunol* 43, 1402-1407.
- Veran, J., Mohty, M., Gaugler, B., Chiavaroli, C., and Olive, D. (2004). OM-197-MP-AC adjuvant properties: the in vitro maturation of normal and leukemic dendritic cells in a serum-free culture model. *Immunobiology* 209, 67-77.
- Vignard, V., Lemercier, B., Lim, A., Pandolfino, M. C., Guilloux, Y., Khammari, A., Rabu, C., Echasserieu, K., Lang, F., Gougeon, M. L., *et al.* (2005). Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J Immunol* 175, 4797-4805.
- Viguier, M., Lemaitre, F., Verola, O., Cho, M. S., Gorochov, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P., and Ferradini, L. (2004). Foxp3 expressing CD4⁺CD25^(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173, 1444-1453.
- Villadangos, J. A., and Heath, W. R. (2005). Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin Immunol* 17, 262-272.
- Vincent, M. S., Gumperz, J. E., and Brenner, M. B. (2003). Understanding the function of CD1-restricted T cells. *Nat Immunol* 4, 517-523.
- Vissers, J. L., Hartgers, F. C., Lindhout, E., Teunissen, M. B., Figdor, C. G., and Adema, G. J. (2001). Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 69, 785-793.
- Vollmer, C. M., Jr., Eilber, F. C., Butterfield, L. H., Ribas, A., Dissette, V. B., Koh, A., Montejo, L. D., Lee, M. C., Andrews, K. J., McBride, W. H., *et al.* (1999). Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 59, 3064-3067.
- von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6, 338-344.
- Waldmann, T. A., Dubois, S., and Tagaya, Y. (2001). Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 14, 105-110.

- 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, R. F., and Wang, H. Y. (2002). Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat Biotechnol* 20, 149-154.
- Wang, X., Zheng, J., Liu, J., Yao, J., He, Y., Li, X., Yu, J., Yang, J., Liu, Z., and Huang, S. (2005). Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol* 75, 468-476.
- Ward, S., Casey, D., Labarthe, M. C., Whelan, M., Dalglish, A., Pandha, H., and Todryk, S. (2002). Immunotherapeutic potential of whole tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 51, 351-357.
- Watanabe, S., Kagamu, H., Yoshizawa, H., Fujita, N., Tanaka, H., Tanaka, J., and Gejyo, F. (2003). The duration of signaling through CD40 directs biological ability of dendritic cells to induce antitumor immunity. *J Immunol* 171, 5828-5836.
- Wei, Y., Sticca, R. P., Holmes, L. M., Burgin, K. E., Li, J., Williamson, J., Evans, L., Smith, S. J., Stephenson, J. J., and Wagner, T. E. (2006). Dendritoma vaccination combined with low dose interleukin-2 in metastatic melanoma patients induced immunological and clinical responses. *Int J Oncol* 28, 585-593.
- Wendelbo, O., Nesthus, I., Sjo, M., Paulsen, K., Ernst, P., and Bruserud, O. (2004). Functional characterization of T lymphocytes derived from patients with acute myelogenous leukemia and chemotherapy-induced leukopenia. *Cancer Immunol Immunother* 53, 740-747.
- Wierecky, J., Muller, M. R., Wirths, S., Halder-Oehler, E., Dorfel, D., Schmidt, S. M., Hantschel, M., Brugger, W., Schroder, S., Horger, M. S., *et al.* (2006). Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res* 66, 5910-5918.
- Wiethe, C., Dittmar, K., Doan, T., Lindenmaier, W., and Tindle, R. (2003). Provision of 4-1BB ligand enhances effector and memory CTL responses generated by immunization with dendritic cells expressing a human tumor-associated antigen. *J Immunol* 170, 2912-2922.
- Wilkin, F., Duhant, X., Bruyns, C., Suarez-Huerta, N., Boeynaems, J. M., and Robaye, B. (2001). The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 166, 7172-7177.
- Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R., and June, C. H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61, 4766-4772.
- Wu, A. M., and Senter, P. D. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 23, 1137-1146.

- Xia, D., Zheng, S., Zhang, W., He, L., Wang, Q., Pan, J., Zhang, L., Wang, J., and Cao, X. (2003). Effective induction of therapeutic antitumor immunity by dendritic cells coexpressing interleukin-18 and tumor antigen. *J Mol Med* 81, 585-596.
- Yang, D., Chen, Q., Chertov, O., and Oppenheim, J. J. (2000). Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 68, 9-14.
- Yang, Y., Huang, C. T., Huang, X., and Pardoll, D. M. (2004). Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol* 5, 508-515.
- Yannelli, J. R., and Wroblewski, J. M. (2004). On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine* 23, 97-113.
- Yee, C., Thompson, J. A., Byrd, D., Riddell, S. R., Roche, P., Celis, E., and Greenberg, P. D. (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16168-16173.
- Yi, Q., Desikan, R., Barlogie, B., and Munshi, N. (2002). Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 117, 297-305.
- Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Nishiwaki, T., Kitabatake, M., Ueha, S., Narumi, S., Morikawa, S., Ezaki, T., Lu, B., *et al.* (2004). Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 16, 915-928.
- Yu, J. S., Liu, G., Ying, H., Yong, W. H., Black, K. L., and Wheeler, C. J. (2004). Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 64, 4973-4979.
- Zhao, X., Deak, E., Soderberg, K., Linehan, M., Spezzano, D., Zhu, J., Knipe, D. M., and Iwasaki, A. (2003). Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *J Exp Med* 197, 153-162.
- Zheng, C., Pisa, P., Stromberg, O., Blennow, E., and Hansson, M. (2000). Generation of dendritic cells from peripheral blood of patients at different stages of chronic myeloid leukemia. *Med Oncol* 17, 270-278.
- Zhu, X., Meng, G., Dickinson, B. L., Li, X., Mizoguchi, E., Miao, L., Wang, Y., Robert, C., Wu, B., Smith, P. D., *et al.* (2001). MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* 166, 3266-3276.
- Zinkernagel, R. M. (2003). On natural and artificial vaccinations. *Annu Rev Immunol* 21, 515-546.
- Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5, 263-274.

Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6, 295-307.

Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselin, I., Gordon, A., *et al.* (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7, 1339-1346.

Production de cellules dendritiques pour une immunothérapie anti-tumorale

Résumé:

L'identification d'antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T permet d'envisager l'immunothérapie des cancers. Les cellules dendritiques (DC), capables de présenter les antigènes et d'initier des réponses immunes, sont aujourd'hui largement utilisées dans les approches d'immunothérapie active. Les premiers essais chez l'homme montrent néanmoins la nécessité d'améliorer la méthodologie de production *ex vivo* des DC. Une raison de l'efficacité relative des vaccinations consiste dans la variabilité d'obtention des populations de DC, consécutive aux conditions de génération. Ainsi, une connaissance approfondie de la biologie des DC, associée à leur modalité de production est devenue primordiale. Ce travail a pour objectif de développer les conditions de culture favorables à l'obtention des DC et à en déterminer les conséquences sur leur activation. Il est à l'origine de deux protocoles cliniques d'immunothérapie dans la leucémie aiguë myéloblastique et le carcinome hépatocellulaire.

Mots clés: cellules dendritiques, immunothérapie, leucémie aigue myéloblastique, carcinome hépatocellulaire.

Dendritic cell production for antitumoral immunotherapy

Abstract:

Identification of tumour antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes enables the development of cancer immunotherapy. Dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells that elicit T-cell responses. They are nowadays largely used in active immunotherapy strategy. However, first clinical trials highlight the need to improve *ex vivo* DC generation. Large DC population variability can be observed according to production mode. Thus, DC biology and production mode must be thoroughly understood. The aim of this study is to elaborate favourable culture conditions for DC generation and to determine the impact on DC activation. Two clinical vaccination protocols in acute myeloid leukaemia and hepatocellular carcinoma were developed from this work.

Key words: denritic cells, immunotherapy, acute myeloid leukaemia, hepatocellular carcinoma.