

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTÉ

N° attribué par la bibliothèque

Année 2014

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Evaluation du potentiel thérapeutique
de la radioimmunothérapie alpha
en association avec le transfert adoptif
de lymphocytes T spécifiques de tumeur

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie
Spécialité : Immunologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Jérémie MÉNAGER

Le 23 septembre 2014, devant le jury ci-dessous

Président : **Pr. Françoise KRAEBER-BODÉRÉ.** PU-PH, Université de Nantes
Rapporteurs : **Dr. Philippe BOUSSO.** Directeur de recherche, U668 Institut Pasteur, Paris
Dr. Jean-Pierre POUGET. Chargé de recherche, U896 IRCM, Montpellier
Examineur : **Dr. Antoine TESNIÈRE.** MCU-PH, Université Paris Descartes, Paris

Directeur de thèse : Pr. Yannick GUILLOUX. PU, Université de Nantes

Co-directeur de thèse : Dr. Joëlle GASCHET. MCU, Université de Nantes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Docteur Philippe Bousso et Monsieur le Docteur Jean-Pierre Pouget pour m'avoir fait le grand honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse et pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit.

Je souhaite exprimer ma gratitude à Madame le Professeur Françoise Kraeber-Bodéré et Monsieur le Docteur Antoine Tesnière pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je remercie Madame le Professeur Françoise Kraeber-Bodéré, Monsieur le Docteur Jacques Barbet et Monsieur le Professeur Michel Chérel pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe 13 « Recherche en Oncologie Nucléaire », Inserm UMR 892 CNRS UMR 6299 du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, dans laquelle j'ai pu avoir le privilège d'effectuer ma thèse.

Je remercie Monsieur le Docteur Franck Halary et Monsieur le Docteur Antoine Tesnière pour avoir participé à mon jury de comité de thèse durant ces trois années.

Je souhaite tout particulièrement remercier mes encadrants de thèse,

Madame le Docteur Joëlle Gaschet qui a co-encadré ce travail de thèse durant ces trois ans. Merci de m'avoir intégré dans l'équipe, fait confiance et soutenu tout au long de ce projet de thèse. Joëlle, merci pour ton implication tant scientifique que technique et ta disponibilité à mon égard, tu as toujours pris le temps de m'écouter et d'échanger à propos de mes idées y compris dans les moments plus difficiles (pas évident la mise au point de cette 5T33-OVA!). Le petit te remercie pour tout.

Monsieur le Professeur Yannick Guilloux qui a encadré mon travail de recherche scientifique depuis le début, mes deux années de Master jusqu'à ces trois années de thèse. Yannick, merci de m'avoir accordé votre confiance, en acceptant de m'encadrer tout au long de ces années et en m'accordant l'autonomie à laquelle j'aspirais. Vous m'avez toujours soutenu et convaincu d'aller au bout de mes idées. Mes sincères remerciements pour tout ce que vous m'avez apporté, tant sur le plan personnel que professionnel. Malgré mon caractère,

parfois difficile, vous avez toujours su trouver les mots justes pour me recadrer et me redonner confiance dans les moments moins évidents. Je vous dois beaucoup.

Joëlle, Yannick que vous puissiez trouver ici le témoignage de ma plus sincère reconnaissance.

A l'issue de la rédaction de ce travail de recherche, je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur, l'investissement et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate du « thésard ».

Je tiens donc à remercier :

Catherine Maurel, pour ton savoir scientifique et tes compétences en matière d'expérimentation animale à laquelle je ne connaissais rien. Mais surtout merci pour ces discussions, sérieuses ou non, que nous avons pu partager. Tu m'as toujours prêté une oreille attentive. Merci pour ta gentillesse, ton aide et ton soutien.

Sébastien Gouard, la mémoire du labo, pour ton aide, ta disponibilité sans faille, ton professionnalisme, ton œil critique, ton partage de tes compétences scientifiques et techniques de la radioactivité à la culture cellulaire. Sans toi, ce projet n'aurait pu être mené à bien. Je désirais te remercier, plus personnellement, pour m'avoir communiqué ta passion du cyclisme ainsi que les échanges sportifs (3 tours de France, 1 olympiade d'hiver, 1 olympiade d'été,...).

Jean-Baptiste Gorin, compagnon de thèse, pour nos échanges scientifiques, ta bonne humeur, ton amitié, ces instants de folie à Versailles, à la retraite scientifique (chambre 208), le ski et Prague. J'espère que tu trouveras le post-doc dont tu rêves et que nous pourrons à nouveau travailler ensemble.

Michel Chérel, big boss, pour t'être toujours intéressé à mon travail malgré toutes tes obligations et ton emploi du temps surchargé. Merci pour toutes ces fructueuses discussions scientifiques et tes petites histoires si joliment racontées (les fuites, le zoo, barracuda F.M,...)

Cédric Louvet, pour ton apport technique, scientifique d'immunologiste à ce travail et le modèle murin OT-I.

Tous les membres de l'équipe 13 (actuels et anciens) et plus particulièrement Patricia, Maxime, Maya, Etienne, Laetitia, Faustine, Holisoa, François, Alain, Marie, Aurore, Aurélia, Mickaël, Jeff G, Nolwenn, Nicolas...

Marie-Hélène, Stéphanie et Annie pour votre bonne humeur et pour vous être si bien occupées de moi au laboratoire quand j'en avais besoin.

Toute l'équipe de l'unité INSERM du CRCNA de l'animalerie (Sandrine), de la plateforme cytométrie (Juliette), de la plateforme imagerie (Steven et Philippe), et du plateau de radioactivité (Agnès, Anne et Sophie).

Tous les membres de l'unité INSERM du CRCNA aussi bien le personnel technique que les ingénieurs, étudiants, post-doc, chercheur... (Virginie, Laetitia, Romain, Kamel, Jeff F, Francine, Nathalie, Nadine...) avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Je voudrais également exprimer mon amitié,

A Martin, Clara, Edouard et Emilie, j'ai toujours pu compter votre amitié sans faille.

A Juliette, Anne et Guillaume pour votre soutien de tous les instants. Tout simplement merci d'être là pour moi et de m'avoir supporté tout ce temps!

A Iza, Quentin, les Jbs, Romain P, Etienne, Cassie-Marie, Kristell... pour cette aventure de l'association ADN bio-santé.

Aux Wakos, je ne vous oublierai pas!

A tous mes amis.

Enfin, mes pensées vont tout naturellement à,

Ma grand-mère Marguerite, si loin mais si importante pour moi.

Mon père, Edouard, pour toutes ces valeurs que tu m'as inculquées et ce que tu représentes pour moi. J'espère en être à la hauteur.

Ma mère, mon frère, ma famille

« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme » (Rabelais)

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	5
Liste des abréviations et des symboles	9
Table des illustrations	12
Préambule	15
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	19
Chapitre I : La réponse immunitaire anti-tumorale.....	20
I.1 Introduction.....	20
I.2 Concept d'immunosurveillance du cancer	21
I.3 Les acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale.....	25
I.3.1 L'immunité innée	25
A) Les macrophages associés aux tumeurs de type M1 (TAM-M1)	25
B) les cellules Natural Killer (NK) :	26
C) Les cellules dendritiques (DC).....	28
I.3.2 L'immunité adaptative	32
A) Les antigènes de tumeurs (TAA)	32
B) Mise en place de la réponse immunitaire T.....	34
C) Les lymphocytes T CD8 ⁺ (LT CD8 ⁺).....	36
D) Les lymphocytes T CD4 ⁺ (LT CD4 ⁺)	37
I.3.3 Les mécanismes d'échappement tumoral.....	39
A) Mécanismes intrinsèques aux cellules tumorales.....	39
B) Mécanismes extrinsèques aux cellules tumorales	43
I.4 Les stratégies d'immunothérapie anti-tumorale.....	46
I.4.1 Les stratégies d'immunothérapie active.....	46
A) L'immunothérapie active aspécifique : l'injection de cytokines	46
B) L'immunothérapie active spécifique : Vaccination tumorale	48
I.4.2 Les stratégies d'immunothérapie passive :	49

A) Les anticorps	49
B) Le transfert adoptif de lymphocytes T (ACT).....	51
C) Le transfert adoptif de populations de cellules T modifiées génétiquement pour exprimer les CAR (chimeric antigen receptors).....	52
Chapitre II : La radioimmunothérapie.....	57
II.1 Généralités	57
II.2 Principe de la radioimmunothérapie.....	58
II.2.1 La cible tumorale	60
A) Nature de la cible tumorale	60
B) Nature de l'antigène tumoral.....	63
II.2.2 le vecteur immunologique : l'anticorps	64
A) Structure et caractéristiques :	64
B) Les anticorps utilisables en thérapie.....	68
C) Les anticorps en RIT	71
II.2.3 Le choix du radionucléide.....	73
A) Emetteurs β^- et RIT β^- :	73
B) Les émetteurs d'électrons Auger et RIT Auger :	78
II.3 La radioimmunothérapie alpha	80
II.3.1 Radiobiologie des particules α :	81
II.3.2 Les émetteurs α utilisés en thérapie, intérêt du bismuth-213.....	84
II.3.3 Etudes précliniques de la RIT α au bismuth-213 :	86
II.3.4 Etudes cliniques de la RIT α au bismuth-213 :	88
II.3.5 Essais cliniques de la RIT α utilisant d'autres émetteurs α	89
Chapitre III : Rayonnements ionisants et immunité anti-tumorale.....	90
III.1 L'effet abscopal, conséquence immunologique des rayonnements ionisants	91
III.2 Effets immunologiques des rayonnements ionisants	93
III.2.1 Effets immunosuppresseurs.....	93
III.2.2 Effets des rayonnements ionisants sur le système immunitaire	93
A) Le relargage d'antigènes associés aux tumeurs (TAA)	93
B) La mort cellulaire immunogène	94
C) Les cytokines.....	95
D) Les vaisseaux	95
III.2.3 Effets des rayonnements ionisants sur l'immunogénicité tumorale	96

III.3 Association thérapeutique : rayonnements ionisants et immunothérapies anti-tumorale 99

A) Combinaison de la radiothérapie et du transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques (ACT) 101

B) Combinaison de la radioimmunothérapie et de l'immunothérapie .. 102

III.3.2 Evidences cliniques de la synergie suite à l'association de la radiothérapie et de l'immunothérapie..... 102

A) Combinaison de la radiothérapie et du transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques 104

B) Combinaison de la radioimmunothérapie et de l'immunothérapie .. 104

Chapitre IV : Le myélome multiple : modèle d'association thérapeutique pour la RIT α et l'immunothérapie anti-tumorale105

IV.1 Epidémiologie et caractéristiques cliniques..... 105

IV.2 Caractéristiques biologiques 106

IV.2.1 Rôle du microenvironnement hématopoïétique dans la progression du myélome multiple 106

IV.2.2 Système immunitaire et myélome multiple..... 110

IV.3 Traitements du myélome multiple..... 112

IV.3.1 Les traitements actuels 112

IV.3.2 Immunothérapies par transfert adoptif de lymphocytes T et myélome multiple..... 114

IV.3.3 RIT α et myélome multiple 116

IV.3.4 Modèle de myélome multiple murin syngénique et immunocompétent: le modèle 5T33MM..... 117

PROJET DE RECHERCHE..... 118

Objectifs du travail de thèse.....119

RESULTATS 121

I- Partie I : Rayonnements α et système immunitaire122

Article I : Anti-tumour immunity induced after alpha irradiation 124

II- Partie II : Association de la RIT α et de l'immunothérapie135

A) Article II : Combining α -RIT and adoptive T cell therapy to treat Multiple Myeloma 137

B) Résultats complémentaires	163
1- Distribution des LT CD8 ⁺ OT-I	163
2- Etude du microenvironnement tumoral.....	166
C) Article III : Adoptive T cell therapy potentiates efficacy of alpha-radioimmunotherapy	170
CONCLUSION GENERALE PERSPECTIVES	190
I- Conséquences immunologiques de l'irradiation des tumeurs par les particules α.....	191
II- Association de la RITα et de l'ACT dans le traitement du MM	195
ANNEXES.....	200
A) Article IV : Measles Virus Vaccine–Infected Tumor Cells Induce Tumor Antigen Cross-Presentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells	201
B) Article V : Cross-Presentation of Synthetic Long Peptides by Human Dendritic Cells: A Process Dependent on ERAD Component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1	214
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	228
RESUME ET MOTS CLES	269

Liste des abréviations et des symboles

AcM	Anticorps Monoclonal
ACT	Transfert Adoptif de lymphocytes T
ADCC	Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps
AICD	<i>Activation Induced Cell Death</i>
ARG	Arginase
Bq	Symbole du Becquerel
CAR	<i>Chimeric Antigen Recepteur</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	Cytotoxicité Dépendante du Complément
CDR	<i>Complementarity Determining Region</i>
CEA	Antigène Carcino-Embryonnaire
Ci	Symbole du Curie
CLR	Récepteur de type Lectine C
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d’Antigène
CR	Réponse complète
CRT	Calréticuline
CT	<i>Computed Tomography</i>
CTL	Lymphocyte T Cytotoxique
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4</i>
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
DC	Cellule Dendritique
DTPA	<i>Diethylene Tetraamino Pentacetic Acid</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	Fragment cristallisable
FDA	<i>Food and Drug Association</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Monocyte - Colony Stimulating Factor</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>

HMGB-1	<i>High Mobility Group Protein B1</i>
HSC	Cellule Souche Hématopoïétique
HSP	Protéine de Choc Thermique
i.p	intrapéritonéale
i.v	intraveineuse
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
iDC	Cellule Dendritique immature
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
KDa	kilo Dalton
keV	kilo électron-Volt
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
LTreg	Lymphocyte T régulateur
MALT	Tissus Lymphoïdes Associés aux Muqueuses
MCP	Protéine de Chimiotactisme des Monocytes
MCSP	<i>Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan</i>
mDC	Cellule Dendritique mature
MDSC	<i>Myeloid derived suppressor cell</i>
MM	Myélome Multiple
NK	<i>Natural Killer cells</i>
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2, member D</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
NO	Monoxyde d'azote
NOS	<i>Oxyde Nitrique Synthase</i>
OR	Réponse Objective
PAP	phosphatase acide prostatique
PD1	<i>Programmed Death 1</i>

PFA	Paraformaldéhyde
PGE2	Prostaglandine E2
PR	Réponse partielle
PSA	<i>prostate specific antigen</i>
PSCA	<i>prostate stem cell antigen</i>
RIT	Radioimmunothérapie
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Radiothérapie
s.c	sous cutanée
scFv	<i>single chain variable Fragment</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-Derived Factor-1</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
TAA	Antigène Associé aux Tumeurs
TAM	Macrophage Associé aux Tumeurs
TBI	Irradiation Corporelle Totale
TCR	<i>T-cell Receptor</i>
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TGF	Transforming Growth Factor
T_H	<i>T helper</i> ou T auxiliaire
TIL	Lymphocyte Infiltrant la Tumeur
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Table des illustrations

FIGURES

1. Introduction bibliographique

Figure 1 : La règle des trois E (Dunn et al., 2002).....	21
Figure 2 : Immunité innée (non spécifique) et adaptative (spécifique) (Dranoff, 2004)	23
Figure 3 : Etape de la mise en place de la réponse immunitaire anti-tumorale (Dunn et al., 2002).....	24
Figure 4 : Les fonctions biologiques des cellules NK (Vivier et al., 2011).....	27
Figure 5 : Maturation des cellules dendritiques (Hackstein and Thomson, 2004).....	29
Figure 6 : Interactions entre cellules NK et cellules dendritiques (Moretta, 2002)	30
Figure 7 : La synapse immunologique (Tougeron et al., 2013).....	34
Figure 8 : La réponse anti-tumorale dépendante des LT (Tougeron et al., 2013).....	36
Figure 9 : Cytokines produites par les populations lymphocytaires T_H1 et T_H2 (Abbas et al., 1996).....	38
Figure 10 : Fonctions effectrices des sous-populations de lymphocytes T_H1 et T_H2 (Abbas et al., 1996).....	38
Figure 11 : Mécanismes moléculaires responsables de la déficience d'expression de molécules du CMH-I (Khong and Restifo, 2002).....	40
Figure 12 : Concept d'immunodominance (Schreiber et al., 2002).....	41
Figure 13 : Représentation schématique des CAR (Maus et al., 2014)	53
Figure 14 : Les approches thérapeutiques d'immunothérapie des cancers. (Maus et al., 2014)	56
Figure 15 : Schéma de la RIT réalisée avec un anticorps radiomarqué ciblant la cellule tumorale.....	59
Figure 16 : Représentation schématique des différents facteurs impliqués dans l'efficacité de la RIT (Stigbrand et al., 1996).....	59
Figure 17 : Vascolarisation tumorale (Brown and Giaccia, 1998).....	61
Figure 18 : Physiopathologie tumorale (Brown and Giaccia, 1998).....	61
Figure 19 : Représentation schématique de la structure des immunoglobulines (Immunologie, le cours de Janis Kuby)	64
Figure 20 : Représentation en 3 dimensions des régions CDR (Immunologie, le cours de Janis Kuby).....	65
Figure 21 : L'interaction entre un anticorps et un antigène dépend de quatre types de forces non covalentes (Immunologie, le cours de Janis Kuby).....	67
Figure 22 : Anticorps monoclonaux modifiés.....	69

Figure 23 : Survie des cellules de mammifères après une irradiation par des particules de haut ou bas TEL (Kassis and Adelstein, 2005).....	74
Figure 24 : Irradiation de cellules tumorales par un anticorps radiomarqué à un émetteur β^- illustrant le mécanisme de feux croisés.....	75
Figure 25 : Evolution du TEL en fonction de la distance parcourue par une particule α (Kassis, 2008).....	81
Figure 26 : Répartition spatiale des ionisations au sein d'une molécule d'ADN pour une particule α , une particule β et un émetteur d'électrons Auger (Kassis and Adelstein, 2005) ..	82
Figure 27 : Décroissance du bismuth-213 (Kitson et al., 2013).....	85
Figure 28 : Les rayonnements ionisants agissent comme des modificateurs du microenvironnement tumoral afin de permettre au système immunitaire d'être efficace (Demaria and Formenti, 2012).	98
Figure 29 : Le microenvironnement de la moelle osseuse (Ferrarini et al., 2013).	107
Figure 30 : Interactions entre les cellules de MM et le microenvironnement de la moelle osseuse (Ferrarini et al., 2013).	109

2. Résultats

Figure 31 : Schéma de l'association thérapeutique (5T33-OVA en s.c).....	136
Figure 32 : Influence des différentes thérapies sur la distribution des OT-I.....	164
Figure 33 : Influence des différentes thérapies sur la distribution des LT.....	168
Figure 34 : Influence des différentes thérapies sur la distribution des DC, NK et LB.	168
Figure 35 : Schéma de l'association thérapeutique (5T33-OVA en i.v).....	169
Figure 36 : L'association de la RIT α et de l'ACT d'OT-I augmente la survie des souris greffées avec la 5T33-OVA.	180
Figure 37 : La thérapie combinée induit une meilleure persistance des OT-I	181
Figure 38 : La thérapie associant la RIT α et l'ACT augmente le pourcentage d'OT-I et leur reconnaissance des cellules tumorales dans la rate et les ganglions lymphatiques.....	183
Figure 39 : Le rôle important de l'IL-1 α et de l'IL-2 dans l'efficacité thérapeutique suite à la thérapie combinée RIT α + ACT.....	184
Figure 40 : Augmentation de l'infiltrat de cellules immunitaires dans les ganglions lymphatiques suite à la RIT α +ACT	186

TABLEAUX

Tableau 1 : Cytokines approuvée par la FDA (Alatrash et al., 2013).....	47
Tableau 2 : Propriétés des différents types d'immunoglobulines.....	66
Tableau 3 : Propriétés des différentes sous classes d'IgG utilisées en thérapie (Immunologie, le cours de Janis Kuby)	69
Tableau 4 : Anticorps commercialisés utilisés en clinique (Kitson et al., 2013).....	70
Tableau 5 : Principaux émetteurs β^- utilisés en thérapie.....	76
Tableau 6 : Listes des anticorps radiomarqués avec des émetteurs β^- utilisés en essais cliniques (Kitson et al., 2013)	77
Tableau 7 : Principaux émetteurs d'électrons Auger utilisables en RIT	78
Tableau 8 : Emetteurs alpha potentiels pour une utilisation thérapeutique (Kitson et al., 2013)	84
Tableau 9 : Récapitulatif des essais précliniques utilisant le bismuth-213 chez la souris.....	87
Tableau 10 : Essais cliniques utilisant le bismuth-213 chez l'homme (Baidoo et al., 2013)..	88
Tableau 11 : Liste des essais cliniques avec l'actinium-225, l'astate-211 et le plomb-212 (Baidoo et al., 2013).....	89
Tableau 12 : Combinaisons de stratégies d'immunothérapie et de radiothérapie locale testées dans des modèles précliniques (Formenti and Demaria, 2013).	99

Préambule

Le terme général de cancer s'applique à un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme. On parle aussi de tumeurs malignes ou de néoplasmes. L'un des traits caractéristiques du cancer est la prolifération, le plus souvent rapide de cellules anormales qui, au-delà de leur délimitation habituelle, peuvent envahir des parties adjacentes de l'organisme, puis essaimer dans d'autres organes. On parle alors de métastases, celles-ci étant la cause majoritaire de décès par cancer.

La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale est un processus passant par plusieurs étapes. Il y a classiquement une évolution vers une lésion précancéreuse puis vers une tumeur maligne. Ces modifications proviennent de la combinaison de facteurs génétiques propres au sujet et d'agents extérieurs pouvant être classés en trois catégories : les cancérigènes physiques (rayonnements ionisants et ultraviolets), chimiques (amiante, composés du tabac, arsenic) et biologiques (virus, bactéries ou parasites).

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, à l'origine de 8,2 millions de décès en 2012. On estime que le nombre de cas de cancer par an devrait augmenter de 14 millions en 2012 à 22 millions au cours des deux prochaines décennies. Un homme sur deux et une femme sur trois sont concernés par le cancer. Les cancers les plus fréquents dans le monde étant ceux du poumon, de la prostate, du colon-rectum et de l'estomac chez l'homme ; chez la femme, ceux du sein, du colon-rectum, du col de l'utérus et du poumon (GLOBOCAN 2012, IARC, <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>).

Deux aspects, relatifs à la prise en charge et aux traitements du cancer, peuvent être distingués et se révèlent très complémentaires : le diagnostic et le traitement.

Le diagnostic permet dans un premier temps l'identification de la pathologie. Ce diagnostic comprend l'examen clinique, l'imagerie de la pathologie (échographie, scanner : CT, imagerie par résonance magnétique : IRM, tomographie d'émission monophotonique : SPECT) et, si cela s'avère réalisable, une biopsie de la tumeur (par chirurgie ou radiologie interventionnelle) dans le but d'établir les critères anatomo-pathologiques de la maladie. De nombreux progrès ont été faits dans ce domaine, en particulier en ce qui concerne l'imagerie plus précise et résolutive (la tomographie par émission de positon : TEP ou la combinaison de deux procédés : SPECT-CT, TEP-CT). Ainsi, dans un second temps, en fonction des symptômes, de l'état général du patient, du diagnostic, du bilan d'extension et des facteurs

biologiques (de pronostic, prédictifs de réponse aux traitements), la mise en œuvre du traitement le plus adapté en regard de la pathologie sera appliquée.

Les différents traitements de la pathologie cancéreuse actuellement utilisés sont classés en deux catégories : les traitements loco-régionaux (chirurgie ainsi que la majeure partie des radiothérapies) et les traitements généraux ou systémiques représentés par la chimiothérapie.

La chirurgie reste le traitement de référence des tumeurs solides. Les actes de chirurgie ont pour objectif l'ablation de la tumeur et de ses extensions (métastases) ainsi que celle des ganglions affectés visibles par imagerie. Ils comprennent également, par sécurité, l'ablation d'une partie de tissu sain les entourant. La chirurgie est utilisée dans environ 80 % des cas dans un but diagnostique, curatif, palliatif ou de réparation.

La radiothérapie utilise des radiations de haute énergie, afin de détruire les cellules cancéreuses. Les radiations utilisées sont des rayons X, des rayons gamma (γ) ou des particules ionisées (chargées). Elles sont souvent produites grâce à des accélérateurs de particules ou des sources radioactives. Les radiations endommagent principalement les composants de l'ADN des cellules cancéreuses, ce qui a pour effet de stopper la division cellulaire et de tuer la cellule. Il existe deux voies principales d'administration de la radiothérapie : la voie externe : les rayons sont émis en faisceau, à distance de la personne malade, et traversent la peau pour atteindre la tumeur ; la voie interne : les sources radioactives sont implantées directement à l'intérieur du corps (on désigne cette technique sous le nom de curiethérapie). Des produits radioactifs peuvent aussi être administrés par voie orale ou injectés (on parle alors de radiothérapie métabolique). Plus de la moitié des patients atteints d'un cancer sont traités par radiothérapie à une étape de leur parcours de soin.

La chimiothérapie consiste à utiliser des molécules cytotoxiques (alkylants, anti-métabolites, alcaloïdes végétaux, inhibiteurs de la topoisomérase) administrées par voie systémique dans un but curatif ou palliatif. Plus précisément, la chimiothérapie agit sur les cellules lorsqu'elles sont en train de se diviser. Ces molécules ont donc théoriquement la capacité de détruire toute cellule cancéreuse, quelle que soit sa localisation dans l'organisme, qu'elle ait été repérée ou non par un examen. Ces molécules peuvent être administrées seules ou plus fréquemment en association afin de combiner des molécules de chimiothérapie présentant des effets cellulaires différents. Mais, par principe, cette action destructrice s'exerce aussi sur les cellules qui, de façon normale, se renouvellent rapidement dans le corps : principalement, les cellules de la moelle osseuse, des cheveux, de la peau et de la muqueuse de la bouche. Ce phénomène

explique certains effets secondaires bien connus de la chimiothérapie, comme la chute des cheveux (ou alopécie) par exemple.

Dans la plupart des cas, et d'autant plus que la tumeur est disséminée, ces traitements sont associés soit en alternance soit en concomitance. L'objectif étant d'observer une coopération des différentes stratégies pour potentialiser la destruction tumorale.

En dépit des nombreux progrès réalisés, ces traitements restent trop souvent inefficaces. Malgré des rémissions cancéreuses avérées, la maladie peut resurgir faute d'avoir pu éliminer l'ensemble des cellules malades. La limite des protocoles actuels a ouvert la voie à l'exploration de nouvelles thérapies. Ces nouveaux traitements ont pour objectif de cibler sélectivement la tumeur tout en limitant les effets secondaires intrinsèques à la thérapie. Même si leur utilisation est encore limitée car elles font parties de récentes innovations issues de la recherche, elles sont la source de résultats de plus en plus encourageants.

Parmi ces nouvelles thérapies, il est possible de distinguer notamment **les hormonothérapies** visant à inhiber la production hormonale ou à empêcher les hormones d'atteindre leur cible, ce qui freine la multiplication des cellules cancéreuses des cancers dits « hormonaux dépendants ». **Les stratégies d'immunothérapie** ont pour but, quant à elles, de stimuler, de renforcer ou de rendre le système immunitaire du malade, plus réactif face aux cellules tumorales. L'idée est de mettre à profit les mécanismes immunitaires afin de lutter contre les cellules cancéreuses. Enfin, **les thérapies ciblées** sont en plein essor et désignent des nouveaux traitements qui, comme leur nom l'indique, consistent à « cibler » précisément certaines caractéristiques des cellules cancéreuses. Les progrès de la connaissance en biologie des tumeurs ont en effet permis d'identifier avec précision le rôle joué par un certain nombre de molécules dans le développement d'un cancer et de ses métastases.

Dans cette recherche constante d'innovation, une nouvelle voie de traitement est apparue. L'idée est d'utiliser les effets cytotoxiques des rayonnements ionisants associés à la spécificité de molécules immunologiques en particulier les anticorps; c'est-à-dire de **coupler immunothérapie et radiothérapie** pour un ciblage et une destruction des cellules cancéreuses. Cette approche vise à traiter les cellules tumorales avec une plus grande spécificité, quelque soit leur localisation dans l'organisme, en tentant de limiter l'atteinte des tissus sains, dans le but de potentialiser la destruction tumorale. Cette stratégie de radiothérapie a permis l'émergence de la **radioimmunothérapie (RIT) et notamment de la RIT α** .

Le travail présenté dans cette thèse s'articule autour de la réponse immunitaire anti-tumorale. Celui-ci a pour objectif d'évaluer, en plus du rôle des particules α sur l'induction d'une immunité anti-tumorale, le potentiel thérapeutique de l'association de deux thérapies anti-cancéreuses : la RIT α et une stratégie d'immunothérapie, le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de tumeur. Les résultats obtenus sont précédés d'une introduction bibliographique dans laquelle nous reviendrons, dans un premier chapitre, sur les acteurs du système immunitaire impliqués dans l'immunité anti-tumorale et les principales stratégies d'immunothérapie. Dans une deuxième partie, nous replacerons la RIT dans la prise en charge de la pathologie cancéreuse, les critères de choix puis les mécanismes d'action d'un radionucléide, les caractéristiques tumorales d'intérêt dans cette approche thérapeutique ainsi que les différentes utilisations en préclinique et en clinique. Le troisième chapitre s'intéressera aux interactions entre les rayonnements ionisants et le système immunitaire puis nous terminerons par une quatrième partie qui traitera de la pathologie tumorale sur laquelle sera testée l'association thérapeutique, en l'occurrence, le myélome multiple (MM).

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La réponse immunitaire anti-tumorale

I.1 Introduction

Les origines de l'immunologie seraient attribuées à Edward Jenner, qui posa les premières bases de cette science à la fin du XVIIIe siècle en découvrant que l'inoculation d'un virus de la vaccine induisait une protection contre la variole. Ce concept de vaccination fut élargi au XIXe siècle lorsque Louis Pasteur conçut un vaccin contre le choléra des poules et contre la rage. Pendant longtemps, le rôle du système immunitaire fut restreint à la protection de l'hôte contre les agressions extérieures des micro-organismes pathogènes, sans que soient pour autant connus les facteurs impliqués dans cette protection. C'est à la fin du XIXe siècle qu'émergèrent deux écoles distinctes qui proposèrent différents acteurs dans la réponse immunitaire (Silverstein, 2003). Le mouvement « cellulaire » revendiquait l'implication majoritaire d'une population phagocytaire, alors qu'un mouvement « humoral » basait l'immunité sur les anticorps. Durant la première moitié du XXe siècle, la théorie humorale prit l'ascendant sur les défenseurs d'une implication cellulaire. Au cours des années cinquante, les travaux de Medawar *et al.* sur l'implication d'une composante cellulaire dans le rejet de greffe allogénique renforcèrent le concept d'antigènes spécifiques de tumeur, et par-là même, celui d'immunosurveillance des tumeurs (Dunn et al., 2002). En effet, l'idée que le système immunitaire puisse stopper le développement d'un carcinome va nécessairement de pair avec la notion que des structures, spécifiquement présentes à la surface des cellules tumorales, puissent être reconnues par le système immunitaire. Sir Macfarlane Burnet et Lewis Thomas ont alors introduit les bases du concept d'immunosurveillance des tumeurs et émirent l'hypothèse que les lymphocytes jouaient le rôle de sentinelles dans la reconnaissance et l'élimination constante des cellules tumorales (Burnet, 1970).

I.2 Concept d'immunosurveillance du cancer

L'existence d'une surveillance immunitaire anti-tumorale étant acquise, il semblerait que le système immunitaire puisse participer à la sélection de variants tumoraux au cours du développement d'une tumeur. Ces variants seraient sélectionnés sur leur capacité à survivre dans un environnement immunologique intact, et ceci de manière plus efficace que dans le cas de présence de virus, bactéries ou parasites. De nombreuses études ont en effet pu mettre en évidence la sélection de variants tumoraux possédant une immunogénicité réduite à la suite d'implantations successives dans des hôtes immunocompétents, on qualifie ce phénomène d'« immunoediting » de la tumeur (Urban et al., 1982; Uyttenhove et al., 1980). **Le système immunitaire est donc à la fois impliqué dans la protection de l'hôte et dans la mise en place du foyer cancéreux, prévenant et œuvrant à la fois au développement de la tumeur.** Dunn GP *et al.* ont résumé les différents travaux menés sur ce sujet en construisant un modèle illustré dans la figure 1 (Dunn et al., 2002). La « mise en place immunitaire » du cancer peut être résumée par la règle dite des trois E : élimination, équilibre et échappement.

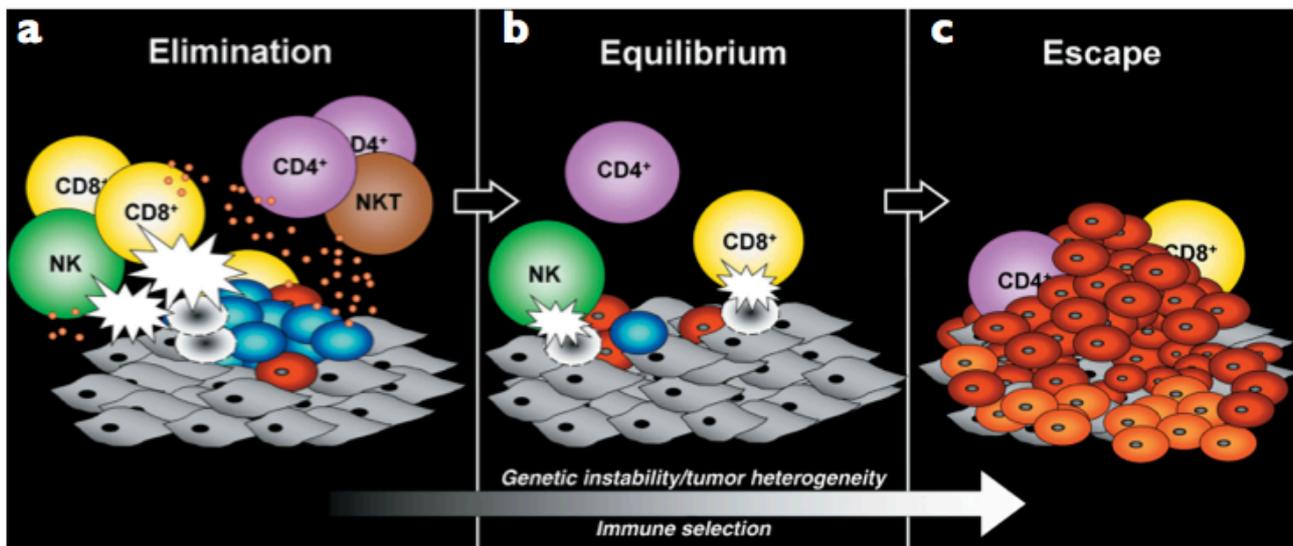


Figure 1 : La règle des trois E (Dunn et al., 2002)

(a) L'immunosurveillance entraîne l'élimination. (b) Phase d'équilibre au cours de laquelle le système immunitaire participe à la génération d'un clone de cellules tumorales résistant. (c) Prolifération incontrôlée du clone tumoral, échappant à la réponse immunitaire. Cellules tumorales (bleu) ; variants de cellules tumorales (rouge et orange) ; stroma (gris). Les populations lymphocytaires sont représentées par des couleurs distinctes. Les petits cercles oranges représentent les cytokines et les flashs blancs, l'activité cytotoxique des lymphocytes sur les cellules tumorales.

Au cours de la première phase dite d'élimination, le système immunitaire va permettre la destruction de la tumeur. Les différents acteurs du système immunitaire vont être recrutés au site tumoral afin de reconnaître et détruire la majorité des cellules tumorales.

Dans un second temps, une phase d'équilibre dynamique se met en place entre le système immunitaire et les variants tumoraux ayant survécu. Cette phase peut être vue comme une période de sélection darwinienne, au cours de laquelle vont intervenir de nombreuses et rapides mutations génétiques qui aboutiront au développement de clones résistants aux attaques du système immunitaire. Cette période, considérée comme étant la plus longue des trois, peut s'étaler sur plusieurs années.

Enfin, lors de la dernière phase d'échappement, le ou les variants tumoraux ayant acquis une insensibilité à la détection et/ou à l'élimination par le système immunitaire, débudent leur phase de croissance incontrôlée. Celle-ci aboutit alors au développement du cancer.

Le système immunitaire peut être schématiquement divisé en deux groupes composés d'éléments de la réponse dite **innée** (non spécifique) ou **adaptative** (spécifique) (figure 2). La réponse immunitaire innée regroupe des facteurs solubles comme les protéines du complément, et de nombreux effecteurs cellulaires, incluant les granulocytes, les cellules dendritiques (DC) et mastocytaires, les macrophages et les cellules Natural Killer (NK). Ils constituent la première ligne de défense de notre organisme contre les pathogènes (Dranoff, 2004).

Subséquemment, la réponse immunitaire adaptative, orchestrée par les cellules lymphocytaires de type T CD8⁺, T CD4⁺ et B se développe. Plus lente à se mettre en place, elle implique en effet la prolifération, l'activation et la différenciation de cellules lymphocytaires exprimant soit des immunoglobulines membranaires (les lymphocytes B), soit des récepteurs de cellules T $\alpha\beta$ (TCR) spécifiques pour des peptides présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH appelé HLA, Human Leucocyte Antigen, chez l'homme et H₂ chez la souris).

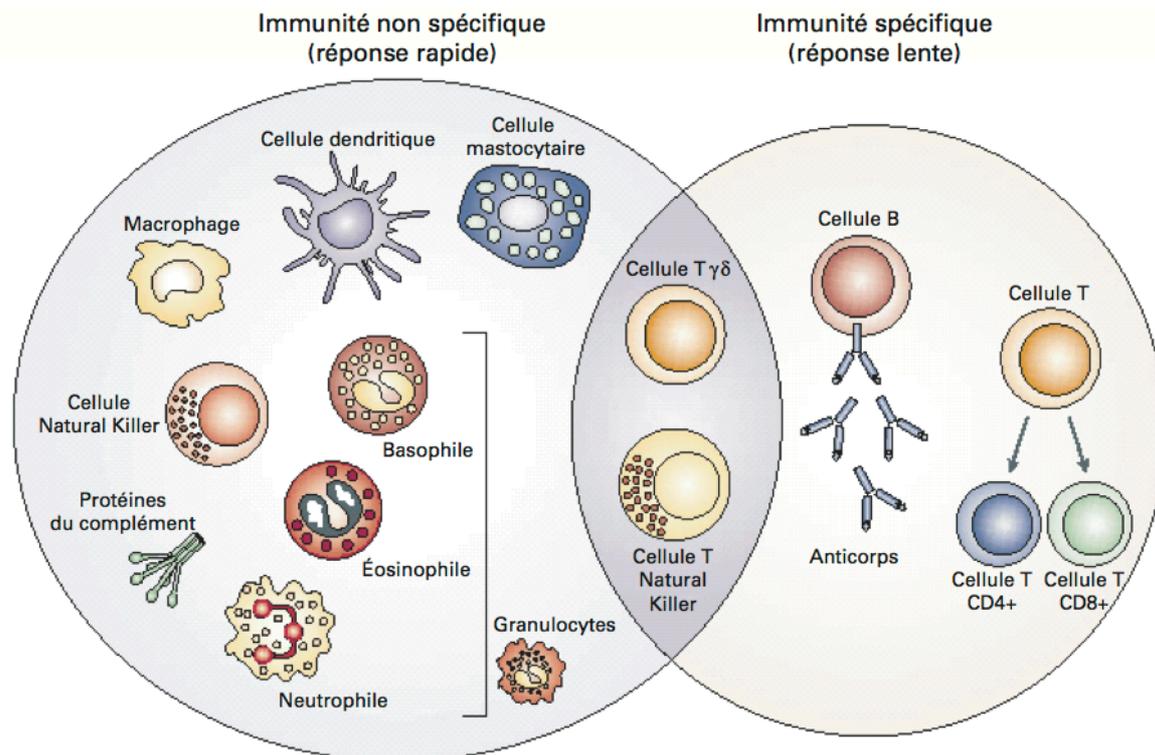


Figure 2 : Immunité innée (non spécifique) et adaptative (spécifique) (Dranoff, 2004)

La réponse immunitaire non spécifique est la première ligne de défense de notre organisme ; elle englobe des facteurs solubles comme les protéines du complément, et des composantes cellulaires incluant les cellules mastocytaires, les cellules dendritiques, les macrophages, les granulocytes et les cellules Natural Killer. La réponse spécifique, plus lente à se mettre en place, est caractérisée par sa spécificité antigénique et sa mémoire. Elle comprend les lymphocytes B, T CD4+ et T CD8+. Les cellules T $\gamma\delta$ et T Natural Killer peuvent être placées à l'interface entre réponse non spécifique et spécifique.

Enfin, les cellules T $\gamma\delta$ et T Natural Killer (NKT) sont des lymphocytes T (LT) cytotoxiques dont les fonctions sont à la frontière des réponses innée et adaptative. Par rapport aux LT $\alpha\beta$ « classiques », les LT $\gamma\delta$ possède un TCR $\gamma\delta$ non restreint par le CMH. Ils ne reconnaissent pas des épitopes classiques mais plutôt des épitopes conservés au sein des pathogènes. Les lymphocytes NKT représentent un groupe hétérogène de LT, leur TCR est quasi invariant. Ces cellules jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires et leur absence, ou dysfonction, est à l'origine de pathologies auto-immunes, inflammatoires ou tumorales (Dranoff, 2004).

Ces deux composantes, innée et adaptative, sont à la base la réponse immunitaire anti-tumorale (figure 3).

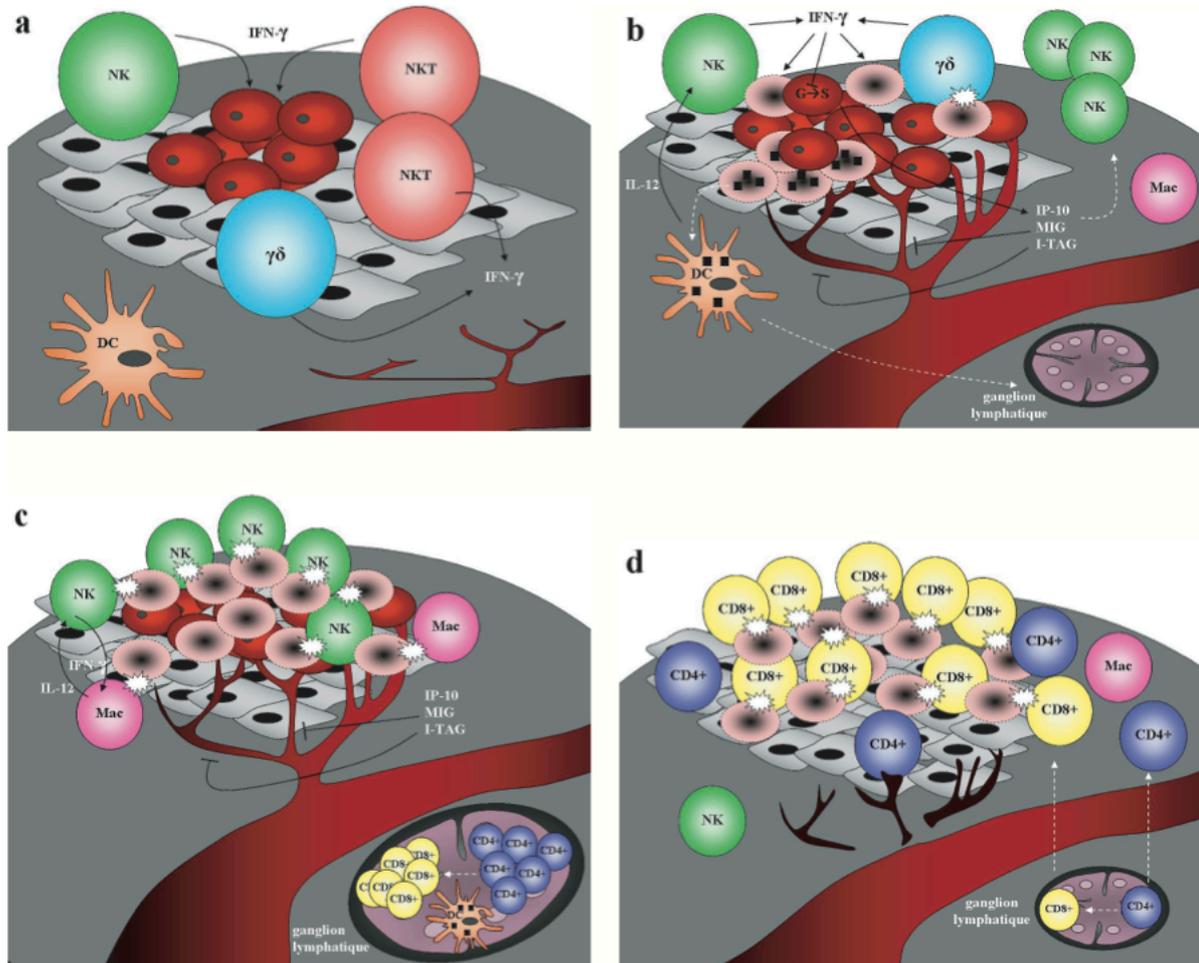


Figure 3 : Etape de la mise en place de la réponse immunitaire anti-tumorale (Dunn et al., 2002)

(a) L'initiation de la réponse immunitaire antitumorale se fait essentiellement via les acteurs de la réponse immunitaire innée. Les cellules NK, NKT et T $\gamma\delta$ reconnaissent les cellules tumorales et sécrètent notamment de l'IFN- γ . (b) Cette cytokine va tout d'abord induire la production de chimiokines (IP-10, MIG, I-TAC) qui vont bloquer la néo-angiogenèse tumorale et recruter les populations immunitaires au site inflammatoire (cellules NK, macrophages, cellules dendritiques). L'IFN- γ a également un effet antiprolifératif sur les cellules de la masse tumorale, et stimule l'activité cytotoxique des cellules NK et des macrophages. Les cellules tumorales détruites, vont être phagocytées par les cellules dendritiques qui vont ensuite migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques. (c) Alors que les cellules NK et les macrophages participent à la destruction de la masse tumorale, les lymphocytes T CD8+ et T CD4+ développent leur spécificité antigénique au sein des ganglions lymphatiques. (d) Les lymphocytes spécifiques de la tumeur vont migrer jusqu'au site tumoral, via un gradient de chimiokine, où ils vont reconnaître et détruire de manière spécifique les cellules présentant des antigènes tumoraux.

Cellules tumorales (rouge) ; cellules normales (gris) ; cellules tumorales mortes (rose et noir avec un contour discontinu) ; lymphocytes, cellules dendritiques (DC) et macrophages (Mac) sont représentées par des couleurs distinctes.

La suite de ce chapitre vise à décrire les différents acteurs impliqués dans cette réponse immunitaire anti-tumorale, puis dans un second temps, les différentes stratégies d'immunothérapie permettant d'induire ou de potentialiser la mise en place de cette immunité anti-tumorale seront exposées.

I.3 Les acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale

I.3.1 L'immunité innée

En l'absence d'immunisation préalable, la réponse immunitaire anti-tumorale, qui se développe durant la phase d'élimination, va tout d'abord faire intervenir la réponse immunitaire innée dont les principaux acteurs sont les macrophages, les cellules NK et les DC.

A) Les macrophages associés aux tumeurs de type M1 (TAM-M1)

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont originaires de la lignée monocyttaire. Ils sont largement recrutés au site tumoral par des chimiokines, comme la protéine de chimiotactisme des monocytes (MCP). Ce sont de grosses cellules ($\text{\O} = 20\text{--}80\mu\text{m}$) caractérisées, entre autre, par leur expression membranaire de CD14 (le co-récepteur de TLR4), CD16 (Fc γ RIII), CD31 (impliqué dans les phénomènes de phagocytose) et CD40 (molécule présente sur les cellules présentatrices d'antigène). Ces cellules ont un rôle essentiel dans la phagocytose.

Les TAM-M1 activés par le granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et l'interféron- γ (IFN- γ) acquièrent des fonctions cytotoxiques et sécrètent notamment du TNF α (Tumor Necrosis Factor α), de l'interleukine (IL-) 1 mais aussi des protéases et des métabolites de l'oxygène (Dranoff, 2004). Ils sont aussi capables de présenter aux lymphocytes T des antigènes dérivés des tumeurs via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Les TAM-M1 peuvent aussi activer une réponse immune anti-tumorale par la sécrétion d'IL-12 responsable d'une réponse de type T_H1 (décrite par la suite).

B) les cellules Natural Killer (NK) :

Les cellules NK regroupent un type cellulaire, dérivé de lignée lymphocytaire, CD3⁻ et TCR⁻. Ils représentent approximativement 15 % des lymphocytes circulants et constituent la première ligne de défense de l'organisme, capables de reconnaître et de détruire spécifiquement les cellules infectées par des virus, de distinguer les cellules normales des cellules cancéreuses "modifiées".

Les cellules NK expriment à leur surface le récepteur CD7, la molécule d'adhésion CD56, la glucuronosyl transférase CD57. Leur activation est régulée par une balance entre les signaux reçus par les récepteurs inhibiteurs et activateurs. Les principaux récepteurs activateurs des cellules NK sont NKG2D et les récepteurs de cytotoxicité naturelle NKp30 et NKp46, DNAM-1, CD2, NKp80, 2B4, NTBA (Vivier et al., 2011).

Différents mécanismes sont mis en jeu par les cellules NK pour éliminer les cellules tumorales :

- L'activation des NK par un excès de signaux activateurs va potentiellement entraîner l'exocytose de granules contenant des enzymes cytolytiques de type perforine et granzyme-B, provoquant l'apoptose des cellules tumorales (Sun and Lanier, 2011; Vivier et al., 2011).

- L'interaction de molécules comme le ligand des récepteurs Fas (Fas-L) ou TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), présents à la surface des cellules NK, avec leurs récepteurs spécifiques exprimés par la tumeur, entraîne également l'apoptose des cellules tumorales (Dranoff, 2004; Ashkenazi, 2002).

- Les cellules NK, comme les macrophages, expriment également le récepteur CD16 (FcγRIII) pour le fragment Fc des immunoglobulines, qui lorsque qu'il est activé, induit une réaction puissante appelée cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

- Enfin, les cellules NK sécrètent des facteurs solubles comme le monoxyde d'azote (NO) et de nombreuses cytokines (GM-CSF, IL-5, IL-10 et IL-13,...) (Dunn et al., 2002; Loza et al., 2002), parmi lesquelles le TNFα qui exerce une action apoptotique directe sur les cellules tumorales et l'IFN-γ (interféron-γ) qui réduit la néoangiogenèse et recrute les acteurs de la réponse immunitaire spécifique comme les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (figure 4).

Les cellules NK ont un rôle protecteur anti-tumoral en participant au phénomène appelé le « DC editing », c'est-à-dire, qu'elles sont capables de reconnaître et de détruire les DC qui n'auraient pas une réponse anti-tumorale adaptée, ce qui permet de solliciter de nouvelles cellules dendritiques non tolérantes (Moretta et al., 2006; Moretta, 2002).

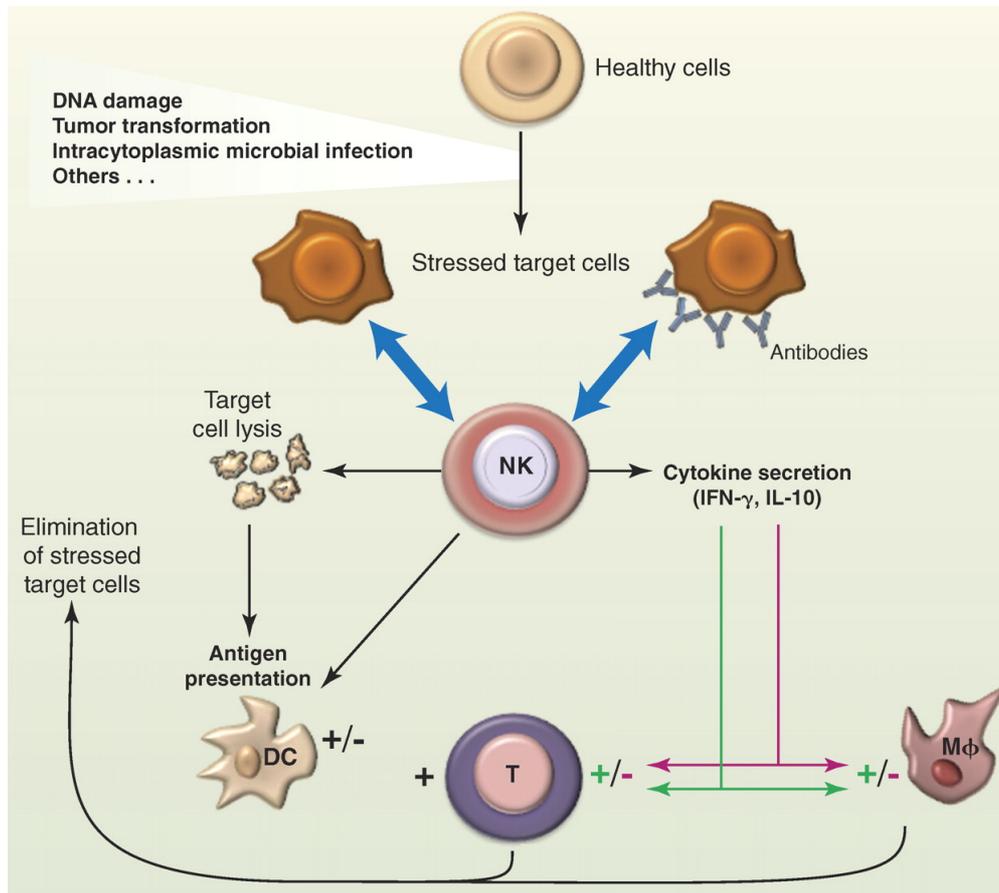


Figure 4 : Les fonctions biologiques des cellules NK (Vivier et al., 2011)

Les cellules NK peuvent reconnaître une variété de cellules stressées, en l'absence ou en présence d'anticorps (flèches bleues). L'activation des cellules NK déclenchée par cette reconnaissance peut conduire à la lyse de la cellule tumorale et à la production de diverses cytokines et de chimiokines. Les NK peuvent également interagir avec les DC en provoquant la lyse de DC inadaptées ou en participant à leur maturation, ce qui conduit à une meilleure réponse immunitaire anti-tumorale.

L'impact pronostique des cellules NK a été étudié dans de nombreux types de cancer. L'analyse de l'infiltrat NK du stroma tumoral de tumeurs d'origine oesogastrique, colorectal, hépatocellulaire, épidermoïde ORL, a permis de montrer que la présence de cellules NK était corrélée à un meilleur pronostic (Senovilla et al., 2012).

C) Les cellules dendritiques (DC)

Trois types de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) peuvent être distinguées : les macrophages, les lymphocytes B (LB) et les DC. Néanmoins, les DC sont les plus efficaces et elles sont appelées **CPA professionnelles**. Ce sont les seules capables de stimuler des LT naïfs. Elles jouent un rôle crucial dans l'induction d'une réponse immunitaire adaptative (Banchereau and Steinman, 1998).

Les DC dérivent d'un progéniteur hématopoïétique (cellule souche CD34⁺ de la moelle osseuse). Elles sont très rares dans le sang (<1%). Les DC d'origine myéloïde, CD11c⁺CD123^{low}, sont considérées comme les principales CPA professionnelles, capables d'apprêter et de présenter les antigènes sur les molécules de CMH-I et CMH-II aux LT. Elles expriment également des molécules de co-stimulation et disposent de toutes les caractéristiques nécessaires pour l'activation des LT CD4⁺ et CD8⁺.

- **Recrutement des DC** : Les DC sont présentes dans le sang et dans les tissus périphériques sous forme immature (iDC) (Banchereau et al., 2000). À la suite du développement d'un processus tumoral, les iDC s'accumulent rapidement au site inflammatoire (figure 5). Ce phénomène de recrutement est la conséquence de la sécrétion de chimiokines par les macrophages et DC présents sur le site tumoral (Sallusto et al., 1999).

- **Reconnaissance et capture de l'antigène** : Les iDC disposent d'une grande capacité à reconnaître et à capturer les antigènes, mais elles sont encore de faibles activateurs des LT naïfs. Les antigènes sont internalisés par les iDC suite à l'engagement à leur surface de récepteurs impliqués dans la reconnaissance antigénique : les TLR (Toll-like receptor), les CLR (récepteurs du groupe des lectines C), les récepteurs « scavengers » et les récepteurs de type Fc (Fragment cristallisable). Différents mécanismes peuvent être utilisés par les iDC pour capturer les antigènes : l'endocytose, la phagocytose ou la pinocytose. Les antigènes solubles sont captés par micropinocytose ou macropinocytose. Ces mécanismes consistent en la formation de replis membranaires qui s'intègrent dans le cytoplasme sous forme de petites vésicules. Les antigènes solides (ou particulaires) sont, en revanche, captés par endocytose et phagocytose. Les iDC peuvent absorber l'équivalent de leur volume en l'espace d'une heure.

- **Maturation des DC** : Une fois l'antigène capturé, celui-ci va pouvoir être apprêter sous la forme de complexes CMH-peptide issu de l'antigène, et les DC vont acquérir la capacité d'activer les cellules T suite à un processus de maturation notamment caractérisé par des modifications d'expression des molécules de surface (Banchereau et al., 2000) (figure 5).

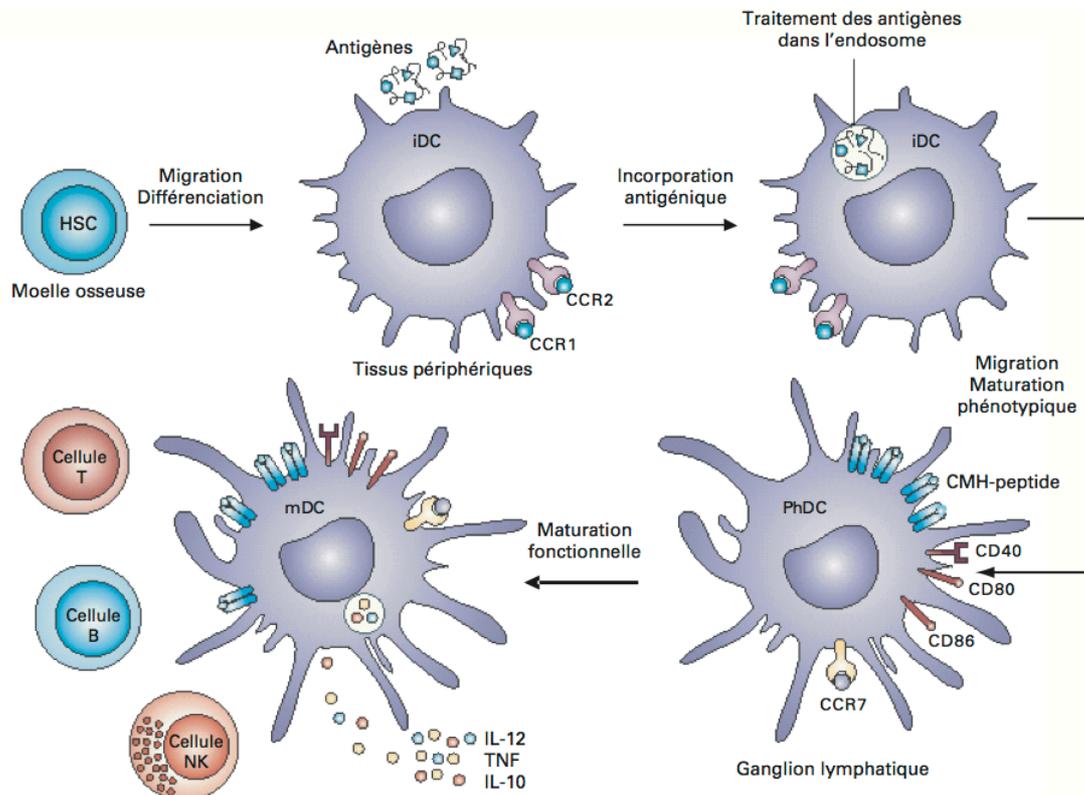


Figure 5 : Maturation des cellules dendritiques (Hackstein and Thomson, 2004)

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient en cellules dendritiques immatures (iDC), présentes au niveau des tissus périphériques, où elles internalisent et traitent des antigènes. Ce phénomène va permettre l'activation des iDC qui vont surexprimer des marqueurs de surface (CD40, CD80, CD86), des récepteurs aux chimiokines (CCR7) et des molécules du CMH (stade intermédiaire de maturation phénotypique). Dans les organes lymphoïdes secondaires, elles vont activer les lymphocytes T et B via les molécules du CMH, et les cellules NK. Elles acquièrent le stade de maturation fonctionnelle (mDC) et sécrètent des cytokines inflammatoires.

Les iDC vont perdre leur pouvoir de capture antigénique, parachevant ainsi la diminution d'expression des molécules impliquées dans l'internalisation des antigènes (Sallusto and Lanzavecchia, 1999) et vont parallèlement surexprimer des molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86 et CMH) (Cella et al., 1999). Ces molécules sont fortement impliquées dans les interactions entre les DC et les cellules T. Ce phénomène de maturation va également s'accompagner d'un changement dans l'expression des récepteurs aux chimiokines à leur surface. Les DC matures (mDC) expriment fortement le récepteur aux chimiokines 7 (CCR7), alors que les récepteurs du stade immature (CCR1, CCR2, CCR5 et

CCR6) sont sous-exprimés (Sallusto et al., 1999). L'expression de CCR7 est cruciale et va permettre la migration des mDC dans les organes lymphoïdes secondaires, où elles vont pouvoir activer les LT naïfs (Sallusto et al., 2000). Tout au long de ce phénomène de maturation, les DC et les cellules NK vont fortement interagir dans la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale (figure 6) (Moretta, 2002).

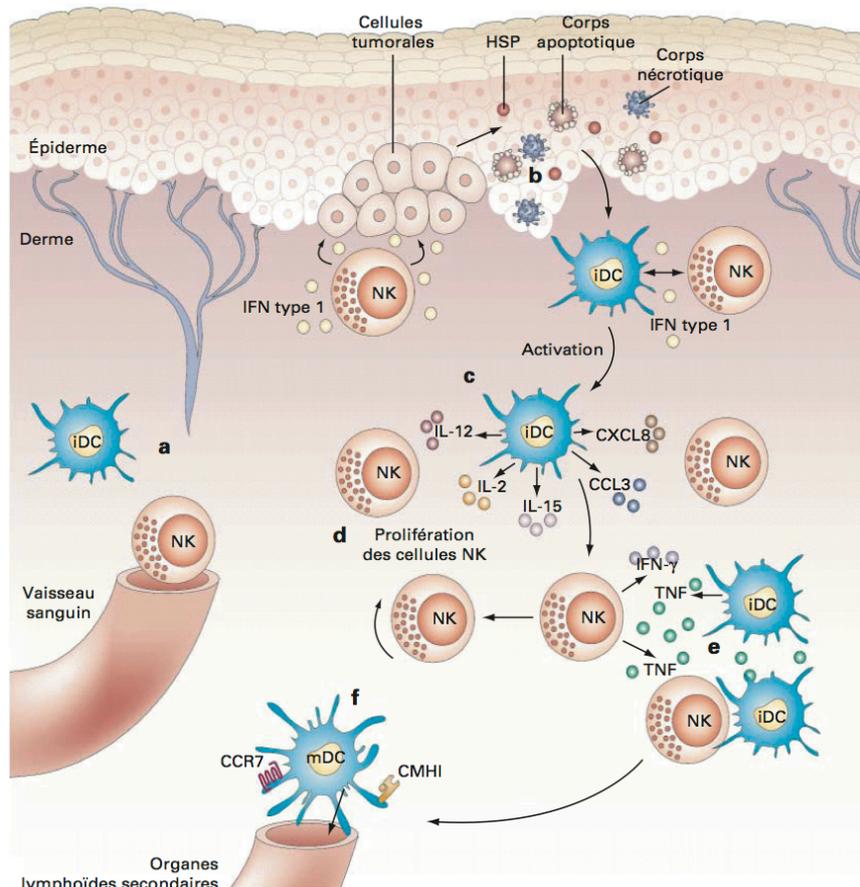


Figure 6 : Interactions entre cellules NK et cellules dendritiques (Moretta, 2002)

(a) Les cellules NK et les cellules dendritiques immatures (iDC) sont recrutées au site tumoral. A ce stade les cellules NK sont activées par des chimiokines exprimées par les cellules endothéliales, et par les IFN de type I (IFN- α , - β et - ω) sécrétés par les tissus inflammatoires. (b) Les cellules NK vont développer leur pouvoir cytotoxique contre les cellules tumorales. Ce phénomène entraîne la production de dérivés cellulaires (protéines de choc thermique (HSP), corps apoptotiques et nécrotiques) qui vont être captés par les iDC. (c) Les iDC sont activées par l'internalisation et la présentation des antigènes tumoraux à leur surface. Elles vont commencer à sécréter des cytokines et des chimiokines. Les interactions avec les cellules NK vont faciliter cette activation. L'IL-12 sécrétée par les iDC active la production d'IFN- γ par les cellules NK. Les chimiokines CCL3 et CXCL8 (IL-8) participent au recrutement des cellules NK du sang. (d) Les cellules NK commencent à proliférer en réponse à l'IL-15 produite par les iDC activées. (e) Les cellules NK participent à la maturation des iDC via des interactions physiques directes et la cytokine TNF. Les DC surexpriment des protéines de surface comme les molécules du CMH-I qui vont les protéger de la lyse par les cellules NK. (f) Les DC matures (mDC) expriment le récepteur aux chimiokines CCR7, essentiel pour leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires.

En raison de ces fonctions et de l'activation d'une immunité spécifique, un infiltrat important de DCs dans le stroma tumoral est plus souvent associé à un meilleur pronostic (Senovilla et al., 2012).

- **les cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDC) :** Les pDC ou DC lymphoïdes, CD11c⁻ CD123^{high}, représentent une sous catégorie de DC aux caractéristiques différentes de celles des DC myéloïdes conventionnelles décrites précédemment. (expression différente de molécules de surface, (Barchet et al., 2005)). A l'état immature, elles ont une morphologie proche de celle des plasmocytes qui est à l'origine de leur appellation. Ces pDC sont moins efficaces dans la reconnaissance et la capture d'antigène que les DC conventionnelles. Cependant, elles jouent un rôle majeur dans la défense immunitaire contre les virus et reconnaissent des cellules tumorales infectées par les virus ((Guillermé et al., 2013) en annexe). En effet, face à ces pathogènes, ces cellules s'activent et secrètent une grande quantité d'IFN de type 1 (IFN- α , - β et - ω) ce qui active à leur tour les cellules NK et les LT cytotoxiques (Colonna et al., 2004; Swiecki and Colonna, 2010).

I.3.2 L'immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative est un mécanisme de défense acquis et spécifique qui se développe plus tardivement. Quatre propriétés fondamentales la caractérisent : la spécificité antigénique, la diversité des antigènes reconnus, la mémoire immunitaire et la discrimination du soi (hôte) et du non-soi (organismes étrangers). Elle est assurée par les lymphocytes principalement localisés dans les organes lymphoïdes primaires (ou centraux) où leurs précurseurs sont produits (moelle osseuse et thymus) et dans les organes lymphoïdes secondaires (ou périphériques) où la réponse est initiée (rate, ganglions lymphatiques et divers tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, les MALT). Les cellules activées circulent dans les différents tissus par les voies sanguines et lymphatiques afin d'assurer le contrôle et l'élimination spécifique des cellules infectées ou modifiées.

L'immunité adaptative anti-tumorale est assurée principalement par **les lymphocytes T $\alpha\beta$** (CD3⁺), comprenant les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺. Ces LT se caractérisent par la présence d'un récepteur TCR (T-cell receptor), un hétérodimère constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β , reconnaissant les antigènes tumoraux présentés sous forme de complexe CMH-peptide à la surface des cellules tumorales.

En effet, de nombreux travaux ont permis d'analyser l'impact clinique de l'infiltrat lymphocytaire T au sein des tumeurs (TIL). Récemment, une large méta-analyse de 120 publications a rapporté l'impact pronostique de l'infiltrat cellulaire immunitaire au sein de différentes tumeurs (Fridman et al., 2012). La présence de LT (CD3⁺) était associée à une survie globale et sans récurrence prolongée pour la plupart des types histologiques (mélanome, ORL, sein, vessie, tumeurs urothéliales, rein, prostate, ovaires, colorectal, poumon).

Les paragraphes suivants sont consacrés à la mise en place de ces LT $\alpha\beta$ anti-tumoraux.

A) Les antigènes de tumeurs (TAA)

Dans un contexte tumoral, les antigènes présentés en association avec le CMH sont des peptides issus de protéines d'origine et de nature diverses. Les antigènes de tumeurs (TAA) sont des protéines de cellules tumorales à la base de nombreuses stratégies d'immunothérapie anti-tumorales.

La première caractérisation chez l'homme d'un antigène dit « associé aux tumeurs » fut réalisée par le groupe de T. Boon en 1991 (van der BRUGGEN et al., 1991). Ces travaux

pionniers réalisés à partir de cellules de mélanomes humains, ont permis d'identifier le gène MAGE (Melanoma Antigen). Depuis, différentes techniques se sont développées et ont permis d'identifier de nouveaux antigènes tumoraux. Les différents antigènes de tumeurs sont classés en 5 catégories (<http://cancerimmunity.org/peptide/>).

- **les antigènes mutés ou d'expression aberrante** : Ils sont produits par des mutations oncogéniques activatrices de molécules impliquées dans la prolifération cellulaire. Des mutations dans l'ADN des cellules tumorales telles que des mutations, des délétions ou des réarrangements chromosomiques peuvent conduire à la synthèse de protéines mutées. Ces mutations étant de nature aléatoire, elle créent le plus fréquemment des mutations uniques, spécifiques d'un patient et non exploitable en clinique. Néanmoins, dans quelques cas, certaines de ces mutations apparaissent fréquemment dans certains cancers et les antigènes exprimés sont retrouvés chez une grande proportion de patient comme Ras, Raf, CDK4 ou p53 muté.

- **les antigènes « cancer testis » ou « cancer germline »** : Le nom de cette famille provient de leur expression restreinte aux cellules germinales testiculaires. La famille des gènes codant pour les antigènes MAGE est le prototype des gènes « cancer germline » à laquelle appartient le premier antigène tumoral identifié, MAGE-A1. Par la suite, de nombreux autres antigènes appartenant à ce groupe ont été identifiés et sont regroupés en plusieurs familles : les MAGE, BAGE, GAGE, LAGE/NY-ESO-1, SSX ou encore SPANX.

- **les antigènes surexprimés** : On distingue les antigènes onco-foetaux naturellement exprimés dans un tissu sain particulier essentiellement pendant la vie embryonnaire : l'alpha-foetoprotéine dans le cancer du foie ou encore l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) exprimé dans certains cancers colo-rectaux. Ces antigènes résultent de la réactivation de gènes embryonnaires, transcriptionnellement actifs dans certains types de tumeurs mais généralement silencieux dans les tissus adultes. D'autre part, on distingue les antigènes oncogéniques qui sont issus de protéines exprimées à un niveau basal (souvent faible) dans les cellules normales, mais surexprimées par certains types tumoraux. Parmi les antigènes surexprimés ciblés en clinique, on retrouve des antigènes épithéliaux comme la protéine MUC-1 (mucine) dans certains carcinomes ou encore l'antigène HER-2/Neu dont la surexpression a été observée dans 20 à 30% des cancers du sein primitif.

- **les antigènes de différenciation** : ce sont des protéines partagées seulement par les cellules de même type histologique que le cancer (ex : antigène exprimé par le mélanome et les cellules saines : les mélanocytes). Melan-A/MART1, gp-100, tyrosinase ou PSMA (Prostate-specific membrane antigen) sont quelques exemples d'antigène de différenciation.

- **les antigènes onco-viraux** : Cette dernière catégorie représente les antigènes tumoraux provenant de la transformation tumorale de certains tissus par des virus. On peut distinguer les oncoprotéines E6 et E7 du papillomavirus dans le carcinome du col utérin, Tax-2 (virus HTLV-1) dans certains lymphomes T ou encore LMP1 (virus Epstein-Barr) dans le lymphome de Burkitt.

B) Mise en place de la réponse immunitaire T

L'activation complète des LT naïfs nécessite la présence de 3 signaux d'activation. 1) La reconnaissance par le TCR $\alpha\beta$ d'un complexe CMH/peptide présenté par les CPA professionnelles (signal 1 dépendant de l'antigène), 2) l'action de molécules de co-stimulation (signal 2 de co-stimulation) et 3) de certaines cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ) qui favorisent l'action des LT (signal 3). L'ensemble de ces molécules permet la création d'une synapse immunologique, plateforme d'interaction entre les CPA professionnelles et les LT (figure 7).

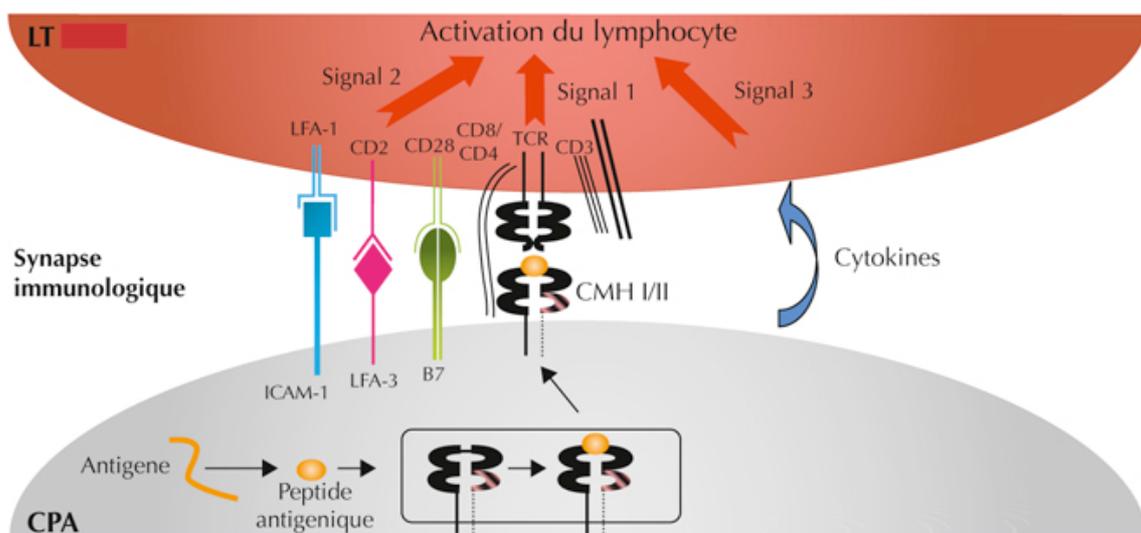


Figure 7 : La synapse immunologique (Tougeron et al., 2013)

L'antigène, capté par la cellule présentatrice d'antigène (CPA), est couplé, après dégradation par le protéasome, à la molécule du CMH de classe I et présenté au T cell receptor (TCR) du lymphocyte T (LT) CD8⁺. Le complexe CD3 est un ensemble de molécules trans-membranaires associées au TCR qui permet la transduction du signal d'activation (signal 1). Les molécules co-stimulatrices de la famille B7 (principalement B7.1 et B7.2), LFA-3 et ICAM-1 (sur la CPA) ont un rôle indispensable à l'activation complète des LT CD8⁺ via leurs ligands CD28, CD2 et LFA-1 (signal 2). La stimulation des LT CD8⁺ par différentes cytokines est aussi importante pour leur activation (signal 3).

Ce modèle simplifie cependant la contribution de chaque signal. En effet, dans certains cas, l'intensité du signal transduit via le TCR peut entraîner des variations dans l'activation et la différenciation des LT (Viola and Lanzavecchia, 1996). Un signal 1 suffisamment fort (la stimulation de la molécule CD3 associée au TCR, figure 7) peut activer les LT ou les rendre anergiques, et ce en absence de signaux de co-stimulation. En outre, les signaux de co-stimulation délivrés aux LT peuvent être de nature positive ou négative ; un signal négatif (B7/CTLA-4, PD1/PDL-1,-2) induit une tolérance immunitaire alors qu'un signal positif (B7/CD28) active les LT (Sharpe and Freeman, 2002; Blackburn et al., 2009). De plus, d'autres signaux transmis par la famille des récepteurs au TNF (CD40/CD40 ligand, CD27/CD70, OX40/OX40 ligand, 4-1BB/4-1BB ligand) (Watts and DeBenedette, 1999), ou des facteurs d'adhésion et de stimulation comme LFA-1 ou ICAM-1 (Ochsenbein, 2002) participent aussi à la co-stimulation des LT.

Les cellules tumorales dépourvues généralement de molécules de co-stimulation ne peuvent pas déclencher de réponse immunitaire spécifique efficace. Cependant, les mDC ayant capturé des débris de cellules tumorales, vont présenter ces TAA exogènes, **par la voie de présentation exogène pour les CMH-II pour l'activation des LT CD4⁺ et par la voie de présentation croisée sur les molécules de CMH-I pour l'activation des LT CD8⁺**, puis migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles pourront activer les LT naïfs (Banchereau and Steinman, 1998). Après activation, les LT prolifèrent et se différencient en cellules T effectrices de type « helper » (T_H) dans le cas des LT CD4⁺ ou cytotoxiques (CTL) pour les LT CD8⁺. Ces LT activés pourront ensuite migrer à la tumeur pour reconnaître et détruire spécifiquement les cellules tumorales exprimant les TAA (figure 8).

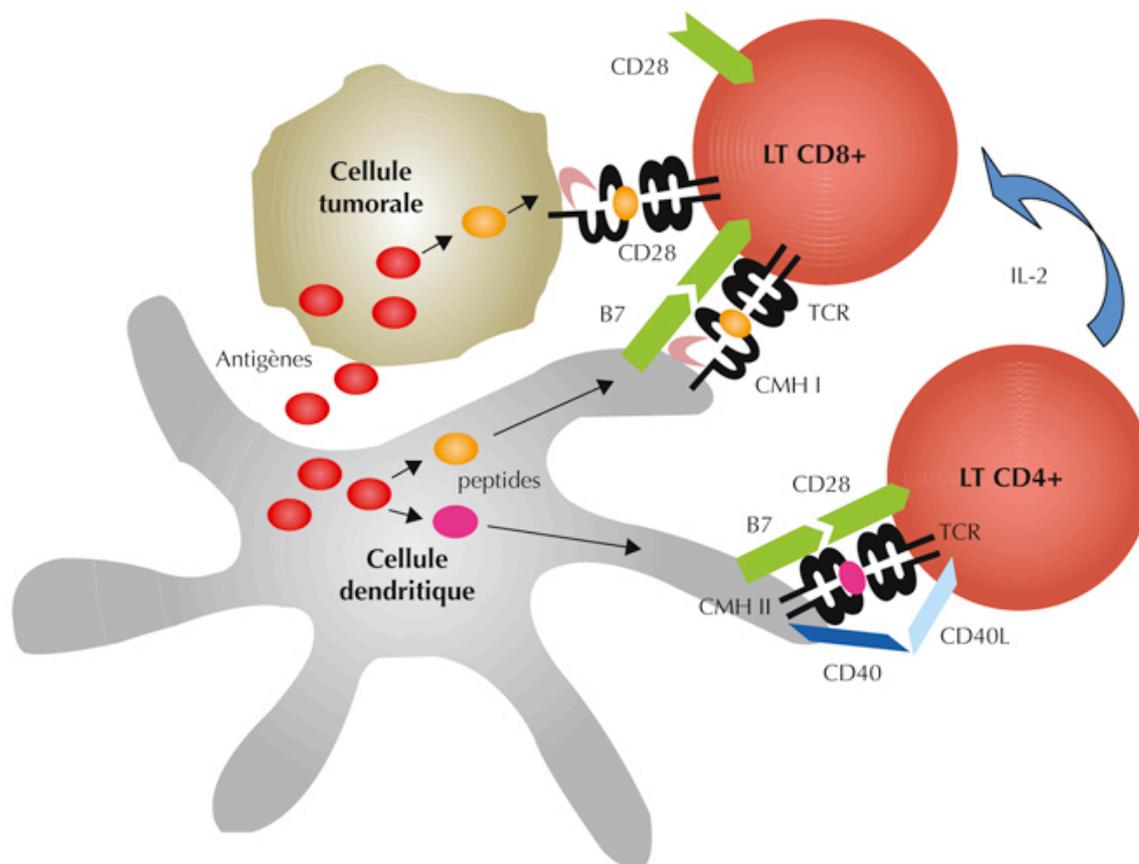


Figure 8 : La réponse anti-tumorale dépendante des LT (Tougeron et al., 2013)

La DC, CPA professionnelle, phagocyte puis dégrade les antigènes tumoraux en peptides immunogènes qui sont présentés aux LT. Les LT CD4⁺ sont activés par reconnaissance du peptide associé à une molécule du CMH de classe II. La DC a la possibilité de présenter aux LT CD8⁺ les peptides immunogènes dérivés d'antigènes tumoraux exogènes associés aux molécules du CMH de classe I : c'est la présentation croisée. Les LT CD8⁺, activés par la présentation du peptide associé à une molécule du CMH de classe I, peuvent ensuite reconnaître et détruire les cellules tumorales. De plus, les LT CD4⁺ contribuent à l'activation des LT CD8⁺, notamment via la sécrétion d'IL-2. LT : lymphocyte T ; TCR : T cell receptor ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; CPA : cellule présentatrice d'antigène.

C) Les lymphocytes T CD8⁺ (LT CD8⁺)

Les LT CD8⁺ acquièrent des fonctions cytotoxiques mettant en jeu plusieurs mécanismes, on parle alors de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL). Ces cellules sécrètent de l'IFN- γ , une cytokine majeure de l'immunité anti-tumorale naturelle ayant une action antiproliférative ou pro-apoptotique directe sur les cellules tumorales. De plus, l'IFN- γ augmente l'expression des molécules de CMH-I sur les cellules tumorales et facilite ainsi leur reconnaissance par les CTL (Propper et al., 2003). Les LT CD8⁺ produisent également des molécules cytotoxiques comme les enzymes de type perforines/granzymes (Veiga-Fernandes et al., 2000). L'interaction de molécules membranaires exprimées à la surface du LT CD8⁺ (Fas-L, TRAIL) avec leurs récepteurs (Fas, TRAIL récepteur) sur la cellule tumorale peut aussi déclencher l'apoptose de cette dernière.

Les LT CD8⁺ produisent de l'IL-2 et du TNF α et vont proliférer en présence d'IL-2, d'IL-4, d'IL-7 et d'IL-15 (Kaech et al., 2002). Les LT CD8⁺ activés expriment à leur surface de nombreuses protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire et le chimiotactisme qui leur permettent de coloniser les tissus et les muqueuses (Moser and Loetscher, 2001).

D) Les lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺)

Les LT helper CD4⁺ activés (T_H) peuvent se différencier en plusieurs sous-populations en fonction de leur profil de sécrétion de cytokines. Parmi les T_H, se distingue les T_{H1}, T_{H2} et T_{H17} qui seront décrits par la suite (figure 9) (Abbas et al., 1996). Mais d'autres sous populations de T_H ont été identifiées comme les T_{H9} et les T_{H22}.

La réponse de type T_{H1} ou pro-inflammatoire est caractérisée principalement par la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2 qui stimulent efficacement la prolifération des LT CD8⁺ et des cellules NK. La production de cytokines pro-inflammatoires et de médiateurs cytotoxiques va également stimuler les fonctions cytotoxiques des macrophages. Les cytokines de type T_{H2} définissent une population de LT CD4⁺ produisant majoritairement de l'IL-4, l'IL-5, IL-10 et de l'IL-13 qui orientent la réponse plutôt vers une immunité humorale et stimulent la production d'anticorps par les LB. Les différentes fonctions de ces deux populations sont résumées dans la figure 10. Il est couramment admis qu'une balance T_{H1}/T_{H2} en faveur des T_{H1} permet une réponse anti-tumorale optimale, par l'activation des CTL spécifiques de TAA (Mosmann and Sad, 1996). Tandis que l'induction de réponses T_{H2} est associée à une progression tumorale (De Monte et al., 2011).

Les T_{H17}, impliqués notamment dans les mécanismes d'inflammation tissulaire et d'auto-immunité (Bettelli et al., 2005; Kryczek et al., 2007), ont été identifiés plus récemment. Les T_{H17} produisent de l'IL-17A, de l'IL-17F, du TNF α et de l'IL-6. L'action vis à vis du développement tumoral des lymphocytes T_{H17} reste encore débattue. La présence de Th17 est associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs colorectales, pulmonaires et hépatocellulaires, (Liu et al., 2010; Chen et al., 2010; Zhang et al., 2009); mais à une meilleure survie dans les carcinomes oesogastriques (Chen et al., 2011).

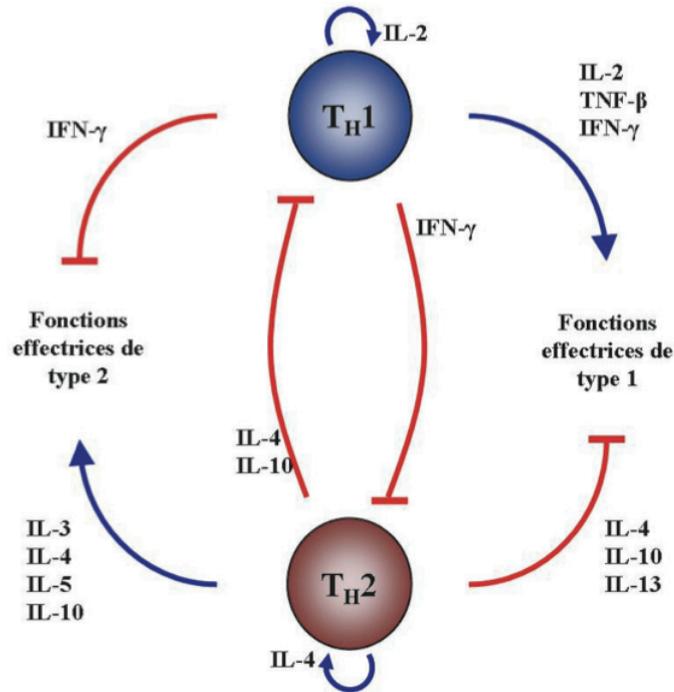


Figure 9 : Cytokines produites par les populations lymphocytaires T_H1 et T_H2 (Abbas et al., 1996)

Les cytokines produites par les populations T_H1 et T_H2 déterminent leurs fonctions effectrices (bleu) et inhibitrices (rouge). Ces fonctions sont symétriques et opposées. L'IL-2 et l'IL-4 sont des facteurs autocrates pour les populations T_H1 et T_H2 respectivement.

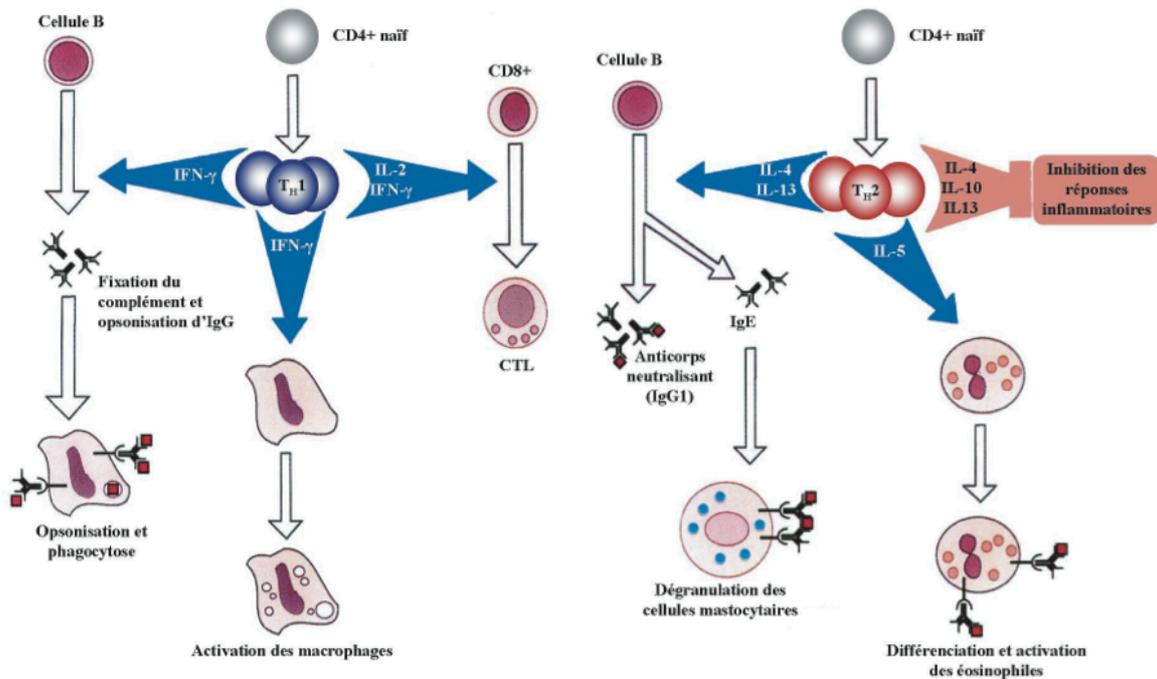


Figure 10 : Fonctions effectrices des sous-populations de lymphocytes T_H1 et T_H2 (Abbas et al., 1996)

Les lymphocytes T_H1 induisent la phagocytose et activent les populations CTL, déclenchant une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les lymphocytes T_H2 induisent la dégranulation des cellules mastocytaires et l'activation des éosinophiles ; ils activent aussi les lymphocytes B, entraînant une réponse immunitaire de type humorale.

Si un organisme au sein duquel se développe une tumeur est capable d'une réponse immunitaire innée et adaptative, cette réponse n'est généralement pas suffisante pour empêcher la progression de la maladie. Comme nous l'avons vu, au cours de leur croissance, les cellules tumorales peuvent acquérir la capacité de contourner les réponses immunitaires mises en place par l'organisme. Ces mécanismes d'échappements sont nombreux et pas encore totalement élucidés.

I.3.3 Les mécanismes d'échappement tumoral

L'un des arguments importants, en faveur du rôle du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs, réside dans sa capacité à modifier le phénotype tumoral par une pression de sélection (« immunoediting »). Ainsi, le système immunitaire sélectionne des variants tumoraux résistant à l'attaque immunologique par différents mécanismes décrits ci dessous. Il est probable que ces mécanismes opèrent à différentes étapes de la croissance tumorale. Par exemple, l'accumulation de cellules inhibitrices telles que les LT régulateurs (LTreg) et les MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cells) (Gabrilovich and Nagaraj, 2009) se fait à des stades précoces tandis que la surexpression de protéines immunosuppressives par les cellules tumorales se fait à des stades plus tardifs (Frey and Monu, 2008).

A) Mécanismes intrinsèques aux cellules tumorales

-Altération de l'expression des molécules du CMH-I : La présentation des antigènes par les molécules du CMH-I est un mécanisme majeur de la réponse immunitaire cytotoxique. L'absence partielle ou totale d'expression des molécules du CMH-I est fréquente dans de nombreux types tumoraux humains, comme dans le cancer colorectal ou le cancer du sein (Algarra et al., 2004). La capacité invasive et métastatique de certains cancers a également pu être corrélée à l'absence de molécules du CMH-I (Garrido et al., 1997).

Les mécanismes impliqués dans cette perte d'expression des molécules du CMH-I sont nombreux et sont liés, pour la plupart, à des altérations de l'apprêtement de l'antigène et de sa présentation par les CMH-I (figure 11). Une absence totale de molécules du CMH-I est souvent due à une mutation dans le gène codant la bêta-2 microglobuline (Hicklin et al., 1998). Certaines tumeurs peuvent également présenter des pertes d'allèles, de loci ou d'haplotypes pour le CMH-I. Dans les mélanomes, par exemple, la surexpression de

l'oncogène c-myc est corrélée avec une perte d'expression du locus HLA-B (Versteeg et al., 1989). Un assemblage correct des molécules du CMH-I et la présentation effective de peptides sont dépendants de la génération de ces peptides par le protéasome et de leur transport dans le golgi et le réticulum endoplasmique (figure 11). Dans certaines tumeurs, l'apprêtement de l'antigène peut être compromis par des altérations au niveau du protéasome (LMP-2, LMP-7) ou de transporteurs peptidiques (TAP1, TAP2), ce qui peut provoquer l'absence d'expression de molécules du CMH. Ceci a notamment été rapporté pour des cancers du poumon (Korkolopoulou et al., 1996) et de la prostate (Sanda et al., 1995).

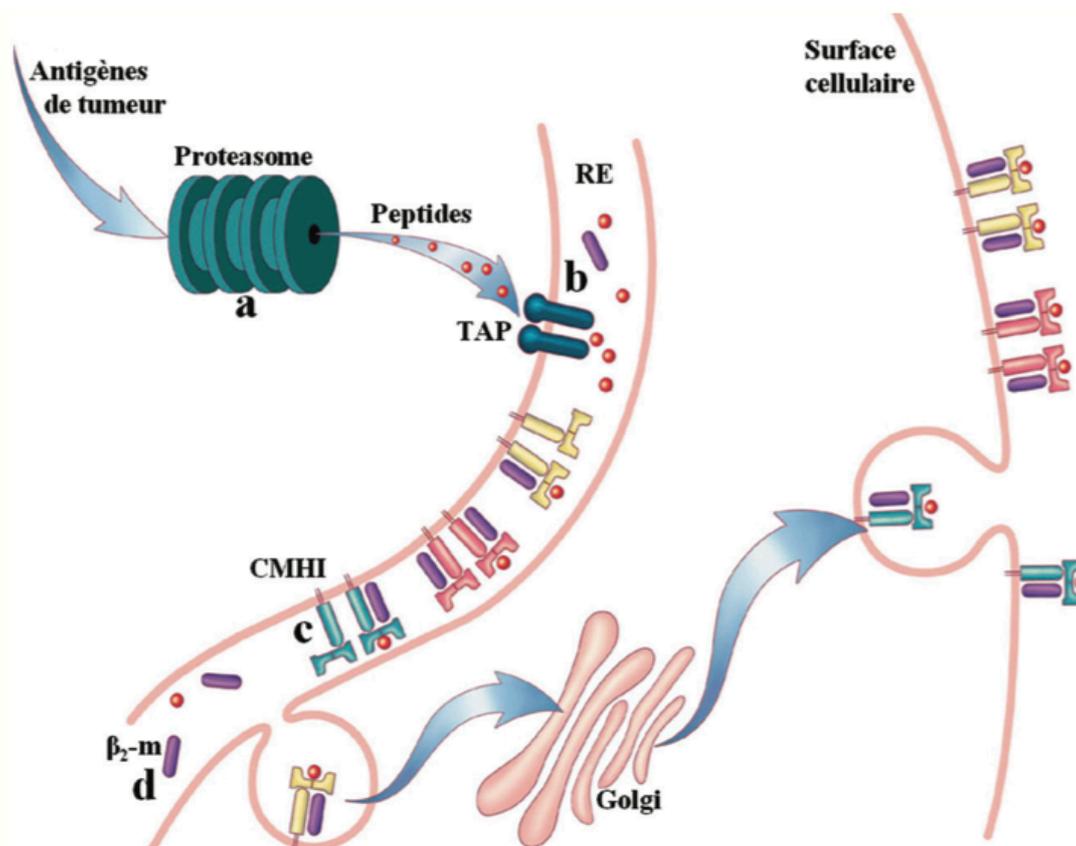


Figure 11 : Mécanismes moléculaires responsables de la déficience d'expression de molécules du CMH-I (Khong and Restifo, 2002)

Des dérégulations peuvent intervenir au cours des différentes phases aboutissant à l'expression de molécules du CMH-I à la surface cellulaire. a : dérégulations dans les composantes du protéasome (telles que LMP-2, LMP-7); b : dérégulations des transporteurs peptidiques TAP1 et TAP2; c : perte d'hétérozygotie sur le chromosome 6; dérégulation transcriptionnelle, mutations ponctuelles ou délétions sur le gène codant le CMH-I; d : mutations ou délétions du gène codant la bêta-2 microglobuline (β_2 -m).

- **Perte d'expression d'antigène de surface** : L'expression des antigènes tumoraux est souvent hétérogène, même au sein de tumeurs de même type. La diminution d'expression des antigènes dans le mélanome est souvent corrélée à une progression de la maladie (de Vries et al., 1997). Les mécanismes contrôlant la diminution de l'expression de ces antigènes ne sont pas totalement élucidés, mais ils pourraient être expliqués par l'immunodominance des épitopes (figure 12). Cette théorie est basée sur la reconnaissance majoritaire d'un épitope (ou déterminant antigénique) parmi la totalité de ceux exprimés par la cellule tumorale. Cet épitope présent sur les populations tumorales parentales va entraîner une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. Après destruction de la population parentale, une nouvelle hiérarchie s'établit entre les variants résistants, aboutissant à la transformation d'épitopes immunorécessifs en épitopes immunodominants. Cependant, l'épitope immunodominant parental peut continuer à être présenté via les DC aux LT CD8⁺, maintenant ainsi une réponse immunitaire contre une cible « fantôme », au détriment de réponses dirigées contre les autres épitopes (Schreiber et al., 2002).

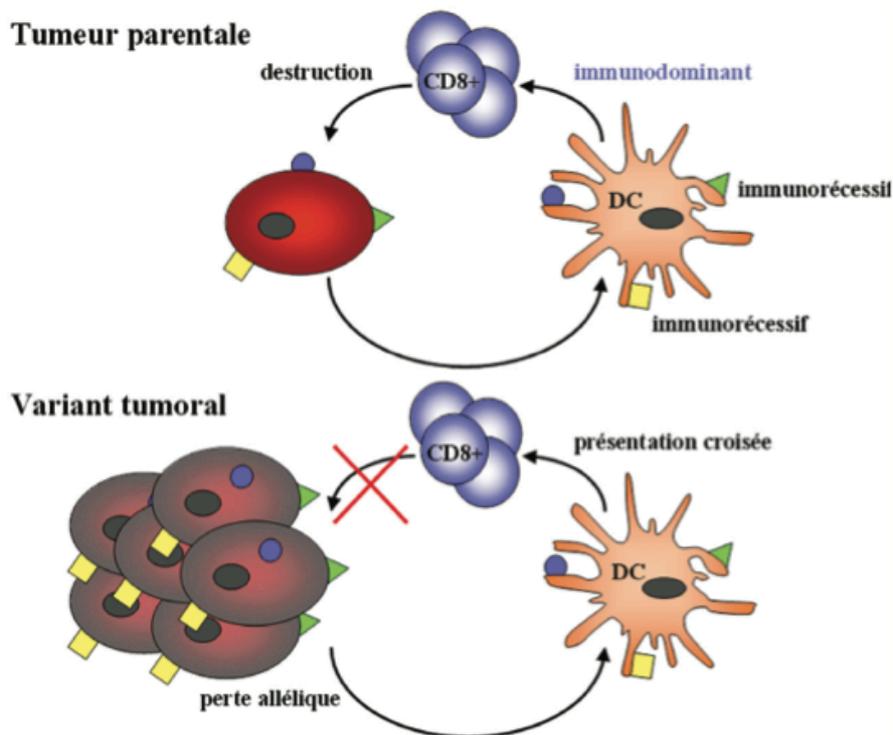


Figure 12 : Concept d'immunodominance (Schreiber et al., 2002)

La présentation croisée de l'antigène dominant par les DC maintient la réponse immunitaire dirigée contre cet épitope dominant. Cette réponse ne peut plus participer à l'élimination du variant tumoral, et prévient la mise en place d'une réponse contre de potentiels antigènes cibles

- **Dérégulation des signaux d'apoptose** : Appelée aussi mort cellulaire programmée, l'apoptose correspond aux phénomènes qui conduisent normalement à la mort cellulaire, indispensable à l'homéostasie de l'organisme. Les molécules Fas-L et TRAIL des NK et des CTL, protéines effectrices de ce contrôle, se lient à des récepteurs de mort cellulaire, respectivement Fas et les TRAIL-R1/R2 exprimés par les cellules tumorales. Cette interaction permet la lyse des cellules tumorales par les CTL et les NK. Des mutations, voire une perte du gène codant Fas, ont été décrites dans le myélome multiple (Landowski et al., 1997) et le mélanome (Shin et al., 1999). L'activité apoptotique induite par TRAIL est également souvent inhibée par les cellules tumorales, notamment suite à de nombreuses mutations ou perte d'expression de gènes codant pour des protéines impliquées transmission du signal de mort via ce récepteur (Hersey and Zhang, 2001).

- **Expression de molécules (Fas-L et PD-L1) favorisant l'apoptose des lymphocytes T** : Certaines tumeurs expriment Fas-L, ce qui pourrait induire l'apoptose de cellules T infiltrant la tumeur. Cette hypothèse est étayée par le fait que dans certains cancers, comme celui du côlon, l'expression de Fas-L est corrélée à l'apoptose des LT infiltrants la tumeur (TIL) (Houston et al., 2003a; b). Un autre mécanisme, moins contesté, déclenché par l'interaction Fas/Fas-L, se traduit par le phénomène d'AICD (Activation-Induced Cell Death) des cellules T anti-tumorales. Les cellules T activées par la reconnaissance spécifique des antigènes tumoraux vont exprimer fortement Fas-L à leur surface, ce qui va induire leur propre apoptose (suicide) ainsi que l'apoptose (fratricide) des cellules T voisines Fas positives (Zaks et al., 1999). Un autre événement contribuant à l'échappement tumoral implique des molécules de la famille des immunoglobulines comme les protéines PD-L1 et PD-L2 (Blank et al., 2005). L'interaction entre la molécule PD-1, présente à la surface des LT et son ligand PD-L1 exprimé sur les cellules tumorales entraîne l'inhibition de l'activation des CTL (Freeman et al., 2000). Il a été montré que PD-L1 est exprimé à la surface de différents types tumoraux et favorise l'apoptose des CTL (Dong et al., 2002).

B) Mécanismes extrinsèques aux cellules tumorales

- **Production de molécules immunosuppressives :** L'activation ou l'inhibition des LT reposent en grande partie sur la nature des cytokines qui composent le microenvironnement tumoral. Les cellules tumorales produisent certaines cytokines et chimiokines qui vont affecter de manière négative la maturation et les fonctions des cellules immunitaires.

La molécule VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), sécrétée par de nombreuses tumeurs, est notamment responsable de l'angiogenèse tumorale. Elle possède également une activité inhibitrice sur la maturation et la différenciation des DC, en bloquant le facteur de transcription NF- κ B (Oyama et al., 1998). Cette protéine est la cible de certaines stratégies thérapeutiques. Un anticorps bloquant dirigé contre le VEGF (bevacizumab) permet, par exemple, de limiter la progression de la maladie chez des patients atteints de carcinomes rénaux (Yang et al., 2003).

La cytokine IL-10 est fréquemment détectée dans le sérum de patients atteints de cancer. Elle peut avoir un effet inhibiteur sur la différenciation et la fonctionnalité des DC à partir des cellules souches hématopoïétiques (Girolomoni and Ricciardi-Castagnoli, 1997). L'IL-10 inhibe la présentation antigénique, la production d'IL-12 et donc l'induction d'une réponse T_H1 *in vivo* (Sharma et al., 1999). Elle entraîne l'apoptose des DC en augmentant leur sensibilité à la lyse par les cellules NK autologues (Carbone et al., 1999). L'IL-10 peut également protéger les tumeurs de la lyse par les populations CTL en diminuant l'expression des molécules du CMH de classe I et II.

Le facteur pro-inflammatoire PGE2 (prostaglandine E2) est une cytokine également exprimée par les cellules tumorales. Elle va augmenter la production d'IL-10 par les lymphocytes et les macrophages et diminuer celle de l'IL-12 (Huang et al., 1998). L'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme cyclo-oxygénase 2 (aspirine, rofecoxib ou celecoxib) permet de diminuer la production de PGE2 et augmente la réponse anti-tumorale (Huang et al., 1998).

De fortes concentrations de cytokine TGF- β (Transforming Growth Factor- β) peuvent être retrouvées chez des patients, souvent associées à une progression de la maladie (Gorsch et al., 1992). Cette cytokine, produite par les cellules tumorales, peut également être sécrétée par des cellules apoptotiques (Chen et al., 2001a). Le TGF- β va inhiber l'activation, la prolifération et l'activité des lymphocytes *in vivo* (Fontana et al., 1989). Des stratégies

utilisant des anticorps neutralisants ou des oligo-nucléotides antisens dirigés contre le TGF- β ont permis l'éradication de tumeurs établies en modèles animaux (Gorelik and Flavell, 2001).

- Recrutement dans le microenvironnement tumoral de cellules suppressives :

- Les macrophages associés aux tumeurs de type M2 (TAM-M2) : Comme évoqué précédemment, les TAM-M1 ont un rôle activateur dans l'immunité anti-tumorale. L'abondante population de TAM associée à certaines tumeurs, comme les cancers du sein, de la prostate ou des ovaires, est souvent corrélée à un mauvais pronostic (Pollard, 2004). Ainsi, les TAM-M2, caractérisés par une surexpression de CD163 et CD206, comparativement aux TAM-M1, stimulent la croissance et l'invasion tumorale par la production locale de facteurs de croissance, de cytokines (IL-10, TGF β) et de facteurs angiogéniques. Le CSF-1 (macrophage colony-stimulating factor) est une cytokine souvent associée à la progression tumorale, qui pourrait être impliquée dans l'infiltration et la régulation des fonctions des TAM-M2 (Lin et al., 2001). Il a ainsi été démontré par l'analyse du stroma de prélèvements issus cancers du sein (144 patientes), qu'un taux important de macrophages CD163⁺ dans la tumeur était corrélé à un moins bon pronostic (Medrek et al., 2012).

- Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC, Myeloid derived suppressor cell) : Les MDSC sont une population hétérogène de progéniteurs myéloïdes précoces, de granulocytes immatures, de macrophages et de DC à différents stades de différenciation. Ces cellules ont la capacité d'inhiber à la fois les activités cytotoxiques des cellules NK, des cellules NKT, et la réponse immunitaire adaptative médiée par LT CD4⁺ et CD8⁺. Bien que le mécanisme d'inhibition des cellules NK n'est pas actuellement bien connu, de multiples voies sont responsables de la suppression de cellules T par les MDSC : 1) la production de l'arginase 1 (ARG1) et 2) la régulation positive de l'oxyde nitrique synthase 2 (NOS2). ARG1 et NOS2 métabolisent la L-arginine et vont, ensemble ou séparément, inhiber la traduction de la chaîne CD3 ζ des LT ce qui induit une inhibition de la prolifération des cellules T, et une augmentation de l'apoptose des cellules T. En outre, les MDSC sécrètent des cytokines immunosuppressives et induisent le développement des cellules T régulatrices (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

- les lymphocytes T régulateurs (LTreg) : Un autre sous-type de LT_H est celui des LTreg caractérisés entre autres par une expression constitutive du CD25 (récepteur pour l'IL-2), CD62L (L-selectin), CD103 (intégrine $\alpha E\beta 7$), CD152 (antigène CTLA-4) et le récepteur GITR (Banz et al., 2003; McHugh et al., 2002; Read et al., 2000; Sakaguchi et al., 1995; Shimizu et al., 2002; Takahashi et al., 2000). Leur marqueur le plus spécifique est le facteur de transcription Foxp3 qui a été récemment établi comme marqueur unique des LTreg (Kryczek et al., 2009). Les LTreg représentent 10 % de la population des LT CD4⁺ et sont, soit directement dérivés du thymus (LTreg naturels) (O'Shea and Paul, 2010), soit induits en périphérie (LTreg induits) (Mahnke et al., 2007).

Les LTreg ont une activité immunosuppressive *in vitro*. Ils inhibent l'activation et la prolifération des LT cultivés en présence de CPA professionnelles et stimulés avec un antigène (Takahashi et al., 1998). Ils inhibent la prolifération des LT indépendamment de leur spécificité antigénique (Thornton and Shevach, 1999). De plus, ils sont actifs sur les LT CD4⁺ et CD8⁺ sans restriction d'histocompatibilité (Sakaguchi et al., 2001). La molécule CTLA-4, qui est exprimée à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺ après activation et qui module négativement leur réponse effectrice (Thompson and Allison, 1997), est également exprimée à la surface des LTreg et son activation est nécessaire au développement de leur fonction immunosuppressive (Takahashi et al., 2000).

De nombreuses études mettent en évidence le fait que la génération et l'activation des cellules T effectrices anti-tumorales sont entravées par la population des LTreg. L'élimination des LTreg permet, en effet, la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace chez la souris (Shimizu et al., 1999). Chez l'homme, L'analyse de cohortes de patients a permis de montrer qu'un ratio élevé de LTreg Foxp3⁺ sur les lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺ infiltrant la tumeur, était un facteur pronostique négatif (Ladoire et al., 2008; Schreck et al., 2009; Petersen et al., 2006; Gao et al., 2007; Leffers et al., 2009; Senovilla et al., 2012; Sato et al., 2005)

- Autres cellules suppressives : Divers autres types cellulaires ont été référencés récemment comme ayant une activité suppressive. Parmi elles, les pDC induiraient une suppression de la réponse T (Vermi et al., 2003) et les lymphocytes B régulateurs ont récemment été décrits pour avoir une activité pro-tumorale (Biragyn and Lee-Chang, 2012) mais leur rôle pro-tumoral reste controversé.

I.4 Les stratégies d'immunothérapie anti-tumorale

L'immunothérapie tire parti des acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale. Deux types d'immunothérapies peuvent être distinguées. **L'immunothérapie active ou vaccination thérapeutique** consiste à stimuler directement le système immunitaire du patient *in vivo*. **L'immunothérapie passive est une forme de thérapie de transfusion** qui consiste en l'injection de certains effecteurs du système immunitaire après sélection ou modification puis amplification *ex vivo*.

I.4.1 Les stratégies d'immunothérapie active

Son objectif est de moduler la réponse immunitaire afin que celle-ci puisse contrecarrer les mécanismes d'échappement mis en œuvre par les cellules tumorales avec la génération d'effecteurs spécifiques des tumeurs ainsi que de LT mémoires. Cette stimulation peut être aspécifique ou spécifique.

A) L'immunothérapie active aspécifique : l'injection de cytokines

Les cytokines sont des modulateurs immunitaires biologiques qui sont naturellement produits par de nombreux types cellulaires. Ce sont de petites protéines dont le rôle principal est celui de réguler l'inflammation et l'immunité. Les cytokines peuvent conduire à renforcer ou atténuer la réponse immunitaire (Banchereau et al., 2012). Bien que de nombreuses cytokines soient actuellement à l'étude dans l'immunothérapie du cancer, l'IL-2 et l'IFN- α ont été les mieux caractérisées et utilisées dans la lutte contre le cancer.

L'IL-2 active le système immunitaire en favorisant la prolifération et la différenciation des LT, LB et les NK. En outre, l'IL-2 augmente l'activité cytolytique des lymphocytes, en particulier les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL), et favorise l'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales (Rosenberg et al., 1985; Belldegrun et al., 1988).

L'IFN- α présente des propriétés anti-tumorales, ce qui a conduit à son utilisation dans le traitement d'une variété de cancer (Tarhini et al., 2012). L'IFN- α est un immunostimulant qui améliore la maturation et l'activation des DC, augmentant de ce fait la présentation antigénique aux cellules du système immunitaire et donc la mise en place d'une immunité

anti-tumorale (Wang et al., 2007). En outre, l'IFN- α favorise une réponse immunitaire T_{H1}, ce qui augmente l'immunité générée par les CTL induisant la lyse des cellules tumorales (Tarhini et al., 2012; Girart et al., 2007). L'IFN- α améliore également les activités cytotoxiques des cellules NK (Pfeffer et al., 1998).

Cette thérapie a montré, chez certains patients, une bonne réponse immune anti-tumorale mais elle entraîne de graves effets secondaires tels que des vomissements, de la fièvre, des malaises, de la diarrhée... Malgré les limitations dues à la toxicité engendrée par ces cytokines, elles sont encore largement utilisées en immunothérapie. La FDA a approuvé l'utilisation de ces deux cytokines dans le traitement des cancers (Alatrash et al., 2013) (tableau 1).

Tableau 1 : Cytokines approuvée par la FDA (Alatrash et al., 2013)

Traitement	Fonction biologique	Type de cancer	Année d'approbation par la FDA
IL-2	Activation du système immunitaire (LT et TIL)	Mélanome, cancer du rein	1992, 1998
IFN-α	Activation du système immunitaire (T _{H1} , DC, CPA)	Leucémie, mélanome, cancer de la prostate, lymphome non Hodgkinien	1996

L'administration locale de TNF- α , une cytokine inflammatoire importante, a montré des effets toxiques dirigés contre la tumeur et la vascularisation de celle-ci dans les sarcomes des tissus mous et les mélanomes. Cependant, comme le TNF- α est le médiateur principal du choc septique, il n'est délivré qu'en combinaison avec un agent alkylant et uniquement dans le membre atteint isolé du reste du corps du patient par circulation extracorporelle (Croft et al., 2013; Grunhagen et al., 2006).

Le GM-CSF a été identifié comme ayant des propriétés immunostimulantes élevées. Cette cytokine, bien connue comme induisant la différenciation et l'activation des cellules progénitrices hématopoïétiques, stimule la mobilisation et la fonctionnalité des DC. De ce fait, elle est largement utilisée en clinique pour les protocoles de vaccins à base de DC car la génération des DC est faite *in vitro* à partir de monocytes du sang circulants en présence de GM-CSF et d'IL- 4. D'autre part, une étude entreprise par le groupe du Dr. Gaborovich chez des patients atteints de mélanome a montré récemment que des injections répétées de GM-CSF permettent une maturation transitoire des DC *in vivo* avec, dans le meilleur des cas, une augmentation de la survie des patients (Daud et al., 2008).

B) L'immunothérapie active spécifique : Vaccination tumorale

- **Vaccination par les cellules dendritiques :** Comme il est bien établi que les DC sont les CPA les plus spécialisées dans l'activation de LT spécifiques d'antigènes, des essais récents ont utilisé des DC sensibilisées par des antigènes tumoraux, puis réinjectées aux patients. Des réponses immunitaires notamment LT CD8⁺ ont été obtenues mais elles restent de faible intensité et les essais cliniques de phase III n'ont pas réussi à démontrer le bénéfice clinique de cette approche par rapport aux traitements actuels de référence (Melief, 2008). Cet échec relatif pourrait s'expliquer par la faible migration des cellules dendritiques injectées dans les ganglions lymphatiques (organes lymphoïdes où les LT naïfs sont activés). Il existe de très nombreuses sous-populations de DC mais des critères objectifs sont en cours d'investigation afin de déterminer la population qui serait la plus efficace dans ces essais cliniques.

- **Vaccination par les cellules tumorales :** Une autre approche est l'utilisation de cellules tumorales entières comme source de matériel immunogène. Le principal avantage de ce type de vaccin est qu'il n'est pas limité par les restrictions de CMH et peut fournir une large gamme d'épitopes contre lesquels le système immunitaire peut monter une défense (Alatrash and Molldrem, 2011). Ces vaccins peuvent être autologues, en utilisant les cellules tumorales du patient qui recevra le vaccin, ou allogénique, en utilisant les cellules tumorales d'un autre patient. Une fois que les cellules tumorales autologues ou allogéniques sont obtenues, elles peuvent être irradiées et préparées pour l'immunisation, seules ou en combinaison avec un adjuvant tel que le GM-CSF. En clinique, cette approche a démontré son efficacité dans le traitement du cancer du rein, du mélanome et de la leucémie myéloïde aiguë, avec des vaccins de cellules tumorales tels que le M-Vax (Berd et al., 2001).

- **Vaccination peptidique :** Une des approches de vaccination les plus étudiées consiste en l'injection de peptides courts. Ces peptides, correspondant aux épitopes CD8⁺ dérivés d'antigènes tumoraux, se chargent de façon exogène sur les molécules de CMH-I afin d'activer directement les LT CD8⁺ spécifiques. Cependant, les résultats montrent que cette stratégie n'est pas optimale car elle induit un phénomène de tolérance plutôt qu'une immunité anti-tumorale. (Melief and van der Burg, 2008; Toes et al., 1996).

Ainsi, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies et les longs peptides synthétiques (SLP) de 25 à 40 acides aminés semblent être une alternative à l'utilisation des peptides courts (Melief and van der Burg, 2008). L'objectif de cette vaccination thérapeutique est d'induire une robuste immunité à médiation cellulaire, capable d'éliminer les cellules tumorales. Les SLP ne peuvent pas se charger directement sur les molécules de CMH-I et leur présentation aux LT CD8⁺ nécessite qu'ils soient internalisés, dégradés puis chargés avant d'être présentés par les DC ((Menager et al., 2014) en annexe). En théorie, cette stratégie permet également d'augmenter la durée de présentation de l'antigène ainsi que d'induire une réponse T CD4⁺ pouvant améliorer la réponse T CD8⁺. Ainsi, les SLP peuvent induire une réponse immunitaire très efficace aussi bien effectrice que mémoire. En pratique, des essais cliniques de phase I et II, consistant en l'injection de SLP chez des patients atteints de cancers induit par le papillomavirus humain (HPV) montrent des résultats très prometteurs (Kenter et al., 2009; Welters et al., 2010).

Cette liste n'est pas exhaustive, et les approches sont nombreuses (vaccins à base de vecteurs viraux ou à base d'acides nucléiques). Il existe à l'heure actuelle, plus de 50 vaccins anti-cancer qui sont à l'essai, dont plusieurs à des stades avancés d'expérimentation clinique (Alatrash et al., 2013; Stroncek et al., 2013).

I.4.2 Les stratégies d'immunothérapie passive :

Ces approches consistent à transférer des composantes de la réponse immunitaire spécifiques d'antigènes tumoraux isolées et amplifiées au préalable.

A) Les anticorps

La réponse immunitaire humorale est caractérisée par la production d'anticorps par les plasmocytes dérivant des LB mais ne semble pas jouer un rôle important dans l'établissement d'une immunité anti-tumorale efficace.

Néanmoins, depuis la fin du XX^{ème} siècle, le succès des anticorps thérapeutiques en cancérologie a constitué une avancée thérapeutique majeure. Ainsi des anticorps contre Her2/neu (trastuzumab : Herceptin®), CD20 (rituximab : Mabthera®), le récepteur de l'EGF (cetuximab : Erbitux®), CTLA-4 (ipilimumab : Yervoy®), PD1 (Topalian et al., 2012),

PDL-1 (Brahmer et al., 2012) ou le VEGF (bévacicumab : Avastin®) ont démontré leur efficacité et sont prescrits pour le traitement d'un nombre croissant de tumeurs (cancers du sein, mélanomes, lymphomes, tumeurs du colon, cancers du rein, tumeurs ORL, cancers du poumon, cf partie anticorps dans le chapitre RIT).

Leur action anti tumorale peut s'effectuer par différents mécanismes :

- Ainsi, lorsque l'anticorps s'est fixé sur sa cible tumorale, il peut entraîner une lyse de la cellule par un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) correspondant à la fixation de la portion Fc de l'anticorps sur le récepteur FcγRIIIa (CD16) exprimé par des macrophages ou des cellules NK. Les anticorps d'isotype IgG1 et IgG3 sont les seuls efficaces pour cette activité.

- Par ailleurs, la liaison de l'anticorps par son Fab (fragment antigen binding) sur des antigènes de la cellule tumorale peut entraîner la fixation de la protéine C1q sur le fragment Fc de l'anticorps, suivie par la cascade d'activation des protéines de la voie classique du complément, pour aboutir à la formation du complexe d'attaque membranaire capable de lyser la cellule tumorale (CDC, cytotoxicité dépendante du complément). Cette activation de la voie classique du complément libère aussi les facteurs chimiotactiques anaphylatoxiques C3a et C5a, capables de recruter des effecteurs immunologiques anti-tumoraux (neutrophiles, macrophages...) pro-inflammatoires. Les IgG1 et les IgG3 sont les isotypes activant le mieux la CDC.

- Après leur fixation, les anticorps peuvent également faciliter la présentation croisée par les CPA professionnelles après liaison aux récepteurs Fc de ces dernières.

- Enfin, les anticorps peuvent être utilisés comme des agents bloquant de certains points de contrôle (checkpoint). Le système immunitaire possède des points de contrôle pour empêcher l'auto-immunité et arrêter les réponses immunitaires. Cependant, les tumeurs peuvent profiter de ces points de contrôle en diminuant la réponse immunitaire naturelle du corps et ainsi échapper à la détection. Etant donné que bon nombre de ces points de contrôle sont initiés par des interactions ligand-récepteur, des anticorps ont été générés pour bloquer les interactions entre les ligands sur des tumeurs et de leurs récepteurs sur les cellules immunitaires. Les antigènes CTLA-4 et PD1 sont les deux récepteurs les plus étudiés en laboratoire et dans les essais cliniques évaluant des anticorps bloquant (Alatrash et al., 2013).

B) Le transfert adoptif de lymphocytes T (ACT)

Le transfert adoptif de lymphocytes T (ACT) consiste à transférer des populations de LT sélectionnés d'origine naturelle dont l'expansion a été faite *ex vivo* à partir de biopsies de patients atteints de cancers métastatiques.

- **Injection de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) :** Le bénéfice potentiel du transfert de cellules immunitaires dans les patients atteints de cancer est reconnu depuis de nombreuses années. Des études menées par le groupe de Rosenberg entre 1988 et 1994 ont été les premières à utiliser des TIL en association avec de l'IL-2 pour traiter des patients atteints de mélanome métastatiques (Rosenberg et al., 1994). Sur un total de 86 patients inclus dans l'étude, le suivi a montré 34% de réponses objectives (OR) avec 28% de rémissions partielles (PR) et 6% de réponses complètes (CR). Un des problèmes majeurs de ces essais était la survie des cellules transférées. Après 1 semaine, les TIL injectés représentaient seulement 0,1 % des cellules circulantes, et ce, malgré le fait que 80 % des patients avaient reçu un ACT de plus de 10^{11} cellules (Rosenberg et al., 1990).

- **La lymphodéplétion :** Cette survie transitoire des TIL a conduit à l'émergence d'études combinant la chimiothérapie provoquant une lymphodéplétion avant l'administration des TIL. La lymphodéplétion peut être induite par un certain nombre de molécules de chimiothérapie mais également par une irradiation corporelle totale (TBI). Cette association a montré une persistance accrue de la repopulation clonale des LT injectés après la lymphodéplétion. Trois protocoles successifs incluant l'induction d'une lymphodéplétion avant l'injection de TIL autologues et d'IL-2 a donné des résultats cliniques remarquables avec des réponses objectives chez près de 50% des patients atteints de mélanome métastatique (Rosenberg and Dudley, 2009; Dudley et al., 2005; 2002; 2008). Quatre vingt treize patients ont été inclus dans cette étude. Dans le premier protocole, 43 patients ont reçu une chimiothérapie non myéloablatrice par cyclophosphamide et fludarabine dans les sept jours précédant le début de l'injection des TIL. Dans chacun des deux autres essais, 25 patients ont été traités par irradiation en plus de ce protocole de chimiothérapie. Dans ce cas, le traitement était myéloablatif et des cellules hématopoïétiques ont également été administrées aux malades. Le taux de réponse objective observée était de 49% (OR : 21/43 dont PR : 17/43 et CR : 4/43) chez les patients ayant reçu exclusivement la chimiothérapie pour induire la lymphodéplétion, 52 % chez ceux irradiés à 2 Gy (OR : 13/25 dont PR : 11/25 et CR : 2/25) et 72% à 12 Gy (OR : 18/25 dont PR : 14/25 et CR : 4/25). Une étude de suivi menée par

Rosenberg montre que sur les 93 patients, 22 % (20/93 dont 5 sans TBI, 5 à 2 Gy et 10 à 12 Gy) ont obtenu une réponse complète (Rosenberg et al., 2011).

- Injection de clones de LT spécifiques d'antigènes de tumeur : L'identification de multiples TAA de mélanome reconnu par les LT a permis le développement de stratégies de transfert adoptif ciblant spécifiquement ces antigènes de tumeur. Cette approche permet d'injecter un grand nombre de lymphocytes spécifiques de la tumeur et d'étudier leur persistance *in vivo*. La plupart des essais menés repose sur l'injection de LT CD8⁺ compte tenu de leur cytotoxicité directe vis-à-vis des cellules tumorales. Les groupes de Greenberg et Jotereau ont conduit des essais de transfert adoptif de clones T CD8⁺ spécifiques des antigènes tumoraux gp100 ou Melan-A (Vignard et al., 2005; Yee et al., 2002; Khammari et al., 2009). L'essai réalisé par l'équipe du Pr. Jotereau chez des patients atteints de mélanome de stade IV a montré que les clones injectés (spécifiques du complexe CMH-peptide : Melan-A/HLA-A2) pouvaient être retrouvés dans le sang des malades jusqu'à 60 jours après l'injection. De plus, les résultats obtenus montrent l'apparition de nouveaux clonotypes spécifiques du même complexe CMH-peptide, probablement induit suite à l'ACT par un phénomène de répertoire « spreading » (Vignard et al., 2005).

Les toxicités associées aux traitements utilisant les TIL ou les clones T ont été minimales. La plupart des effets toxiques étaient attribuables à l'IL-2 et la TBI. Malgré ces résultats prometteurs, l'utilisation de TIL a ses limites. Les inconvénients majeurs sont le coût et le temps associés à la production des TIL en raison de leur provenance unique (Restifo et al., 2012). De plus, l'obtention d'un nombre suffisant de TIL peut s'avérer difficile en raison de la perte de cellules se produisant suite à la purification des TIL.

C) Le transfert adoptif de populations de cellules T modifiées génétiquement pour exprimer les CAR (chimeric antigen receptors)

En raison des limites posées par la génération des TIL autologues, des approches utilisant des populations de LT génétiquement modifiés pour l'ACT ont été menées. L'une des plus prometteuse est le développement de récepteurs d'antigènes chimériques (CAR).

La modification des LT par l'introduction de CAR est une approche alternative pour rediriger la spécificité des cellules T contre la cible désirée (Gross et al., 1989). Les CAR sont des polypeptides formés de trois parties distinctes (figure 13) :

- une partie extracellulaire reconnaissant la cible, générée à partir d'un fragment variable (scFv, single chain variable fragment) dérivé d'un anticorps, bien que des ligands naturels soient également utilisés (Hegde et al., 2013).

- une partie transmembranaire qui ancre le polypeptide dans la membrane cellulaire. Celle-ci est le plus souvent dérivée de molécules impliquées dans la fonction des LT comme la molécule CD8 ou CD28.

- une partie intracellulaire de signalisation qui transmet les signaux d'activation. Elle se compose presque toujours de la chaîne ζ du complexe de transduction CD3 associé au TCR et responsable de la transmission des signaux d'activation dans la cellule suite à l'engagement du TCR. Les différentes «générations» de CAR diffèrent dans la composition du domaine de signalisation intracellulaire. Les CAR de première génération ne comprennent que la chaîne CD3 ζ , alors que les CAR de seconde génération comprennent un domaine de co-stimulation unique dérivé soit de la molécule CD28 ou 4-1BB. Les CAR de troisième génération comprennent deux domaines de co-stimulation tels que CD28 et 4-1BB ou d'autres molécules co-stimulatrices (figure 13).

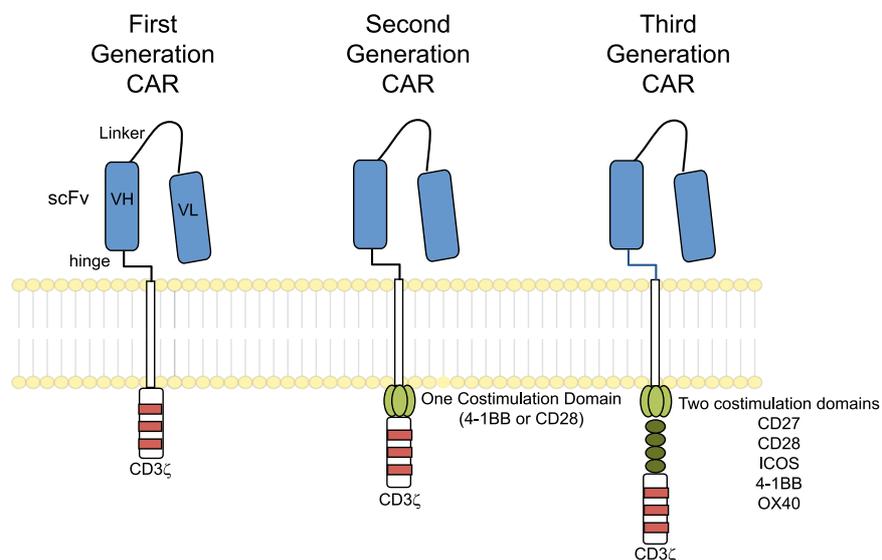


Figure 13 : Représentation schématique des CAR (Maus et al., 2014)

Les LT peuvent être modifiées pour exprimer des CAR qui reconnaissent des TAA. Les CAR sont constituées d'une partie extracellulaire qui est généralement dérivée d'un anticorps, d'une région transmembranaire, et d'une partie intracellulaire dérivée de protéines de signalisation des LT. Les CAR de première génération contiennent le CD3 ζ , tandis que les CAR de deuxième génération possèdent un domaine de co-stimulation (par exemple, 4-1BB ou CD28) liée au CD3 ζ . Les CAR de troisième génération sont constitués de deux domaines condensés de co-stimulation, telles que CD28 et 4-1BB, liés au CD3 ζ .

Les CAR sont ensuite génétiquement introduits dans les LT pour améliorer leur activation et leur spécificité vis à vis de l'antigène qui est exprimé à la surface des cellules tumorales (Restifo et al., 2012). La stratégie utilisant les CAR peut potentiellement permettre l'amélioration de la réponse anti-tumorale menée par les LT non modifiés. Étant donné que les réponses des LT sont dépendantes de l'affinité du TCR pour l'antigène, une façon d'améliorer cette réaction est d'augmenter l'affinité du CAR pour le TAA. Des comparaisons directes de scFv de haute et basse affinités ont démontré de meilleures réponses des CAR avec un scFv de haute affinité, en particulier lorsque la densité de l'antigène est faible (Kershaw et al., 2013). Contrairement aux TCR $\alpha\beta$, les CAR engagent des structures moléculaires de surface indépendamment de l'apprêtement de l'antigène par la cellule tumorale et de la restriction au CMH. Les LT modifiés par les CAR ne sont donc pas touchés par les mécanismes d'échappement tumoral impliquant des altérations de l'apprêtement de l'antigène ou du CMH (Kalos and June, 2013).

Les études *in vitro* et *in vivo* ont démontré qu'en réponse à l'antigène cible, les LT modifiés par les CAR de deuxième ou troisième génération montrent généralement une prolifération prolongée, une production accrue de cytokines et une activité cytotoxique anti-tumorale plus importante. Une étude sur des modèles murins comparant les CAR de première et deuxième génération a démontré une plus grande persistance des LT exprimant un CAR CD28/CD3 ζ par rapport aux LT transduits seulement par un CAR CD3 ζ (Savoldo et al., 2011). Les CAR de troisième génération montrent généralement de meilleurs attributs pour les cellules T que ceux de deuxième génération en raison d'un effet synergique des trois domaines de signalisation (Tamma et al., 2010). À l'heure actuelle, les CAR de deuxième génération sont préférentiellement utilisés en raison de potentiels problèmes liés à la signalisation des CAR de troisième génération qui présentent un faible seuil d'activation et donc une possible réactivité croisée avec des molécules similaires exprimées par les cellules normales (Kershaw et al., 2013). Comme pour les molécules de co-stimulation il est difficile de conclure si l'un est meilleur que l'autre. Plusieurs observations indiquent que la transduction de CD28 augmente de manière significative la production d'IL-2 par rapport à l'inclusion d'autres molécules. L'utilisation du domaine de signalisation du CD137 peut améliorer la survie, et l'utilisation de la signalisation ICOS semble la plus efficace dans la lyse des cellules tumorales cibles (Finney et al., 2004; Milone et al., 2009; Shen et al., 2013).

L'efficacité et la sécurité de l'ACT de LT modifié par les CAR ont été évaluées en clinique dans de multiples contextes oncologiques. Actuellement, environ 30 essais cliniques sont en cours d'évaluation (<http://clinicaltrials.gov/>). Les analyses des premières études cliniques (Phase I/II) montrent des résultats encourageants dans le traitement de maladies hématologiques et de quelques tumeurs solides (Kershaw et al., 2013). À ce jour, les observations cliniques les plus encourageants ont été obtenus chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC) et de lymphome traités par les LT avec un CAR ciblant le CD19 (CAR-CD19) (Kochenderfer and Rosenberg, 2013). Le CD19 est exprimé dans la plupart des leucémies à cellules B et des lymphomes tout en étant absent des cellules autres que les B. Le groupe du Dr. June a montré que 2 patients sur 3 atteints de LLC réfractaire recevant une thérapie de LT modifiés par des CAR-CD19 ont obtenu une réponse complète, le troisième ayant une réponse partielle (Porter et al., 2011). Les études utilisant les CAR-CD19 représentent un tiers des essais cliniques en cours (Han et al., 2013). En plus du CD19, d'autres molécules telles que le CD20, CD22, CD30 et CD33 sont également testés pour dans différentes affections malignes hématologiques (Haso et al., 2013; Xu et al., 2013). En parallèle avec les essais cliniques dans les hémopathies malignes, le traitement par les CAR a été réalisé dans les tumeurs solides. L'équipe du Dr. Lamers a généré un CAR ciblant l'anhydrase carbonique IX (CAIX) pour traiter le carcinome rénal métastatique. Aucune réponse clinique objective n'a été observée chez les patients traités (Lamers et al., 2013). Le ciblage des tumeurs solides est plus difficile par rapport aux hémopathies malignes en raison des cibles antigéniques plus rares, d'une faible infiltration des cellules T vers le site de la tumeur, et d'une cytotoxicité moins importante dans le microenvironnement immunosuppresseur de la tumeur.

Malgré les protocoles différents comptant de faibles effectifs, les essais de phases I/II ont démontré la faisabilité et la sécurité de l'immunothérapie à base de CAR pour le traitement de certains types de cancer. Alors que les effets indésirables sont généralement tolérables, l'efficacité clinique des CAR de première génération est souvent insuffisante. Les CAR de deuxième et troisième génération ont démontré une efficacité améliorée et une réponse durable.

La figure 14 résume les stratégies d'immunothérapie utilisées actuellement.

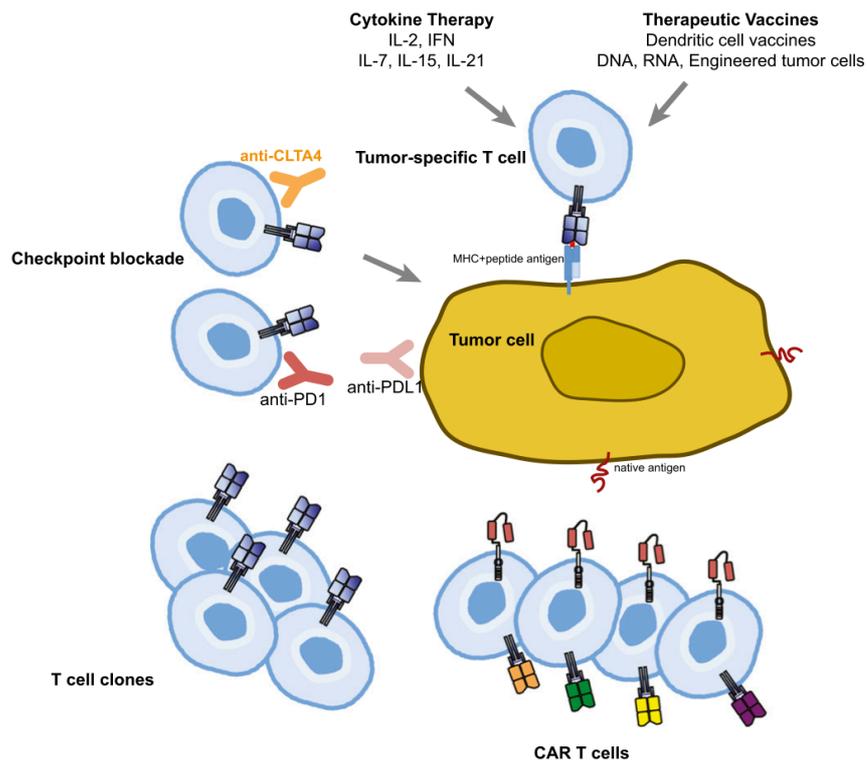


Figure 14 : Les approches thérapeutiques d'immunothérapie des cancers. (Maus et al., 2014)

Les cytokines et les vaccins peuvent être utilisés pour augmenter les réponses des lymphocytes T naturels à la tumeur. Les anticorps dirigés contre les molécules de régulation négative, tels que PD1 et CTLA-4 peuvent être utilisés pour potentialiser l'action des cellules T réactives à la tumeur naturelles. Les stratégies de transfert adoptif des lymphocytes T utilisant des LT cytotoxiques clonés puis expansés ou des LT modifiées pour exprimer des CAR sont testées.

Chapitre II : La radioimmunothérapie

II.1 Généralités

De la découverte des rayonnements ionisants à la radioimmunothérapie (RIT).

En 1895, le physicien allemand Wilhelm Conrad Röntgen fut le premier à produire et détecter un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde correspondant aux rayons X modernes. Ceci marqua le début d'une décennie de découvertes pionnières dans le même domaine, y compris celui de la radioactivité naturelle par le physicien français Henri Becquerel (la même année) ainsi que celle du radium comme source naturelle de rayons γ par la physicienne et chimiste Marie Curie (en 1898) (Brown and Giaccia, 1998; Bernier et al., 2004). En 1903, l'Académie royale suédoise des Sciences attribue à Henri Becquerel, Marie et Pierre Curie le prix Nobel de physique, «en reconnaissance des services extraordinaires qu'ils ont rendus par leurs recherches conjointes sur les phénomènes de rayonnement." (Bernier et al., 2004). Toujours en 1895, après la découverte de Röntgen, le médecin américain Emil Grubbe utilisa les rayons X pour traiter une femme portant un carcinome du sein récurrent, inaugurant ainsi l'utilisation des rayonnements ionisants en oncologie (Bernier et al., 2004). Par la suite, en 1937, l'idée d'utiliser la radioactivité en médecine prit corps, à la suite d'une demande d'endocrinologues du Massachusetts General Hospital (Boston, Etats Unis). Ils ne disposaient pas de moyens d'investigations directs de la fonction thyroïdienne. Les physiciens nucléaires produiront des isotopes radioactifs de l'iode, élément qui présente de façon intrinsèque un fort tropisme pour la thyroïde. Le but premier de cette collaboration entre physiciens et médecin fut le traitement de la maladie hyperthyroïdienne et du cancer thyroïdien. Ainsi, la première dose thérapeutique d'iode radioactif (iode-130) fut injectée en janvier 1941 dans un cas de maladie de Basedow. Grâce à des caractéristiques physiques plus appropriées, l'iode-131 va devenir rapidement le principal radionucléide qui entrainera l'essor des explorations radioisotopiques donnant naissance à la spécialité de médecine nucléaire (<http://www.md.ucl.ac.be/histoire/livre/mnuc.pdf>).

Par la suite, la RIT a vu le jour. Cette stratégie thérapeutique issue de la médecine nucléaire s'intègre pleinement dans l'arsenal des thérapeutiques anticancéreuses hautement ciblées.

II.2 Principe de la radioimmunothérapie

Le concept de la thérapie ciblée pour le traitement d'agents pathogènes a d'abord été postulée par Paul Ehrlich il y a plus de 100 ans. Il prévoyait la création d'un agent thérapeutique idéal appelé « magic bullets » qui reconnaîtrait directement des cibles cellulaires spécifiques dans le but d'éradiquer la maladie (Schwartz, 2004). La vision d'Ehrlich est maintenant en cours de réalisation dans le traitement du cancer avec le développement de thérapies ciblées, principalement basée sur l'utilisation des anticorps monoclonaux (AcM).

La RIT est une thérapeutique anticancéreuse de radiothérapie interne visant à placer une source radioactive directement au contact des cellules tumorales. La RIT offre la possibilité de traiter des maladies disséminées, des tumeurs localisées et/ou diffuses tout en minimisant l'exposition des tissus sains aux rayonnements ionisants avec une toxicité limitée. Le concept de radio-marquage d'un vecteur dirigé contre les cellules tumorales n'est pas nouveau et a d'abord été décrit au début des années 1950 (Pressman and Korngold, 1953).

La RIT est une combinaison de trois éléments qui associe un agent immunologique de vectorisation (par exemple, un anticorps monoclonal ou un fragment d'anticorps) à un radionucléide émetteur de particules α , β^- ou Auger, ce couplage nécessitant le plus souvent l'intermédiaire d'un agent chélatant approprié (figure 15). Ceci permet de produire un radioimmunoconjugué stable qui restera intact après administration.

La suite de ce chapitre expose les éléments conditionnant l'efficacité de la RIT (figure 16) à savoir les caractéristiques 1) de la tumeur (radiosensibilité, taille, vascularisation, prolifération), 2) de l'antigène ciblé (localisation, niveau d'expression), 3) du vecteur immunologique en n'abordant que les anticorps (spécificité, affinité, immunoréactivité), et 4) des différents radionucléides disponibles (période, émission) en se focalisant principalement sur les particules alpha et donc la RIT α .

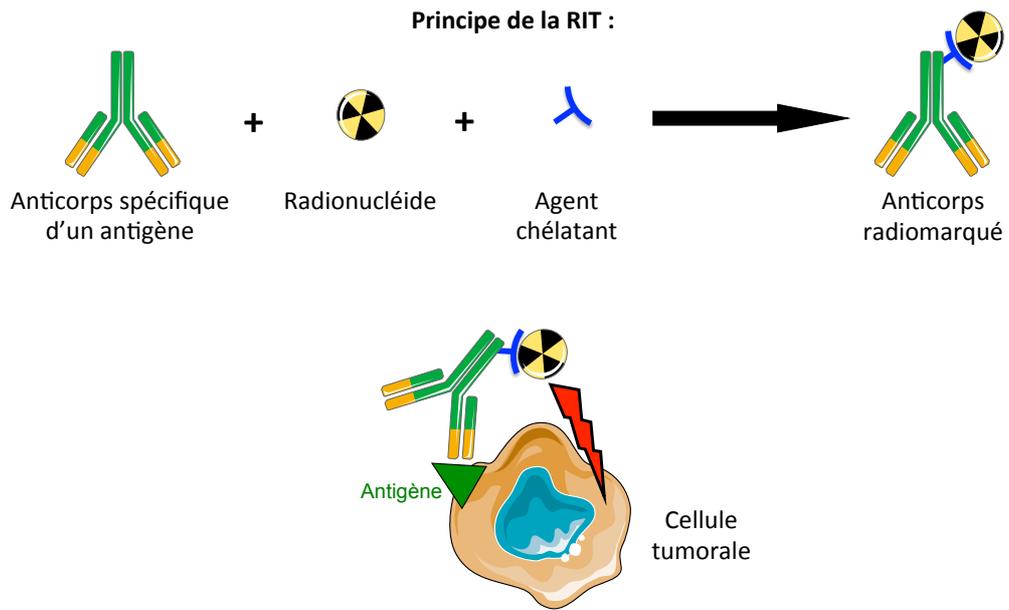


Figure 15 : Schéma de la RIT réalisée avec un anticorps radiomarqué ciblant la cellule tumorale

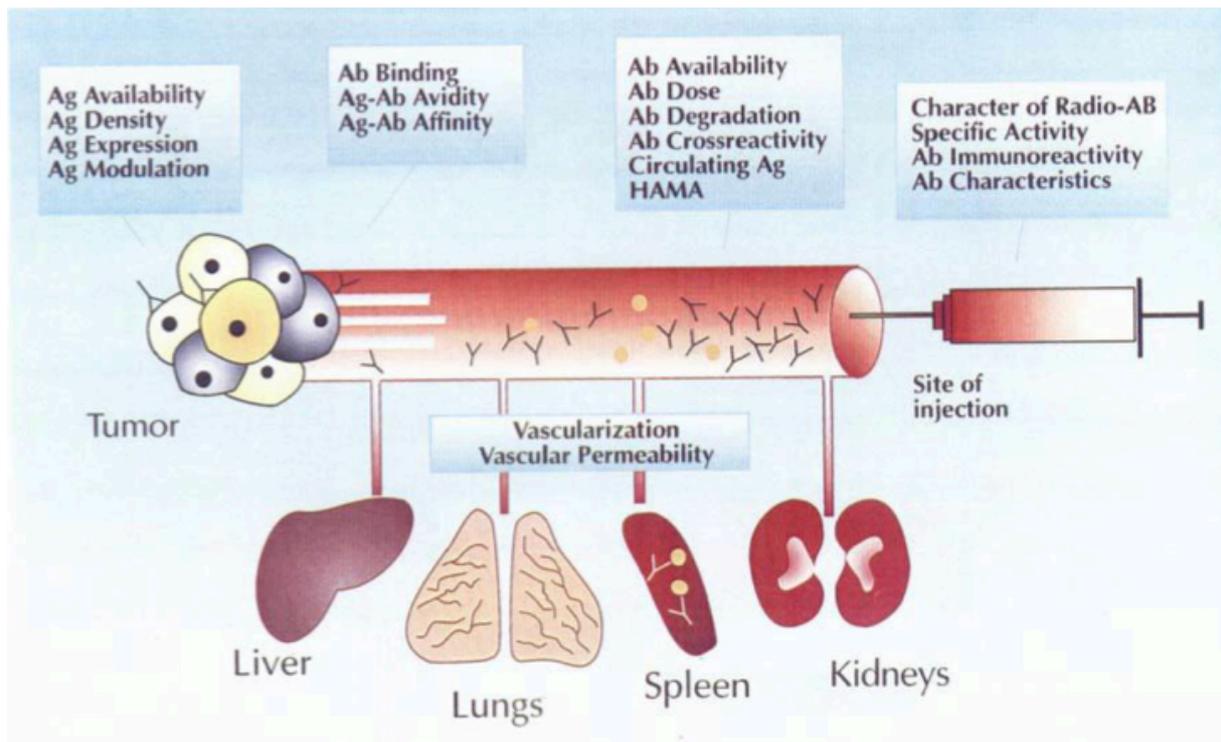


Figure 16 : Représentation schématique des différents facteurs impliqués dans l'efficacité de la RIT (Stigbrand et al., 1996)

II.2.1 La cible tumorale

A) Nature de la cible tumorale

Différents paramètres liés à la nature de la tumeur conditionnent la réponse clinique à l'irradiation. En effet, l'efficacité thérapeutique dépend directement de la capacité du radioimmunoconjugué (utilisé en RIT) à atteindre en quantité suffisante sa cible. Au terme de son trajet vasculaire, l'anticorps radiomarqué doit traverser la paroi d'un capillaire et être distribué dans le compartiment interstitiel afin d'atteindre finalement les cellules tumorales.

- **La nature de la cible tumorale conditionne l'accessibilité du vecteur :** Au cours de son développement, la tumeur présente des besoins métaboliques nécessitant l'apparition d'une néovascularisation (angiogenèse). Cette angiogenèse présente des caractéristiques différentes de la vascularisation physiologique. Le taux de prolifération tumoral étant plus important dans les tumeurs solides que la néo-angiogenèse, on observe une réduction de la densité vasculaire au centre de la tumeur laissant apparaître des cellules distantes de plus de 100 μm du vaisseau sanguin le plus proche (Less et al., 1991). Cette distance relativement grande ajoutée à la pression exercée par la tumeur sur les vaisseaux (Padera et al., 2004) expliquent l'apparition d'une zone hypoxique et nécrotique au centre de la tumeur (figure 17). De plus, la néovascularisation tumorale est hétérogène et se développe de façon anarchique avec la présence de capillaires fenêtrés (perforés de pores d'environ 100 nm, avec une lame basale continue), non fenêtrés et discontinus (possédant de véritables orifices trans-cytoplasmiques de 1 à 3 μm , leur membrane basale est discontinue, voire absente), de vaisseaux sans revêtement endothélial, de bourgeons capillaires et de shunts artério-veineux (Less et al., 1991) (figure 17). De façon globale, à la différence des vaisseaux normaux, les vaisseaux tumoraux sont dilatés, sacculaires, tortueux et peuvent contenir des cellules tumorales dans leur revêtement endothélial (figure 17). L'espace vasculaire des tumeurs varie de 1 à 20% en fonction du type et de la taille de la tumeur. Dans cet espace vasculaire désorganisé, le flux sanguin est en moyenne diminué par rapport aux tissus sains et cette diminution peut varier exponentiellement avec l'augmentation de la taille des tumeurs. Toutefois, les flux sont très hétérogènes avec une zone nécrotique au centre de la masse tumorale qui est peu vascularisée et une zone bien vascularisée en périphérie où le flux sanguin est même plus élevé que dans les tissus normaux adjacents à la tumeur. Au niveau microscopique, la même hétérogénéité est retrouvée avec un flux sanguin intermittent

comprenant des périodes de flux ralenti voire arrêté et des périodes de reprise d'un flux significatif parfois de direction opposé. Il apparaît ainsi que le flux sanguin hétérogène contribue à une distribution elle-même hétérogène de macromolécules telles que les anticorps (figure 18) (Minchinton and Tannock, 2006; Jain et al., 2002).

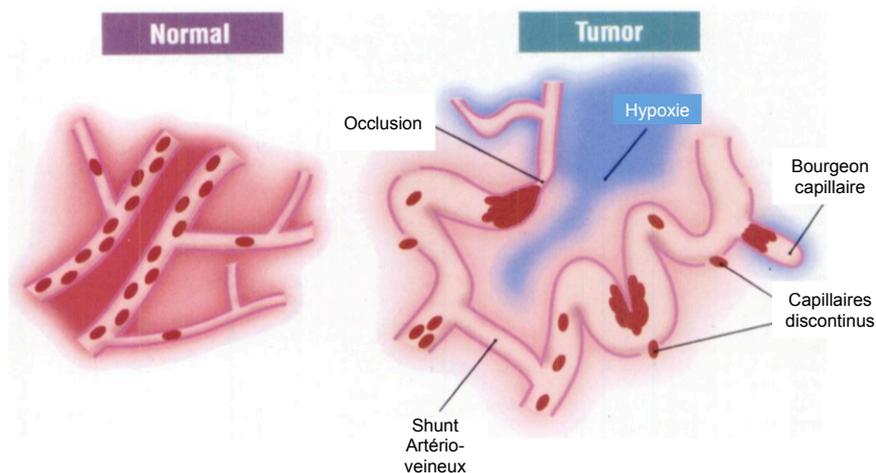


Figure 17 : Vascularisation tumorale (Brown and Giaccia, 1998)

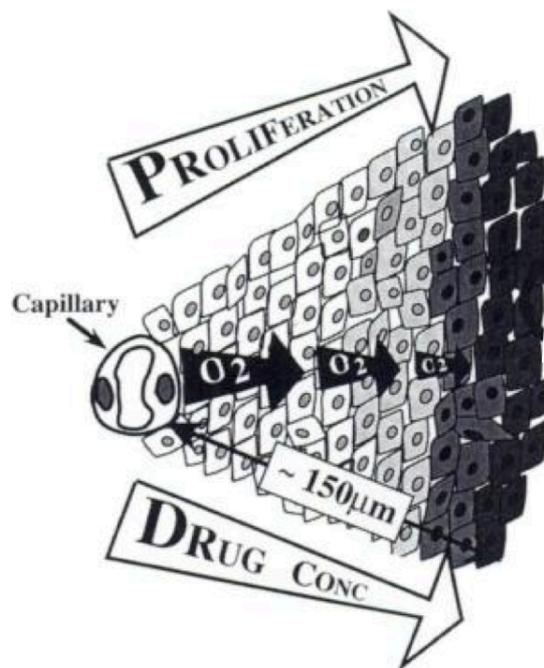


Figure 18 : Physiopathologie tumorale (Brown and Giaccia, 1998)

Avant d'atteindre son site d'action, l'anticorps radiomarqué doit traverser la paroi vasculaire. Cette étape d'extravasation s'effectue suivant un mécanisme de diffusion

(minoritaire) ou de convection (majoritaire). L'extravasation par diffusion, qui suit la loi de Fick, est proportionnelle à la surface d'échange du capillaire et à la différence de concentration de l'anticorps radiomarqué entre le milieu plasmatique et le milieu interstitiel. Du fait de la structure particulière des vaisseaux tumoraux caractérisés par l'absence de membrane basale et la présence d'espaces nombreux entre les cellules endothéliales, le coefficient de diffusion est habituellement grand. La convection est le mécanisme prépondérant d'extravasation des molécules d'anticorps à travers la paroi des vaisseaux (Davies et al., 2002). Elle dépend du débit d'extravasation du plasma du vaisseau vers le compartiment interstitiel. Ce débit est lui même proportionnel à la surface hydrostatique entre le vaisseau et le compartiment interstitiel ainsi que de la différence de pression osmotique entre les deux compartiments. Des études montrent que la pression interstitielle au centre des tumeurs est supérieure à celle des tissus normaux et qu'elle est plus faible à la périphérie où elle se rapproche des valeurs des tissus normaux (Leu et al., 2000). Ainsi, on observe une diminution de l'extravasation du plasma et donc des molécules d'anticorps radiomarqués.

Il est possible d'augmenter le passage transmembranaire des anticorps par l'utilisation d'agents physiques (chaleur) ou chimiques (médicaments vasoactifs), ceux-ci vont pouvoir augmenter transitoirement le flux sanguin et la perméabilité vasculaire de la tumeur (Hauck and Zalutsky, 1998). D'autres approches visent à diminuer la pression interstitielle dans la tumeur afin d'améliorer la distribution locale de l'anticorps comme l'utilisation de hyaluronidase ou du TNF α (Jain et al., 2007).

- La nature de la cible tumorale conditionne sa radiosensibilité : Dans le cas de la thérapie, l'efficacité dépend de la radiosensibilité de la tumeur qui est directement liée aux capacités intrinsèques de la cellule à réparer les dommages causés par un rayonnement ionisant. Il existe une corrélation entre la vitesse de croissance de la tumeur et la résistance à l'irradiation. Ainsi, les métastases à croissance rapide sont plus sensibles à l'irradiation que les métastases à croissance lente. De plus, chaque type de cellule diffère quant à sa capacité de réparation des lésions potentiellement létales ou sublétales radio-induites.

La radiosensibilité intrinsèque varie entre les différents types histologiques mais aussi au cours de la croissance tumorale. Par exemple, le neuroblastome ou le cancer du poumon à petites cellules sont réputés très radiosensibles alors que les cancers coliques sont relativement radiorésistants. Il est à noter que la zone centrale nécrotique de la tumeur est hypoxique et donc plus radiorésistante.

B) Nature de l'antigène tumoral

Afin que la reconnaissance de l'anticorps soit optimale sur la cellule tumorale, l'antigène ciblé en RIT doit répondre à certains critères. *Idéalement*, l'antigène ciblé ne doit pas être sécrété, il doit être accessible, exprimé fortement de façon constante et homogène à la surface de la cellule tumorale, à l'exclusion de toute autre cellule saine. Ils peuvent être exprimés de façon physiologique par certains tissus ou au cours de processus variés comme l'inflammation. Toutefois, la cellule cancéreuse doit les exprimer en densité beaucoup plus importante. L'ensemble de ces conditions théoriques sont difficiles à obtenir car la plupart du temps, les antigènes ne sont pas spécifiques d'une tumeur et sont exprimés de façon physiologique par les cellules saines. De plus, l'expression d'un même antigène peut varier entre les cellules d'une même tumeur et entre deux masses tumorales présentes chez un même individu, par exemple la tumeur primitive et une métastase.

Les antigènes spécifiques de tumeur (TAA) reconnus par les anticorps utilisés en RIT sont sensiblement les mêmes que ceux reconnus après leur apprêtement par les LT. Les 5 mêmes catégories de TAA sont retrouvées (cf chapitre I, I.3.2 immunité adaptative, partie A Les antigènes de tumeurs), à savoir, les antigènes mutés ou d'expression aberrante, les antigènes « cancer-testis », les antigènes surexprimés, les antigènes de différenciation et les antigènes onco-viraux (Scott et al., 2012; Pillay et al., 2011)

La RIT peut, en plus des antigènes directement exprimés par la cellule tumorale, cibler des antigènes présents dans le microenvironnement tumoral comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) responsable de la néo-vascularisation tumorale (Chen et al., 2006).

II.2.2 le vecteur immunologique : l'anticorps

La réussite de la RIT dépend notamment des propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques du vecteur immunologique, à savoir l'anticorps, d'où l'importance d'étudier la structures et les caractéristiques des immunoglobulines. Etant donné que nous utilisons en RIT un anticorps, nous nous intéresserons donc principalement à ce vecteur même si d'autres types de molécules peuvent être utilisés (Fab, F(ab')₂, peptides,...).

A) Structure et caractéristiques :

Les molécules d'anticorps ont une structure commune formée de quatre chaînes polypeptidiques. (figure 19) Cette structure est constituée de deux chaînes légères (L pour Light) identiques, qui sont des polypeptides d'une masse moléculaire de 22 000 environ, et de deux chaînes lourdes (H pour Heavy) identiques, qui sont de plus gros polypeptides d'une masse moléculaire de 55 000 ou plus. Chaque chaîne légère est liée à une chaîne lourde par une liaison disulfure et par un ensemble d'interactions non covalentes telles que les liaisons salines, les liaisons hydrogènes et les liaisons hydrophobes pour former un hétérodimère (H-L). Ces mêmes types d'interaction non covalentes et des liaisons disulfure lient l'une à l'autre les deux combinaisons identiques d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère (H-L) pour former la structure immunoglobulinique de base à quatre chaînes, le dimère (H-L)₂.

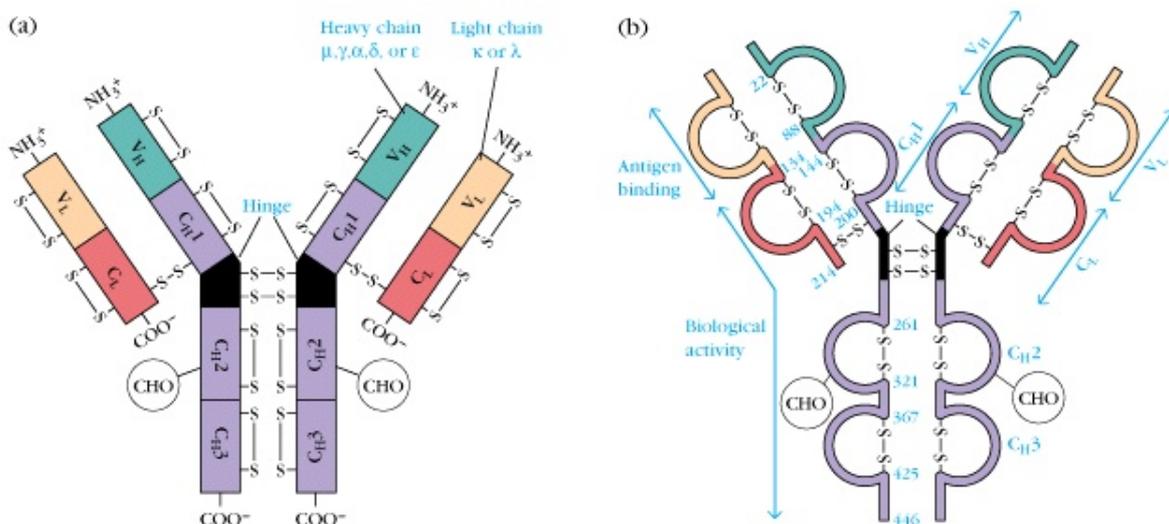


Figure 19 : Représentation schématique de la structure des immunoglobulines (Immunologie, le cours de Janis Kuby)

(a) Chaque chaîne lourde et chaque chaîne légère d'une molécule d'immunoglobuline contient une région amino terminale variable (V) constituée de 100-110 amino acides et qui diffère d'un anticorps à un autre. Le reste de chaque chaîne de la molécule, les régions constantes (C, en rouge et violet), présente une variation limitée qui définit les deux sous types des chaînes légères et les 5 sous classes de chaînes lourdes. Certaines chaînes lourdes (γ , δ et α) contiennent aussi une région charnière (en noire). (b) Les chaînes lourdes et légères sont repliées en domaines. Les domaines amino terminaux, correspondant aux régions V, se fixent à l'antigène ; les fonctions effectrices sont médiées par les autres domaines

Les 110 premiers acides aminés environ de la région amino-terminale d'une chaîne légère ou d'une chaîne lourde sont très variables entre les anticorps de spécificité différente. Ces segments de séquence très variable sont appelés région V : V_L dans les chaînes légères et V_H dans les chaînes lourdes. Toutes les différences de spécificité présentées par les différents anticorps peuvent être rapportées à ces différences dans la séquence des acides aminés des régions V. L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde (V_H) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère (V_L) définit la région Fab (Fragment antigen binding) contenant le domaine de reconnaissance de l'antigène, le paratope. De façon plus précise, la plupart des différences des régions variables entre les anticorps sont situées à l'intérieur de zones appelées régions de complémentarité (CDR, complementarity determining region), ce sont ces CDR, tant dans les chaînes légères que dans les chaînes lourdes, qui constituent le site de liaison à l'antigène de la molécule d'immunoglobuline (figure 20). Les 6 régions CDR (3 pour la V_L et 3 pour la V_H) forment le paratope. La région reconnue par le paratope au niveau de l'antigène est appelée épitope.

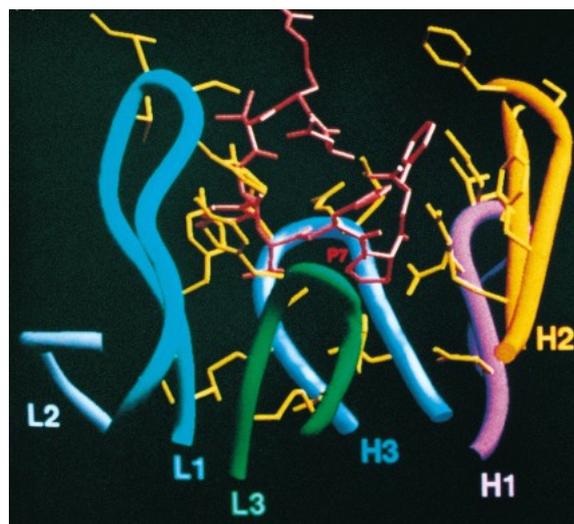


Figure 20 : Représentation en 3 dimensions des régions CDR (Immunologie, le cours de Janis Kuby)

Le peptide est en rouge. Les trois CDR de chaîne lourde (H1, H2, H3) et les trois CDR de chaîne légère (L1, L2, L3) sont représentés dans une couleur différente. Tous les six CDR contiennent des chaînes latérales en jaune

Les régions de séquences relativement constantes font suite aux régions variables et ont été nommées régions C, C_L pour les chaînes légères et C_H pour les chaînes lourdes. Les domaines constants des chaînes lourdes forment la région Fc (fragment cristallisable) et ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, mais interviennent, dans la liaison aux cellules immunitaires par leur fixation aux récepteurs Fc des immunoglobulines, dans l'activation de l'ADCC et dans l'activation du système du complément (CDC).

Pour les anticorps, on retrouve deux types de chaînes légères, kappa (κ) et lambda (λ). Chez l'homme, 60% des chaînes légères sont de type kappa et 40% de type lambda, tandis que chez la souris, 95% des chaînes légères sont de type kappa et seulement 5% de type lambda. Une molécule d'anticorps contient un seul type de chaîne légère, soit des chaînes légères κ , soit des chaînes légères λ , mais jamais les deux.

Les chaînes lourdes varient selon 5 profils différents correspondant aux cinq régions constantes (C) des différentes chaînes lourdes : alpha (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gamma (γ), et mu (μ). Chacune de ces différentes chaînes lourdes est appelée isotype. La longueur des régions constantes est approximativement de 330 acides aminés pour les chaînes α , δ , et γ et de 440 amino acides pour les chaînes ϵ et μ . Les chaînes lourdes d'une molécule d'anticorps donnée détermine la classe de cet anticorps : IgA (α), IgD (δ), IgE (ϵ), IgG (γ) ou IgM (μ). Chaque chaîne lourde, quelque soit son isotype, peut s'associer à des chaînes légères κ ou λ .

Chaque classe se distinguant par des séquences uniques en acides aminés dans la région constante de la chaîne lourde, cela leur confère une structure spécifique et des propriétés fonctionnelles propres à la classe (tableau 2).

Tableau 2 : Propriétés des différents types d'immunoglobulines

	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Type de chaîne lourde	γ	μ	α	ϵ	δ
Type de chaîne légère	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ
Localisation	Sang	Sang, lymphocyte B	Sécrétion (salive, mucus, lait,...)	Basophiles et mastocytes	Lymphocyte B
Concentration plasmatique	8 – 18 g/L	0,75 – 2,6 g/L	0,9 – 4,5 g/L	< 0,1 g/L	0,03 – 0,35 g/L
Proportion	80% des Ig sériques	5 à 10% des Ig sériques	10 à 15% des Ig sériques	< 1%	0,2 % des Ig sériques
Demi-vie plasmatique	3 semaines	5 jours	6 jours	2 à 3 jours	4 jours
Forme sérique	Monomère	Pentamère	Dimère	Monomère	Monomère
Poids moléculaire	146 kDa	970kDa	385 kDa	185 kDa	190 kDa
Rôle	Activation du complément, opsonisation, ADCC	Agglutination	Agglutination, opsonisation	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps	Pas de fonction biologique décrite

Les antigènes sont des macromolécules naturelles ou synthétiques. Un antigène peut exprimer plusieurs régions épitopiques différentes et être reconnu par plusieurs paratopes différents. Néanmoins, au sein d'un même antigène, certains épitopes sont plus reconnus que d'autres, on parle d'épitopes immuno-dominants. Il s'agit, en général des épitopes situés en périphérie de l'antigène car, ils sont plus facilement accessibles suite à un faible encombrement stérique.

L'interaction antigène - anticorps est une association bimoléculaire semblable à une interaction enzyme - substrat, avec une distinction importante : elle ne conduit pas à une modification chimique irréversible, ni de l'anticorps, ni de l'antigène, et par conséquent, elle est réversible. L'interaction entre un anticorps et un antigène implique diverses interactions non covalentes entre le déterminant antigénique (ou épitope) et le domaine de la région variable (V_H/V_L) de la molécule d'anticorps, particulièrement au niveau des régions hypervariables CDR. Ces interactions non covalentes qui forment la base de la liaison antigène-anticorps incluent les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques, les interactions hydrophobes et les interactions de van der Waals (figure 21). La force et la stabilité de toutes les interactions non covalentes entre un épitope (sur l'antigène) et un paratope (sur l'anticorps) définit l'affinité de l'anticorps pour cet épitope. L'affinité d'un anticorps est définie par la constante d'affinité K_a (en $L.mol^{-1}$). Celle-ci varie de $10^4 L.mol^{-1}$ (faible affinité) à $10^{11} L.mol^{-1}$ (forte affinité).

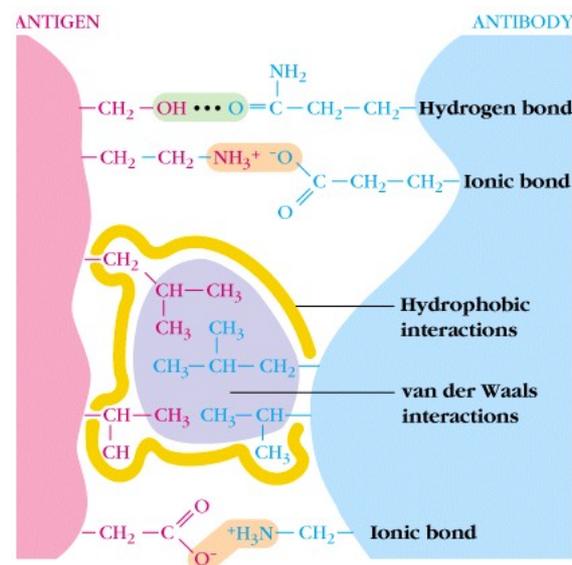


Figure 21 : L'interaction entre un anticorps et un antigène dépend de quatre types de forces non covalentes (Immunologie, le cours de Janis Kuby)

1- Les liaisons hydrogène, 2-les liaisons ioniques, 3-les interactions hydrophobes, 4-les interactions de van der Waals. Dans un environnement aqueux, les interactions non covalentes sont extrêmement faibles et dépendent de l'étroite complémentarité des formes de l'anticorps et de l'antigène.

B) Les anticorps utilisables en thérapie

La découverte des anticorps contenus dans le sérum a été réalisée par Emil Behring en 1890. Ces travaux, visant la mise au point d'un traitement contre le tétanos, ont permis de mettre en évidence qu'à la suite d'une immunisation, il apparaît dans le sérum des substances capables de protéger un animal contre des pathogènes. Il démontra que le sérum des animaux immunisés pouvait transférer une immunité chez des patients après injection. Les anticorps ainsi produits étaient dirigés contre différents épitopes. De plus, cette hétérogénéité dans la population d'anticorps utilisés (anticorps polyclonaux) présentaient des affinités et des spécificités variables d'une source à l'autre.

Le développement de la technologie de l'hybridome par Kohler et Milstein en 1975, a offert la possibilité d'utiliser les anticorps comme outil thérapeutique (Köhler and Milstein, 1975). La disponibilité de grandes quantités d'anticorps purifiés et préparés de façon reproductible permet d'accélérer leur utilisation en clinique. Les premiers anticorps monoclonaux (AcM) ont été fabriqués grâce à la fusion de lymphocytes B et de lignées cellulaires de myélome d'origine murine. Initialement, l'utilisation des AcM s'est révélée décevante du fait des réactions immunitaires provoquée consécutivement à leur injection (Meeker et al., 1985; Shawler et al., 1985). En effet les AcMs étant d'origine murine, ils entraînaient la formation d'anticorps humains anti-souris (« Human Anti-Mouse Antibodies, HAMA »), susceptibles de neutraliser leur activité thérapeutique, voire de provoquer des symptômes auto-immuns. Cette contrainte liée à l'utilisation d'anticorps d'isotype murin a rendu indispensable la production d'AcM présentant l'isotypie humaine. Toutefois, dans une étude utilisant la RIT, il a été montré que la production de ces HAMA était corrélé à un meilleur pronostic (Azinovic et al., 2006).

L'évolution des biotechnologies dans le domaine de l'ADN recombinant a permis d'humaniser progressivement les anticorps monoclonaux murins afin de diminuer leur immunogénicité. L'objectif consiste à remplacer par génie génétique des portions de plus en plus nombreuses de l'anticorps murin, par des parties humaines, tout en conservant l'activité biologique, à savoir le paratope, de l'anticorps (figure 22) (Little et al., 2000). L'utilisation de ces anticorps chimériques humanisés, puis plus récemment entièrement humains, a permis de réduire substantiellement l'immunogénicité des AcM de première génération, l'optimisation de la production et de la formulation a également contribué à cette amélioration (Stas and Lasters, 2009).

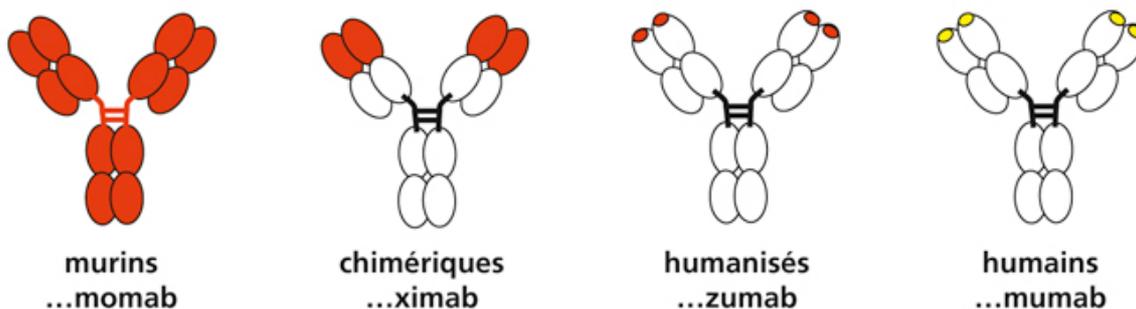


Figure 22 : Anticorps monoclonaux modifiés
(en rouge les parties murines, en blanc et jaune, les parties humaines)

Les AcM utilisés en thérapie sont d'isotype γ car leur demi-vie sérique est très longue (hormis les IgG3, seulement 8 jours). Leur masse est suffisante pour échapper à une filtration et une élimination par les glomérules rénaux. La plupart de ces AcM sont des immunoglobulines d'isotype IgG1. Cette sous-classe possède, en effet, des caractéristiques fonctionnelles particulièrement intéressantes en recrutant les effecteurs du système immunitaire par l'interaction de la partie Fc avec les molécules du système du complément ou avec les récepteurs aux fragments Fc (FcR) présents sur les leucocytes. Plus rarement, certaines situations thérapeutiques nécessitent l'utilisation d'anticorps portant des régions Fc dérivées d'autres isotopes tels qu'IgG2 ou IgG4 lorsque l'on veut, par exemple, éviter l'activation de mécanismes effecteurs et privilégier la neutralisation (le blocage des points de contrôle PD-1 ou CTLA-4 par exemple). Le tableau 3 résume les propriétés de ces différentes sous classes d'IgG.

Tableau 3 : Propriétés des différentes sous classes d'IgG utilisées en thérapie (Immunologie, le cours de Janis Kuby)

Type d'IgG	Demi-vie dans le sérum <i>in vivo</i>	Activation du complément (CDC)	Liason aux FcR (ADCC, opsonisation)
IgG1	23 jours	+	++
IgG2	23 jours	+/-	+/-
IgG4	23 jours	-	+

A l'heure actuelle, divers AcM ont été validés pour être utilisés en thérapie anti-cancéreuse chez l'homme (tableau 4).

Tableau 4 : Anticorps commercialisés utilisés en clinique (Kitson et al., 2013)

Nom de l'anticorps	Date d'approbation par la FDA	Type d'anticorps	Cible	Indication thérapeutique
Trastuzumab Emtansine (Kadcyla®)	2013	IgG1 humanisée	HER2	Cancer du sein métastatique HER2 positif
Brentuximab Vedotin (Adcetris®)	2011	IgG1 chimérique	CD30	Lymphome Hodgkinien, lymphome anaplasique à grandes cellules
Ipilimumab (Yervoy®)	2011	IgG1 humanisée	CTLA-4	Mélanome métastatique
Ofatumumab (Arzerra®)	2009	IgG1 humanisée	CD20	Leucémie lymphoïde chronique
Panitumumab (Vectibix®)	2004	IgG2 humanisée	EGFR	Cancer colorectal
Cetuximab (Erbix®)	2004	IgG1 chimérique	EGFR	Cancer colorectal
Bevacizumab (Avastin®)	2004	IgG1 humanisée	VEGF-A	Cancer colorectal
Alemtuzumab (Campath®)	2001	IgG1 humanisée	CD52	Leucémie lymphoïde chronique, Leucémie myéloïde aiguë, Sclérose multiple
Gemtuzumab (Mylotarg®)	2000	IgG4 humanisée	Siglec 3 (CD33)	Leucémie myéloïde aiguë
Trastuzumab (Herceptin®)	1998	IgG1 humanisée	HER2	Cancer du sein
Rituximab (Rituxan®)	1997	IgG1 chimérique	CD20	Lymphome non Hodgkinien, Lymphome B, Leucémie lymphoïde chronique

C) Les anticorps en RIT

L'affinité, la spécificité et l'isotype de l'AcM déterminent en partie sa biodistribution. L'affinité conditionne la solidité de la liaison antigène-anticorps et donc doit être suffisamment importante pour assurer la rétention de l'immunoconjugué au niveau de la cible. Toutefois, il a été démontré dans un modèle *in vitro* de sphéroïdes multicellulaires tumoraux qu'un anticorps monoclonal de faible affinité pénètre plus profondément qu'un anticorps monoclonal de haute affinité (Langmuir et al., 1992). En effet, l'AcM très affin se fixe dès qu'il rencontre l'antigène et sature les sites superficiels sans qu'il y ait de diffusion. Le consensus général est néanmoins d'utiliser en RIT des AcM de haute affinité afin d'améliorer le ciblage. La spécificité de l'AcM est également un facteur très important car il conditionne en partie la distribution tumeur / tissu sain et donc les effets secondaires.

Un autre paramètre à prendre en considération est la voie d'administration de l'immunoconjugué en fonction de la pathologie ciblée. L'injection systémique majore le risque d'irradiation des organes sains bien irrigués et expose l'immunoconjugué aux Ag circulants et aux molécules capables de fixer une immunoglobuline, comme celles du système du complément ; en revanche elle se révèle adaptée pour le traitement d'une tumeur disséminée (leucémie, myélome,...). Comme pour la chimiothérapie, la RIT intracavitaire a pour objectif d'améliorer le ciblage tumoral en limitant la toxicité pour les organes sains. Ainsi, les voies intrathécales, intratumorales ou intravésicales ont été testées (Malamitsi et al., 1995; Riva et al., 1994). Plusieurs études se sont intéressées à la voie d'injection intrapéritonéale (i.p), intéressante pour cibler les tumeurs ovariennes lorsqu'elles sont de petites tailles (Griffin et al., 1990; Thédrez et al., 1989).

L'anticorps radiomarqué idéal pour la thérapie par radionucléides doit avoir la forme radiochimique la plus simple et la plus stable, tout en ayant l'absorption non spécifique la plus basse. Le radiomarquage des anticorps à des fins diagnostiques et thérapeutiques est rendu compliqué par des effets négatifs potentiels sur la pharmacocinétique *in vivo*. Même après la résolution des problèmes liés à l'immunogénicité relative des AcM murins, quelques inconvénients persistent avec les anticorps humains ou humanisés. Le radiomarquage peut diminuer la perméabilité de l'anticorps induisant une extraction lente et réduite à partir du plasma. Dans certains cas, cela peut donner lieu à une concentration néoplasique pauvre et de surcroît compliquée par l'absorption non spécifique et donc un rapport de fixation tumeur /

tissu sain défavorable, incompatible avec une thérapie par radionucléides efficace (Siccardi et al., 1989). Ces problèmes surviennent plus fréquemment dans les tumeurs solides et sont moins évidents pour les tumeurs disséminées comme les lymphomes et les leucémies.

Une amélioration possible pour la RIT peut être obtenue en utilisant des molécules immunologiques avec un poids moléculaire inférieur à l'anticorps entier (fragments F(ab')₂, Fab, scFv, minibodies, affitins, peptides). Cependant, ces approches produisent différents problèmes liés à une élimination rapide, une affinité immunologique plus faible et / ou une stabilité radiochimique réduite.

Les AcM restent néanmoins un vecteur immunologique de choix et deux thérapies utilisant des anticorps monoclonaux radiomarqués : Bexxar® et Zevalin® ont été approuvées par la FDA. Plusieurs autres radioimmunoconjugués sont en essais cliniques (Kitson et al., 2013; Navarro-Teulon et al., 2013).

En fonction du type de tumeur ciblé, le choix de l'anticorps approprié est généralement suivi par la sélection du radionucléide le plus adapté déterminant ainsi la RIT employée.

II.2.3 Le choix du radionucléide

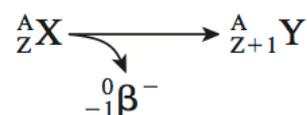
Les effets de la RIT dépendent également des propriétés physiques, des caractéristiques chimiques et du comportement biologique du radionucléide.

Le choix du radionucléide ou radioisotope repose sur des considérations pratiques (le coût, la disponibilité, le type de techniques de radiomarquage et la facilité d'utilisation), le type d'émission, transfert d'énergie linéique (TEL : quantité d'énergie transférée au milieu par la particule incidente, par unité de longueur de la trajectoire en keV/ μm .) et la demi-vie physique du radionucléide (durée nécessaire pour que la moitié des noyaux radioactifs d'une source se soient désintégrés) (Boswell and Brechbiel, 2007). Cette dernière doit correspondre à la pharmacocinétique de l'AcM utilisé autant que possible afin de délivrer la plus grande dose possible à la tumeur après l'injection. Une demi-vie trop courte entrainera un nombre élevé de désintégrations à l'extérieur de la cible, à l'inverse, une demi-vie trop longue engendrera un grand nombre de désintégrations du radionucléide pendant la phase d'élimination de l'anticorps. La demi-vie doit également être compatible avec les applications cliniques et la prise en charge du patient. Par conséquent, le temps nécessaire à l'envoi du radionucléide à partir du site de production, le radiomarquage de l'AcM, mais aussi les questions relatives à la radioprotection et la gestion des déchets sont des paramètres qui doivent être pris en compte.

En RIT, trois types de sources radioactives sont employées : les émetteurs de particules bêta (β), les émetteurs d'électrons Auger et les émetteurs de particules alpha (α). Les émetteurs α et la RIT α , faisant l'objet de ce travail de thèse, seront traités dans la partie II.3 de ce chapitre.

A) Emetteurs β^- et RIT β^- :

Dans un noyau présentant un excès de neutrons, un neutron finit par se transformer en proton avec la création d'un électron négatif. Les particules β^- sont des électrons chargés négativement qui seront émis du noyau d'un atome radioactif en décroissance :



Ces particules traversent la matière et perdent leur énergie cinétique en suivant un parcours aléatoire avant de s'arrêter. En raison de leur faible masse, l'énergie de recul du noyau fils est négligeable.

Les particules β^- possèdent un faible TEL ($\approx 0,2 \text{ keV}/\mu\text{m}$). Ces particules sont dotées d'une énergie intermédiaire (30 keV–2.3 MeV) et ont un long parcours dans les tissus (0,05–12 mm). Au niveau moléculaire, ces particules produisent de rares ionisations et causent des lésions individuelles de l'ADN comme des cassures simple ou double brin, des dommages facilement réparables aux bases de l'ADN ainsi qu'aux protéines fixées sur l'ADN. Par conséquent, leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques nécessite la présence de concentrations élevées de radionucléides au sein du tissu tumoral ciblé. Au niveau cellulaire, lorsque les cellules de mammifères sont fortement exposées (haut débit de dose) à des rayonnements ionisants de faible TEL, leur capacité à se diviser indéfiniment décline en fonction de la dose de rayonnements reçue. La forme de la courbe de survie clonogénique exprimée en fonction de la dose d'irradiation varie selon la valeur du TEL (figure 23).

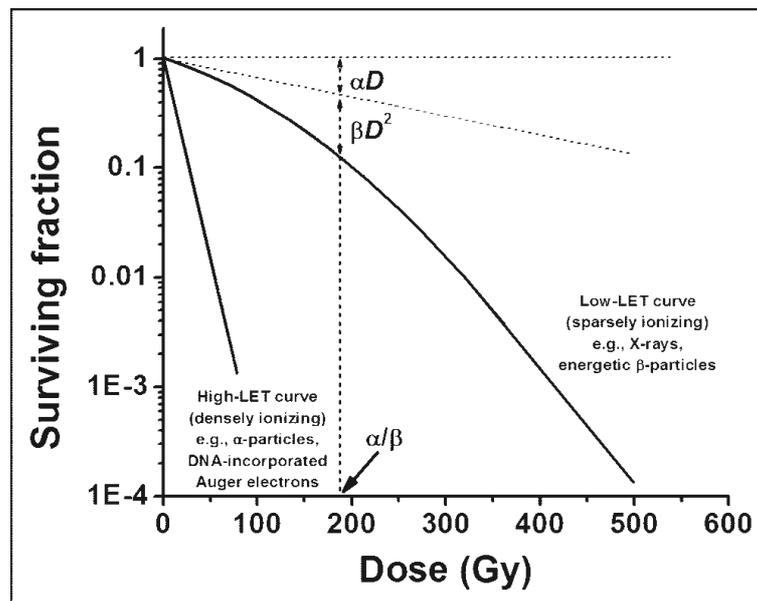


Figure 23 : Survie des cellules de mammifères après une irradiation par des particules de haut ou bas TEL (Kassis and Adelstein, 2005)

Le trajet relativement long des électrons dans les tissus permet à la RIT β d'irradier des cellules tumorales situées au sein d'une tumeur solide même si elles ne sont pas directement accessibles aux anticorps, c'est ce que l'on appelle l'effet de « feux croisés » (figure 24). Il arrive que certaines cellules d'une tumeur n'expriment pas ou peu l'antigène ciblé par l'anticorps, ces cellules ne sont donc pas directement ciblées par la RIT et peuvent échapper à l'irradiation. Le phénomène de « feux croisés » permet alors l'irradiation de cellules et donc de réduire l'effet de l'hétérogénéité du ciblage tumoral souvent néfaste à l'efficacité de la RIT.

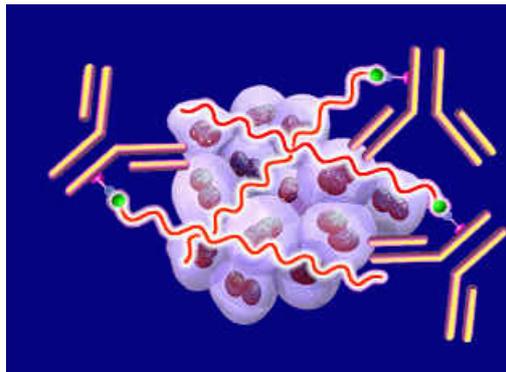


Figure 24 : Irradiation de cellules tumorales par un anticorps radiomarqué à un émetteur β^- illustrant le mécanisme de feux croisés

Il est important de noter que le long parcours de ces particules peut aussi induire une toxicité aspécifique de la moelle osseuse et des tissus sains ce qui est un facteur limitant majeur de la RIT β . Théoriquement, les émetteurs β^- sont plus appropriés pour le traitement des tumeurs solides volumineuses car dans le cas de petites tumeurs, la plupart de l'énergie serait déposée en dehors de la zone tumorale (Koppe et al., 2004; O'Donoghue et al., 1995).

Une grande variété de radionucléides est utilisée en RIT β . Les émetteurs β^- qui provoquent de nombreuses lésions biologiques sur les volumes faibles ont été les premiers utilisés en RIT. Parmi les différents émetteurs β^- (tableau 5), les émetteurs de haute énergie (2 MeV) comme l'yttrium-90 ou le rhénium-188 sont susceptibles de délivrer des doses radiotoxiques aux cellules situées à moins d'une dizaine de millimètres du lieu d'émission et ainsi irradier de petits nodules d'un diamètre supérieur à 3-5 mm (O'Donoghue et al., 1995) alors que les émetteurs β^- de plus faible énergie (500 keV à 1 MeV) comme l'iode-131 ou le samarium-153 permettent une irradiation plus adaptée aux tumeurs dont la taille varie de 0,5 à 1 mm (Ketterer et al., 2007).

Tableau 5 : Principaux émetteurs β^- utilisés en thérapie

Radionucléide	Demi-vie	Energie maximale (en KeV)	Trajet maximal (en mm)
¹³¹ I	8.02 J	606.3	2.4
⁹⁰ Y	64.0 h.	2280.1	12
⁸⁹ Sr	50.53 J.	1495.1	8
¹⁵³ Sm	46.50 h.	704.4	3
¹⁷⁷ Lu	6.65 J.	498.3	1.5
⁶⁷ Cu	61.83 h.	561.7	1.8
¹⁸⁶ Re	3.72 J.	1069.5	5
¹⁸⁸ Re	17.0 h.	2120.4	10.8

Bien que la RIT utilisant des émetteurs β^- ait été développée en cancérologie pour le traitement de tumeurs solides de petite taille ou au stade de maladie résiduelle (Alvarez et al., 2002; Kraeber-Bodéré et al., 1999), elle a surtout montré son efficacité en hématologie dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens, où elle est devenue un traitement de référence en complément de la chimiothérapie (Kaminski et al., 2005; 1993; Press et al., 1993; Tomblyn, 2012; Tomblyn et al., 2013; Ketterer et al., 2007) : les deux seuls traitements de radioimmunothérapie homologués par la FDA à ce jour utilisent des émetteurs β^- . Il s'agit d'anticorps monoclonaux anti-CD20 couplés à l'yttrium-90 (⁹⁰Y-Ibritumomab tiuxetan, Zevalin©) et à l'iode-131 (¹³¹I-tositumomab, Bexxar©) utilisés dans le traitement des lymphomes non Hodgkiniens (tableau 6). De nombreux autres essais cliniques ont déjà eu lieu et sont encore en cours pour tester l'efficacité de la RIT β dans le traitement de cancers hématologiques (Pagel et al., 2009; Rose et al., 2012; Lindén et al., 2005) et de cancers métastatiques (Kramer et al., 2007; Gulenchyn et al., 2012).

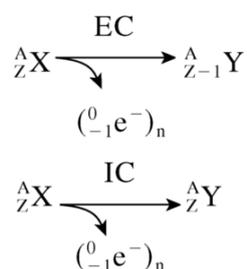
L'utilisation de la RIT est également testée pour le traitement de certains cancers solides (tableau 6) (Tomblyn et al., 2013). Notre groupe a notamment obtenu des résultats significatifs dans le traitement de cancers médullaires de la thyroïde avec la RIT β utilisant l'iode-131 (Chatal et al., 2006; Kraeber-Bodéré et al., 2010).

Tableau 6 : Listes des anticorps radiomarqués avec des émetteurs β^- utilisés en essais cliniques (Kitson et al., 2013)

Anticorps radiomarqué	Phase clinique	Description	Indication thérapeutique
¹³¹ I-Tositumomab (Bexxar®)	Approuvé par la FDA en 2003	Treatment combination consisting of the unlabelled and iodine-131 radiolabelled murine CD20 targeting antibody tositumomab	Lymphome B, lymphome à grandes cellules B diffus, lymphome folliculaire, lymphome non hodgkinien, myélome multiple
¹¹¹ In/ ⁹⁰ Y-Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®)	Approuvé par la FDA en 2002	Murine CD20 targeting antibody ibritumomab linked by the chelator tiuxetan. Yttrium-90 used for cancer therapy, Indium-111 for SPECT imaging	Lymphome B, lymphome à grandes cellules B diffus, lymphome folliculaire, le lymphome à cellules du manteau, lymphome non hodgkinien
¹³¹ I-Metuximab (Licartin)	Phase II	Iodine-131 radiolabelled murine antibody HAb18 F(ab') ₂ fragment against the HCC-associated antigen HAb18G/CD147	Cancer hépatique
¹³¹ I-3F8	Phase II	Iodine-131 radiolabelled anti-GD2 ganglioside murine IgG3 monoclonal antibody	Cancer, médulloblastome, neuroblastome
¹³¹ I-L19 (Radretumab)	Phase II	Iodine-131 radiolabelled SIP composed of L19 that binds to the ED-B domain of human fibronectin	Cancer du poumon non à petites cellules, les tumeurs solides, hématologiques / sang
¹³¹ I-F16 (Tena-Rad)	Phase II	Iodine-131 radiolabelled human monoclonal antibody against the A1 domain of tenascin-C	Cancers hématologiques, tumeurs solides
¹³¹ I ch-TNT-1/B (Cotara)	Phase II	Iodine-131 radiolabelled chimeric monoclonal antibody chTNT-1/B for tumour necrosis therapy	Astrocytome anaplasique, le cancer des voies biliaires, cancer colorectal, le glioblastome multiforme, gliome, sarcome
¹³¹ I-BC8	Phase II	Iodine-131 radiolabelled murine anti-CD45 monoclonal IgG1 antibody	Leucémie myéloïde aiguë
¹¹¹ In-J591, ¹⁷⁷ Lu-J591	Phase II	Indium-111/Lutetium-177 labelled humanized monoclonal antibody to prostate specific membrane antigen/extracellular domain (PSMAext)	Cancer de la prostate
¹⁷⁷ Lu-DOTA-cG250	Phase II	Chimeric monoclonal antibody G250 conjugated to DOTA and radiolabelled with lutium-177	Carcinome des cellules rénales
¹⁷⁷ Lu-J591	Phase II	Lutetium-177 radiolabelled humanized monoclonal antibody J591 targeting prostate-specific membrane antigen (PSMA)	Cancer de la prostate métastatique
⁹⁰ Y-hLL2 IgG; (Epratuzumab- ⁹⁰ Y) Lym- phoCide ⁹⁰ Y	Phase I/II	Yttrium-90/Lutetium-177 radiolabelled human-mouse monoclonal IMMU-hLL2 targeting CD22	Lymphome folliculaire, lymphome non Hodgkinien, Leucémie lymphoblastique aiguë
⁹⁰ Y-hPAM4 (⁹⁰ Y Clivatuzumab tetraxetan)	Phase I/II	Human-mouse monoclonal hPAM4 IgG1 targeting human Mucin-1 conjugated to DOTA and radiolabelled with yttrium-90	Cancer du pancréas

B) Les émetteurs d'électrons Auger et RIT Auger :

Lorsqu'un radionucléide subit une désintégration par capture électronique (EC) ou conversion interne (IC), une vacance se crée au sein d'une couche électronique interne.



Cette vacance est rapidement comblée par un électron provenant d'une couche électronique de plus haute énergie ce qui s'accompagne d'une libération d'énergie. L'énergie peut être libérée sous forme de rayons X ou bien elle peut être transférée à un électron d'une couche externe qui sera alors éjecté. Cet électron émis est appelé électron Auger. Il s'en suit en général une cascade d'émission d'électrons Auger pour remplir la vacance électronique jusqu'à ce qu'elle atteigne une couche externe. Cinq à trente électrons Auger sont émis par désintégration radioactive. Ces électrons ont une énergie de quelques keV et leur portée varie de quelques fractions de nanomètre jusqu'à 0,5 μm (Tableau 7), mais leur portée étant très courte, ils présentent un haut TEL.

Tableau 7 : Principaux émetteurs d'électrons Auger utilisables en RIT

Radionucléide	Demi-vie	Energie maximale (en KeV)	Trajet maximal (en μm)
¹²⁵ I	60.1 J.	31	20
¹¹¹ In	67.3 h	26	17
⁶⁷ Ga	78.3 h	10	3
¹²³ I	13.3 h	31	20
^{195m} Pt	96.5 h	64	76

Du fait de leur TEL relativement élevé (4 à 26 keV/ μm) et de leur émission en cascade, ces électrons de faible énergie génèrent des régions de haute densité d'ionisation le long d'un chemin irrégulier. Les cassures double brins induites par ces ionisations spécifiques élevées sont moins facilement réparables que celles créées par des rayonnements ionisants d'énergies plus faibles comme les particules β^- (Kassis, 2011).

L'énergie déposée par les électrons Auger est très localisée et est délivrée dans une sphère de quelques nanomètres de diamètre autour du site de décroissance. Par conséquent, le ciblage final de l'émetteur doit être dans un compartiment sensible de la cellule car les électrons Auger sont hautement cytotoxiques lorsqu'ils sont situés à proximité des molécules d'ADN. Les électrons Auger sont donc adaptés pour le traitement de cellules tumorales isolées ou de petits groupes de cellules tumorales. Toutefois, il a été démontré que la membrane cellulaire est également une cible potentielle des électrons Auger (Santoro et al., 2009; Boudousq et al., 2010).

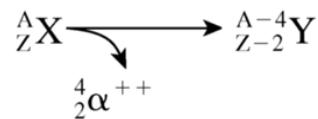
En raison de leur courte portée, l'irradiation par « feux croisés » est négligeable, mais des effets de voisinage (ou effets bystanders) ont été décrits (Xue et al., 2002). L'effet bystander peut contribuer à l'élimination des cellules tumorales non ciblées par la RIT. Il correspond aux effets biologiques observés sur des cellules n'ayant pas été touchées par l'irradiation tels que l'induction de dommages à l'ADN et la mort cellulaire. Le phénomène a été observé avec de l'iode-125 dans les cellules cancéreuses à croissance sous-cutanée *in vivo* (Kassis and Adelstein, 2005). Ces effets peuvent être transmis aux cellules voisines des cellules irradiées par des jonctions communicantes intercellulaires ou par des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire. La nature de ces facteurs sécrétés ou transmis par les jonctions communicantes n'est à ce jour pas encore caractérisée (Morgan, 2003; Mothersill and Seymour, 2004).

L'iode-125 est probablement l'un des meilleurs candidats émetteur d'électrons Auger pour la RIT parce qu'il émet en moyenne 21 électrons par décroissance et peut donc être hautement cytotoxique localement (Quang and Brady, 2004). Les inconvénients de l'iode-125 sont sa longue demi-vie et le relargage de l'iode de la plupart des molécules radiomarquées lorsqu'elles sont internalisées dans le cytoplasme. Dans certains cas, lorsque le noyau de la cellule n'est pas directement visé, les anticorps qui restent à la surface de la cellule ou qui sont lentement internalisés dans le cytoplasme pourraient être préférables aux anticorps internalisants. Par conséquent, les applications cliniques des AcM marqués à l'iode-125 doivent être sélectionnées soigneusement. Pour aller dans ce sens, l'efficacité de la RIT Auger avec un anticorps non internalisant sur des tumeurs solides de petit volume a été confirmée dans un modèle préclinique de xénogreffe sur souris nude (Santoro et al., 2009).

II.3 La radioimmunothérapie alpha

En 1926, Claudius Regaud et Antoine Lacassagne avaient émis l'idée que « l'agent idéal du traitement du cancer serait constitué d'éléments lourds, capables d'émettre des rayonnements d'ordre moléculaire, qui seraient administrés dans l'organisme et se fixeraient dans le protoplasme des cellules que l'on cherche à détruire » (Allen, 2008). Cette définition caractérise parfaitement la RIT α qui combine donc un radioisotope lourd avec un anticorps spécifique de cellules tumorales. L'histoire de la RIT a été faite par des anticorps marqués avec des émetteurs β^- ; mais après des années de résultats discordants, le rôle clinique de la RIT dans la prise en charge de divers cancers a été accepté (Brans et al., 2006). Ce n'est que très récemment que l'utilisation des émetteurs α a été proposée pour le radiomarquage de nombreuses molécules, en particulier les anticorps.

Les particules α sont chargées positivement, elles possèdent une masse et une charge égale à un noyau d'hélium. Leur émission conduit à un noyau fils comprenant 2 protons et 2 neutrons de moins que le noyau père :



L'énergie des particules α émises par désintégration radioactive est comprise entre 5 et 9 MeV pour un trajet en ligne droite dans les tissus de l'ordre de 50 à 100 μm correspondant au diamètre de plusieurs cellules (Sgouros et al., 2010), leur TEL est donc très élevé (50 à 230 keV/ μm).

Les α étant des particules chargées (comme les protons et les ions carbone), le dépôt de l'énergie le long de leur parcours présente un pic de Bragg : la distribution de l'énergie le long de leur trajet dans les tissus n'est pas décroissante avec la profondeur comme pour les rayons X/ γ et les neutrons. Au contraire, la majeure partie de la dose est délivrée à la fin de leur parcours (figure 25).

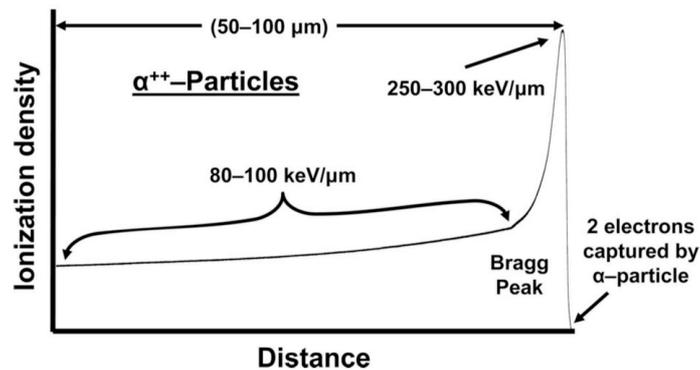


Figure 25 : Evolution du TEL en fonction de la distance parcourue par une particule α (Kassis, 2008)

II.3.1 Radiobiologie des particules α :

Le court trajet dans la matière de ces particules nécessite que les radionucléides émetteurs de particules α soient délivrés dans une zone à proximité des cellules cancéreuses afin que l'irradiation puisse être efficace. Comme vu précédemment, l'énergie maximale des particules α atteint 300 keV/μm en fin de parcours alors que les particules β^- qui ont un faible TEL conserve une énergie de 0,2 keV/μm tout au long de leur trajet. Cela signifie que les dommages infligés aux cellules varient entre les rayonnements à haut et bas TEL. Aux niveaux les plus élevés de TEL, la tendance à couper l'ADN double brin est plus importante que les particules à faible TEL. En effet, du fait de la forte densité d'ionisation de ces particules α , elles causent de multiples lésions très proches les unes des autres sur l'ADN, ce qui les rend difficilement réparables (figure 26). Il a été calculé que les ruptures maximales de l'ADN tumoral sont provoquées pour des TEL de l'ordre de 100 à 200 keV/μm.

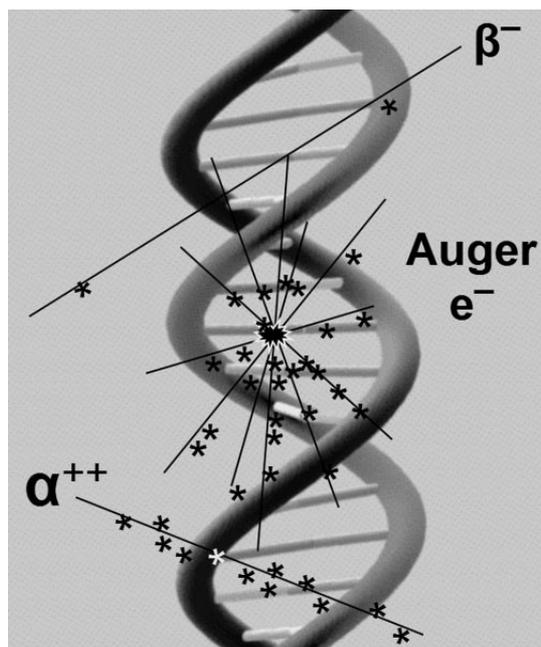


Figure 26 : Répartition spatiale des ionisations au sein d'une molécule d'ADN pour une particule α , une particule β et un émetteur d'électrons Auger (Kassis and Adelstein, 2005)

Les particules β possédant un TEL très faible, les ionisations sont très espacées sur leur parcours. À l'inverse, les particules α et les électrons Auger entraînent un grand nombre d'ionisations sur une très courte distance. De plus, les électrons Augers étant émis en cascade, la désintégration d'un émetteur Auger, entraîne une très forte densité d'ionisations dans un rayon restreint.

De plus, une à trois interactions des particules α avec le noyau de la cellule cancéreuse suffisent à la tuer alors que 1000 à 5000 de ces événements produits à partir des particules β sont nécessaires pour parvenir à un effet semblable conduisant à la mort de la cellule cancéreuse (Kitson et al., 2013).

La réparation cellulaire suite aux dommages causés par les particules α est beaucoup moins efficace que pour d'autres formes de rayonnement en raison de leur forte propension à causer des cassures double brins létales.

Les rayonnements associés aux particules α sont potentiellement très avantageux car ils permettent d'induire la mort des cellules souches tumorales relativement quiescentes qui sont souvent à l'origine de la recrudescence de la maladie. Tout comme les électrons Auger, en raison de leur courte portée, l'irradiation par « feux croisés » est négligeable, mais des effets bystanders ont été décrits comme la production de ROS (reactive oxygen species), de cytokines, la destruction cellulaire ou encore le déclenchement d'une réponse inflammatoire (Li et al., 2013; Azzam et al., 2003).

Etant donné que le trajet des particules α est le plus souvent de trois à cinq fois le diamètre d'une cellule cancéreuse, leur effet est particulièrement adapté pour le traitement de petits agrégats de cellules néoplasiques. Les effets néfastes liés à l'irradiation α restent presque entièrement limitée à la tumeur préservant ainsi le tissu sain environnant (Mulford et al., 2005).

Pour conclure cette partie, l'utilisation d'émetteur de particules α en RIT présente plusieurs autres avantages liées à leur fort TEL :

- leur efficacité biologique relative (EBR) qui est très élevée, conséquence d'une forte probabilité de cassures d'ADN double brin non réparables. Cela s'explique par le fait que la distance entre deux brins d'ADN est presque la même que celle entre deux ionisations de particules alpha

- l'efficacité cytotoxique des particules α est beaucoup moins dépendante du débit de dose en comparaison avec des particules β (Vaidyanathan et al., 1996)

- la dépendance vis à vis de l'oxygène est absente pour les radiations ionisantes denses, telles que les particules α , ce qui permet de traiter des populations de cellules à la fois en normoxie et en hypoxie (McDevitt et al., 1998).

- l'effet cytotoxique des particules à haut TEL ne dépend pas de l'état du cycle cellulaire (Zalutsky and Pozzi, 2004).

- l'absence ou la faible composante de rayons γ réduit considérablement les problèmes de radioprotection, permettant au traitement d'être donné sur une base ambulatoire.

A la lumière de l'ensemble de ces caractéristiques, La RIT α est une modalité thérapeutique prometteuse pour les cancers disséminés et les maladies résiduelles.

II.3.2 Les émetteurs α utilisés en thérapie, intérêt du bismuth-213

Plus de 100 radioisotopes émetteurs de particules α ont été identifiés, ce sont tous des éléments « lourds » ayant un numéro atomique supérieur à 82. La majorité d'entre eux sont produits par des réacteurs nucléaires. Une petite partie d'entre eux sont considérés comme étant utilisables en tant qu'agent thérapeutique (Tableau 8) en grande partie dû à la faible disponibilité commerciale des sources d'émetteurs α (Brechbiel, 2007), à leur demi-vie (qui ne doit être ni trop longue, ni trop courte) ou encore dû à la nécessité de mise en place d'un processus chimique adéquat du couplage du radioisotope désiré à l'anticorps permettant une efficacité thérapeutique optimale. Ces radionucléides émetteur d' α sont le bismuth-213 (produit par un générateur), l'astate-211 (produit en cyclotron), l'actinium-225 (produit par un générateur), le plomb-212 (produit par un générateur) et le thorium-227 (produit par un générateur). Ces isotopes radioactifs, couplés à des AcM, peuvent être utilisés dans le traitement d'une grande variété de cancers tels que les lymphomes, les myélomes et les leucémies comme notifié précédemment.

Tableau 8 : Emetteurs alpha potentiels pour une utilisation thérapeutique (Kitson et al., 2013)

Radionucléide	Emissions	Demi-vie	Energie maximale (en MeV)	Trajet maximal (en μm)
^{211}At en ^{207}Pb (stable)	2 α , 2 EC	7.2 h	5.9	48
^{212}Bi to ^{208}Pb (stable)	2 α , 2 β^-	60.6 min	6.05	51
^{212}Pb to ^{208}Pb (stable)	2 α , 3 β^-	10.6 h	-	-
^{213}Bi to ^{209}Bi (stable)	2 α , 3 β^-	45.6 min	5.9	48
^{225}Ac to ^{209}Bi (stable)	5 α , 3 β^-	10 J.	5.8	48
^{227}Th to ^{207}Pb (stable)	5 α , 2 β^-	18.7 J.	5.9	-

Le radionucléide le plus étudié à l'heure actuelle demeure le bismuth-213, principalement en raison de sa disponibilité et de la possibilité d'une chélation par le CHX-A''-DTPA fixé à l'anticorps. Le CHX-A''-DTPA complexe idéalement le bismuth et peut fixer de façon covalente les anticorps. C'est l'agent chélatant de référence en thérapie car il permet une complexation stable du bismuth-213 *in vivo* (Ma et al., 2001; McDevitt et al., 1999).

Le bismuth-213 est obtenu à partir d'un générateur d'actinium-225/bismuth-213 constitué d'une colonne de résine sur laquelle est fixée l'actinium-225 comme élément père. Par décroissance radioactive, l'actinium-225 produit du bismuth-213, élément fils. L'actinium-225 ayant une demi-vie de 10 jours, chaque générateur de 10 mCi (370 MBq) peut être utilisé pendant 2 à 3 semaines après réception.

L'utilisation du bismuth-213 a abouti à des études cliniques ayant démontré la faisabilité de la RIT α chez l'homme (Jurcic et al., 2002; Rosenblat et al., 2010; Raja et al., 2007). Ce radioisotope est toutefois limité par sa demi-vie de 45,6 minutes, puisque la désintégration α du bismuth-213 libère 20% de son énergie pendant les 15 premières minutes, et trois heures après injection, il persiste seulement 6% de son énergie. Le bismuth-213 décroît en bismuth-209 via un système ramifié. Cette cascade résulte en l'émission de deux particules α , avec des énergies de 5,9 MeV (dans 2,2% des cas) et 8,4 MeV (dans 97,8% des cas) (figure 27).

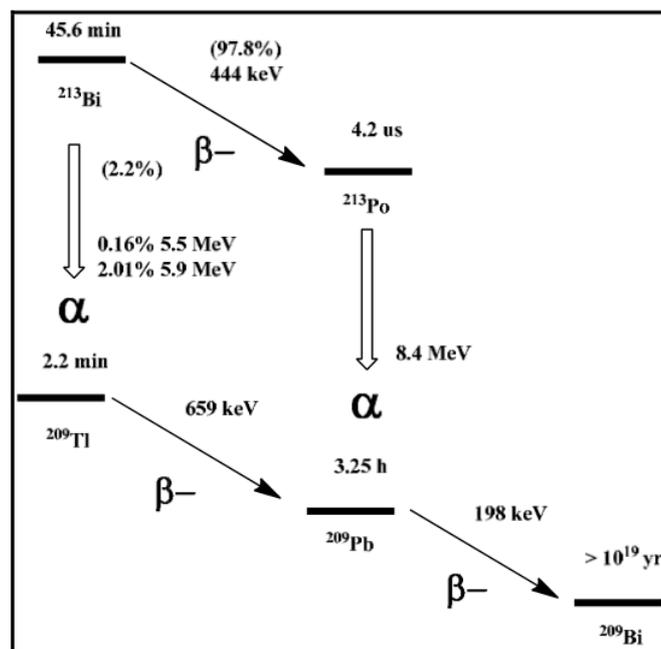


Figure 27 : Décroissance du bismuth-213 (Kitson et al., 2013)

Pendant la désintégration du bismuth-213, trois particules β^- sont également émises avec des énergies de 444, 659 et 198 keV; avec des rendements respectifs de 97,8%, 2,2% et 100%, en fonction de la chaîne de décroissance suivie (figure 27). La dernière de ces particules β^- est émise par le plomb-209, qui a une demi-vie de 3,25 heures et se désintègre en bismuth-209 stable. Le bismuth-213 émet également un rayonnement γ avec une énergie associée de 440 keV. Du fait de cette émission de rayons γ , l'imagerie SPECT de tumeurs

devient possible et cela peut également être utilisé pour des études de dosimétrie dans les trois heures après l'injection du bismuth-213 (Jurcic et al., 2002; Sgouros et al., 1999).

II.3.3 Etudes précliniques de la RIT α au bismuth-213 :

Les études s'intéressant aux mécanismes de la RIT α *in vivo* sont encore rares. Ces études sont pourtant primordiales car plus pertinentes que les études *in vitro* pour décrire son action thérapeutique à l'échelle d'un organisme, elles permettent, en plus, d'étudier la réponse des cellules tumorales à l'irradiation dans le contexte du microenvironnement tumoral.

Malgré tout, de nombreuses thérapies sont menées en utilisant des anticorps couplés au bismuth-213, principalement dans des modèles murins xéno greffés le plus souvent immunodéficients, et l'efficacité de la RIT au bismuth-213 a été démontrée pour des cancers de type très différents : cancer du sein, du pancréas, du colon, de la prostate, de l'ovaire, de la trachée, du poumon, de l'estomac, ou encore dans le mélanome, le lymphome et les leucémies (tableau 9). Très peu d'études sont réalisées sur des modèles murins syngéniques et immunocompétents, l'étude de l'impact de la RIT α sur la potentielle activation du système immunitaire suite à la destruction tumorale n'a ainsi pas été investiguée. En effet, comme il sera vu par la suite, la destruction tumorale engendrée par les irradiations peut permettre d'activer certains acteurs du système immunitaire potentialisant la destruction tumorale et l'éradication de la maladie.

Tableau 9 : Récapitulatif des essais précliniques utilisant le bismuth-213 chez la souris

Anticorps	Indication thérapeutique	Résultats	Référence
201B (anti-thrombomoduline murine)	Carcinome mammaire, trachéal, épidermoïde, Adénocarcinome pulmonaire	Diminution de la taille des micrométastases pulmonaires Augmentation de la médiane de survie	(Kennel and Mirzadeh, 1998; Kennel et al., 1999)
CO17-1A (anti-CD326)	Carcinome colorectal	Inhibition de la croissance tumorale Augmentation de la médiane de survie	(Behr et al., 1999)
Anti-CD25	Leucémie à cellules T	Augmentation de la médiane de survie	(Zhang et al., 2002)
J591 (anti-PSMA)	Carcinome prostatique	Ralentissement de la croissance tumorale Augmentation de la médiane de survie	(McDevitt et al., 2000)
C595 (anti-MUC1) MX35 (anti- NaPi2b)	Carcinome ovarien	Diminution de la croissance des métastases Augmentation de la médiane de survie	(Gustafsson et al., 2012; Song et al., 2008)
TES-23 (anti-CD44H)	Carcinome trachéal	Ralentissement de la croissance tumorale	(Kennel et al., 2002)
Anti-CD74	Lymphome B	Ralentissement de la croissance tumorale Augmentation de la médiane de survie	(Michel et al., 2003)
Trastuzumab (anti-HER2)	Cancer du colon/pancréas	Augmentation de la médiane de survie	(Milenic et al., 2004)
9.2.27 (anti-MCSP)	Mélanome	Ralentissement de la croissance tumorale	(Rizvi et al., 2005)
hu3S193 (anti-antigène de lewis)	Cancer du sein	Ralentissement de la croissance tumorale	(Kelly et al., 2007)
PAI-2	Cancer du pancréas	Ralentissement de la croissance tumorale Augmentation de la médiane de survie	(Qu et al., 2005)
7.16.4 (anti-HER2)	Métastase de cancer du sein	Augmentation de la médiane de survie	(Song et al., 2009)
D9 (anti-Ecadherine)	Cancer gastrique	Augmentation de la médiane de survie	(Seidl et al., 2011)
103A (anti-gp70)	Leucémie érythroïde	Augmentation de la médiane de survie	(Huneke et al., 1992)
B3 (anti-antigène de lewis)	Carcinome épidermoïde	Augmentation de la médiane de survie	(Yao et al., 2004)
Anti-CD20	Lymphome non Hodgkinien	Augmentation de la médiane de survie	(Park et al., 2010)
Anti-CD138	Myélome multiple	Augmentation de la médiane de survie	(Chérel et al., 2013)

II.3.4 Etudes cliniques de la RIT α au bismuth-213 :

En clinique chez l'homme, la première étude a été réalisée par l'équipe du Dr. Jurcic en 2002, au centre anticancéreux du Mémorial de Sloan-Kettering (New-York). Cette étude incluait 18 patients atteints d'une leucémie myéloïde aiguë ou d'une leucémie myélomonocytaire chronique réfractaire ou ayant récidivé. Le traitement proposé était constitué d'un anticorps anti-CD33 (HuM195) couplé au bismuth-213, injecté par voie intraveineuse (i.v). Les autres études utilisant un anticorps couplé au bismuth-213 ont utilisé une voie d'administration intralésionnelle et non systémique, contrairement aux deux précédentes. Il s'agit d'une étude de l'équipe du Dr. Allen, portant sur le traitement des mélanomes par un anticorps dirigé contre le MCSP (Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan) et d'une étude de l'équipe du Dr. Merlo, portant sur le traitement des glioblastomes par de la substance P (neuropeptide agissant principalement comme neurotransmetteur de la douleur et largement distribué au niveau du système nerveux) radiomarquée au bismuth-213. Les résultats cliniques de ces essais sont résumés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Essais cliniques utilisant le bismuth-213 chez l'homme (Baidoo et al., 2013)

Anticorps	Indication thérapeutique	Résultats	Référence
HuM195 (anti-CD33)	Leucémie myéloïde aiguë	18 patients traités, 15 réductions de blastes médullaires	(Jurcic et al., 2002)
		31 patients traités, 31 réductions de blastes médullaires	(Rosenblat et al., 2010)
9.2.27 (anti-NG2)	Mélanome	22 patients traités, 1 rémission complète, 3 réponses partielles, 11 stabilisations	(Raja et al., 2007)
Substance P	Glioblastome	5 patients traités, 2 améliorations de l'index de Barthel	(Cordier et al., 2010; Kneifel et al., 2006)

II.3.5 Essais cliniques de la RIT α utilisant d'autres émetteurs α

D'autres essais ont été réalisés en utilisant différents émetteurs α (astate-211, actinium-225, plomb-212, Tableau 8) et différents AcM en fonction du type de cancer (Tableau 11). Tous ces essais ont montré la faisabilité de la RIT α dans les cancers disséminés associée à une faible toxicité.

- **L'actinium-225** est caractérisé par une demi-vie de 10 jours, il émet des particules α de haute énergie et suit une décroissance radioactive rapide en bismuth-209 stable. L'actinium-225 est considéré comme un candidat intéressant en thérapie car il peut être utilisé en tant que générateur de radionucléides fils émetteur d' α *in vivo*. Les limites de son utilisation sont la disponibilité d'agents chélatants permettant une fixation stable de l'actinium mais aussi les radionucléides fils produits au cours de sa décroissance (Davis et al., 1999).

- **L'astate-211** a une demi-vie de 7,2 heures adaptée à la pharmacocinétique (distribution, élimination) des AcM, mais aussi à la préparation et à l'injection de l'AcM radiomarqué par ce radionucléide. L'astate-211 émet également des rayons X et γ permettant en plus de la thérapie, d'effectuer de l'imagerie et des études de biodistribution du radioimmunoconjugué injecté (Andersson et al., 2009; Zalutsky et al., 2008). En dépit de l'utilisation prometteuse de ce radionucléide en RIT α , son utilisation en clinique est limitée par sa disponibilité et sa pureté radiochimique faible suite à sa production en cyclotron (Kitson et al., 2013).

- **Le plomb-212** est lui aussi utilisable comme un générateur *in vivo* puisque sa décroissance radioactive génère du bismuth-212, émetteur de particules α , (tableau 8) et sa demi-vie de 10,6 heures est là aussi raisonnable pour la préparation et l'injection du radioimmunoconjugué. Mais la production d'électrons Auger et d'électrons de capture électronique peuvent déstabiliser la structure chimique de l'AcM (Kim and Brechbiel, 2012).

Tableau 11 : Liste des essais cliniques avec l'actinium-225, l'astate-211 et le plomb-212 (Baidoo et al., 2013)

Anticorps radiomarqué	Indication thérapeutique	Résultats	Référence
²²⁵ Ac-HuM195 (²²⁵ Ac-lintuzumab ; anti-CD33)	Leucémie myéloïde aiguë	18 patients traités ; essai étendu à une étude multicentrique de phase I/II	Groupe Sheinberg http://clinicaltrials.gov/ NCT00672165
²¹¹ At-ch81C6 (anti-tenascin)	Glioblastome	18 patients traités ; 14 ont survécu 12 mois ; pas de toxicité sévère	(Zalutsky et al., 2008)
²¹² Pb-TCMC- trastuzumab (anti-Her2/neu)	Cancer des ovaires	3 patients traités ; étude en cours	Areva Med LLC NCT01384253

Chapitre III : Rayonnements ionisants et immunité anti-tumorale

Jusqu'à très récemment, les effets thérapeutiques des rayonnements ionisants étaient entièrement attribué à l'activité cytotoxique directe sur les tumeurs des rayons X ou γ (Bernier et al., 2004). Les effets de la radiothérapie conventionnelle sur la survie des patients atteints de cancer étaient généralement interprétés comme une conséquence de l'amélioration du contrôle local de la tumeur, réduisant directement la propagation systémique.

Cependant, les données expérimentales cliniques et précliniques dans de nombreux types de cancer démontrent que certains effets des rayonnements ionisants X ou γ sont capables d'induire une immunité anti-tumorale efficace. Comme nous le verrons, les exemples récents de réponses objectives obtenues en combinant la radiothérapie (RT) et des stratégies d'immunothérapie chez des patients atteints de cancers métastatiques soutiennent ce postulat.

Par conséquent, le rôle traditionnel de la RT palliative dans la maladie métastatique est en train d'évoluer pour devenir un puissant adjuvant de l'immunothérapie. Cette stratégie de combinaison s'ajoute à l'arsenal anticancéreux actuel et offre d'attrayantes possibilités d'exploiter le système immunitaire pour prolonger la survie, même chez des patients atteints de cancer métastatique et lourdement prétraités.

III.1 L'effet abscopal, conséquence immunologique des rayonnements ionisants

L'effet « abscopal » originellement décrit par R.J.Mole en 1953 vient du latin «ab» qui signifie « loin de » et « scopos » qui veut dire « cible ». L'effet abscopal désigne des effets produits en dehors du champ d'irradiation de la cible et qui se traduisent par une réponse anti-tumorale capable d'éliminer une cible tumorale non irradiée. Comme introduit précédemment, une quantité croissante de données précliniques et cliniques indiquent que le potentiel thérapeutique de l'irradiation ionisante ne reflète pas simplement l'activité cytotoxique des rayons X et γ , mais implique des effets de voisinages (effets bystanders) locaux et/ou à distance (Mothersill and Seymour, 2004; Prise and O'Sullivan, 2009; Kroemer and Zitvogel, 2012). L'effet abscopal est un phénomène très rare en clinique, toutefois, il a été documenté chez des patients porteurs d'une grande variété de tumeurs comme les lymphomes (Rees, 1981; Antoniadis et al., 1977), les mélanomes (Hiniker et al., 2012; Postow et al., 2012; Stamell et al., 2013), les carcinomes du sein primaire et métastatique, les adénocarcinomes, les sarcomes (Vacchelli et al., 2013), les carcinomes hépatocellulaire (Ohba et al., 1998), le carcinome à cellules de Merkel (Cotter et al., 2011), le carcinome à cellules rénales (RCC) (Ishiyama et al., 2012), et le cancer de l'utérus (TAKAYA et al., 2007).

Seules quelques études ont étudié les mécanismes possibles à l'origine de l'effet abscopal dans des modèles animaux. Des travaux menés par Demaria *et al.* montrent que les LT sont nécessaires à l'induction d'un effet abscopal suite à un traitement combiné comprenant une irradiation locale et l'injection de Flt3 ligand (Flt3-L, un facteur de croissance des DC, (O'Neill et al., 2004)) dans un modèle murin de carcinome mammaire (Demaria et al., 2004). Dans cette étude, les cellules tumorales sont injectées dans deux sites distincts chez des souris immunocompétentes syngéniques. L'irradiation de l'une des tumeurs n'affecte pas la croissance de la tumeur non irradiée. En revanche, le Flt3-L donné avec l'irradiation provoque une inhibition importante de la tumeur irradiée et de la tumeur située à distance du champ d'irradiation. Cet effet anti-tumoral est spécifique de la tumeur car le traitement combiné n'a pas d'effet si la tumeur à distance est différente de la tumeur irradiée ou si la souris est déficiente en LT. Le développement de LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques de la tumeur chez ces souris traitées appuie le fait que l'effet abscopal peut être induit par le

développement d'une immunité adaptative anti-tumorale spécifique induite par la combinaison d'une irradiation locale et de l'injection de Flt3-L (Demaria et al., 2004).

De même, les cellules T semblent être les médiateurs de l'effet abscopal, induits suite à une irradiation et à l'injection de ECI301, un variant recombinant d'une chimiokine : MIP1 α , dans des modèles murins de carcinome et de sarcomes (Shiraishi et al., 2008). Comme dans l'expérience précédente, un site tumoral est irradié, le deuxième permettant d'évaluer l'effet abscopal. Les deux traitements administrés seuls n'ont pas montré d'effet sur la croissance de la tumeur non irradiée. En revanche, le traitement combiné a eu un effet considérable et bénéfique sur l'inhibition de la prolifération tumorale. De plus, selon le type de tumeur, cet effet abscopal est induit par les LT CD4⁺, les LT CD8⁺ ou les cellules NK (Shiraishi et al., 2008). Dans cette expérience, l'irradiation des tissus sains n'a pas induit d'effet abscopal, ce qui suggère que la mort radio-induite ou une réaction de stress dans les cellules tumorales est nécessaire pour induire une réponse immunitaire anti-tumorale.

Ces études indiquent que les rayonnements ionisants peuvent initier des réponses immunitaires avec des effets systémiques sur la croissance tumorale. Des effets opposés existent probablement, ce qui expliquerait pourquoi ces rayonnements, comme traitement unique, entraînent rarement l'induction de l'effet abscopal. Cependant, des études précliniques et cliniques suggèrent que les effets sur le tissu irradié pourraient être utilisés pour augmenter la réponse à différents types de stratégies d'immunothérapie contre les cancers (Demaria et al., 2005a; Barker and Postow, 2014).

La partie suivante de ce chapitre vise à décrire les mécanismes induits par la RT conventionnelle, utilisant les rayons X ou γ , et qui peuvent influencer le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Ces effets peuvent résulter de l'action directe des radiations sur les cellules tumorales mais également sur leur microenvironnement ou sur les cellules du système immunitaire.

III.2 Effets immunologiques des rayonnements ionisants

III.2.1 Effets immunosuppresseurs

L'irradiation est traditionnellement considérée comme immunosuppressive du fait de l'aplasie médullaire causée par une RT du corps entier. Les cellules souches hématopoïétiques, dont dérivent les cellules du système immunitaire, sont en effet très radiosensibles.

Les rayonnements ionisants favorisent également la production de TGF β , une cytokine immunosuppressive (Barcellos-Hoff et al., 1994). Il existe également des preuves que l'irradiation polarise les macrophages vers un phénotype de type M2, immunosuppresseur et pro-tumoral (Tsai et al., 2006; Chiang et al., 2012). Enfin, des données récentes indiquent que les LTreg sont intrinsèquement plus radio-résistants que les autres types de LT et que leur nombre est proportionnellement augmenté après la RT (Kachikwu et al., 2011). Toutefois, il reste à déterminer si l'activité suppressive des LTreg est partiellement altérée après l'irradiation (Billiard et al., 2011).

III.2.2 Effets des rayonnements ionisants sur le système immunitaire

Plusieurs études ont montré les différents mécanismes par lesquels la RT stimule le système immunitaire.

A) Le relargage d'antigènes associés aux tumeurs (TAA)

Une des conséquences majeure induite par la destruction tumorale suite aux irradiations est l'exposition d'une grande quantité de TAA au système immunitaire. Ce relargage d'antigènes tumoraux se présente sous la forme de cellules tumorales nécrotiques ou apoptotiques et de débris cellulaires (Chen et al., 2001b; Kotera et al., 2001). La disponibilité accrue de ces TAA libérés permet aux DC circulantes de les capturer et de les présenter facilement pour ensuite induire une réponse immunitaire T spécifique de la tumeur. Une étude a mis en évidence que les tumeurs irradiées exprimant de faibles niveaux d'antigène, sous forme de complexe CMH-peptide, fournissent une quantité suffisante de TAA pour permettre

la destruction des cellules du stroma tumoral par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques (Zhang et al., 2007).

De plus, la mort cellulaire induite par l'irradiation peut permettre le relargage de nouveaux TAA qui vont pouvoir être pris en charge par les DC dans le microenvironnement tumoral et les ganglions lymphatiques. Reits *et al.* ont démontré que dans les cellules tumorales, la RT augmente le répertoire peptidique disponible pour les molécules de CMH-I présentées aux LT CD8⁺ cytotoxiques. Ce plus grand répertoire est dû, non seulement à l'augmentation de la dégradation des protéines existantes, mais aussi à l'activation de la voie de mTOR, qui conduit à une traduction protéique accrue et donc à la création d'un nouveau répertoire peptidique (Reits et al., 2006).

B) La mort cellulaire immunogène

Toute mort cellulaire n'entraîne pas une réponse immunitaire. L'organisme est en effet capable de faire la distinction entre mort immunogène et mort non-immunogène ce qui va avoir comme conséquence l'activation d'une immunité adaptative ou le maintien de la tolérance.

La mort des cellules tumorales induite par les radiations ionisantes peut être assez immunogène et potentialise la présentation des TAA par les DC pour activer les LT afin de mettre en place une réponse immunitaire (Ma et al., 2010; Zitvogel et al., 2010). Trois signaux moléculaires de danger, les DAMP (Danger associated molecular pattern) ont été définis comme essentiels pour l'induction d'une mort cellulaire immunogène.

1) la translocation d'une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique, la calréticuline (CRT), sur la face externe de la membrane plasmique de la cellule en apoptose constitue un signal important appelé « eat-me » signal pour les CPA professionnelles comme les DC (Obeid et al., 2007; Panaretakis et al., 2009; 2008; Sukkurwala et al., 2014).

2) La libération par ces mêmes cellules de la protéine HMGB1 (high mobility group box 1, une protéine non-histone associée à la chromatine et présente de manière ubiquitaire dans le noyau des cellules), va transmettre des signaux pro-inflammatoires suite à leur liaison au TLR4 (Toll-like receptor 4) (Yamazaki et al., 2014; Scaffidi et al., 2002; Tang et al., 2010).

Ces deux types de DAMP, la CRT et HMGB1 sont induits suite à l'exposition des cellules aux radiations ionisantes (Apetoh et al., 2007; Obeid et al., 2007).

3) Le troisième signal est la libération de l'ATP par les cellules engagées dans la mort par apoptose. L'ATP fonctionne à la fois comme un « find-me » signal pour les CPA professionnelles et comme un signal pro-inflammatoire puissant en se liant au récepteur purinergique P₂X₇ déclenchant ainsi l'activation de l'inflammasome (Aymeric et al., 2010; Martins et al., 2009; 2014; Chekeni et al., 2010; Elliott et al., 2009; Ghiringhelli et al., 2009). Son relargage n'a pas encore été démontré suite à l'irradiation. Etant donné que l'autophagie est nécessaire à la libération d'ATP (Michaud et al., 2011), et que les rayonnements ionisants favorise l'autophagie (Rieber and Rieber, 2008; Rodriguez-Rocha et al., 2011), ce troisième signal est susceptible d'être généré par la RT lorsque l'autophagie précède la mort cellulaire.

L'ensemble de ces données expérimentales confirme l'induction par les radiations ionisantes d'une mort des cellules tumorales qui est perçue par le système immunitaire comme dangereuse et par conséquent, une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique peut se développer.

C) Les cytokines

La RT possède la capacité de modifier le microenvironnement tumoral en créant un contexte pro-inflammatoire (Formenti and Demaria, 2013). Par exemple, les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL16, favorisant le recrutement des LT CD8⁺ effecteurs et des LT CD4⁺ auxiliaires T_H1, sont induites par les rayonnements ionisants dans différents types de tumeurs (Lugade et al., 2008; Matsumura et al., 2008; Matsumura and Demaria, 2010). L'irradiation va également favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IFN de type I (IFN- α , - β et - ω), de type II (IFN- γ) ou encore le TNF α qui participe à l'effet cytotoxique de l'irradiation sur les tumeurs (Lugade et al., 2008; Formenti and Demaria, 2013; Burnette et al., 2011; Ishihara et al., 1993). L'expression de ces cytokines est reliée à une régression de la tumeur, l'inhibition de la prolifération tumorale et la mort des cellules tumorales. La RT peut donc être un moyen efficace d'induire une inflammation aiguë facilitant la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

D) Les vaisseaux

Une fois activés, les LT doivent être en mesure de pouvoir rejoindre et infiltrer la tumeur. Les rayonnements ionisants peuvent promouvoir ce processus de multiples façons. Par exemple, le remodelage radio-induit des vaisseaux tumoraux anormaux donne lieu à une infiltration tumorale efficace par les cellules T anti-tumorales suite à leur transfert adoptif

dans un modèle murin de tumeur spontanée des cellules β du pancréas (Ganss et al., 2002). Dans un modèle expérimental murin de mélanome, l'augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) induits par les rayonnements ionisants engendre une amplification de l'infiltration par les LT dans la tumeur (Lugade et al., 2005).

III.2.3 Effets des rayonnements ionisants sur l'immunogénicité tumorale

Bien que la RT soit traditionnellement utilisée pour détruire les cellules tumorales, une partie des cellules au sein d'une masse tumorale donnée reçoivent des doses de rayonnement trop faibles pour provoquer leur destruction (phénomène accentué par la présence de zones hypoxiques). Un certain nombre d'études précliniques ont montré que ces faibles doses de rayonnements sont capables d'induire des changements phénotypiques dans les cellules tumorales qui facilitent leur reconnaissance et leur destruction par le système immunitaire et les LT.

Les molécules décrites pour être modifiées à la surface des cellules tumorales par de telles doses de rayonnements ionisants sont **les TAA, les molécules de CMH-I, le récepteur de mort Fas (CD95), les ligands de NKG2D, la molécule de co-stimulation B7-1 (CD80), et les molécules d'adhésion LFA-3 (CD58 ou lymphocyte function-associated antigen 3) et ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)** (Vereecque et al., 2000; Vondráček et al., 2001; Chakraborty et al., 2003; Garnett et al., 2004; Reits et al., 2006; Ifeadi and Garnett-Benson, 2012; Kim et al., 2006).

Comme rapporté précédemment, ces molécules sont connues pour jouer un rôle dans la destruction tumorale par les LT CD8⁺ cytotoxiques. Les molécules de CMH-I sont responsables de la présentation directe de peptides antigéniques de la tumeur aux LT CD8⁺ cytotoxiques, tandis que l'augmentation du nombre de molécules d'adhésion améliore la fixation entre cellules ce qui potentialise la capacité du LT à tuer sa cible (Kwilas et al., 2012; Reits et al., 2006). L'apoptose induite par l'interaction Fas/Fas-L joue un rôle important dans la destruction des cellules tumorales par les LT CD8⁺ cytotoxiques.

Chakraborty *et al.* ont démontré *in vitro* que l'irradiation γ d'une lignée cellulaire d'adénocarcinome murin transfectée pour exprimer l'antigène carcino-embryonnaire humain

(CEA, MC38-hCEA⁺), améliore l'expression de deux molécules de surface : Fas et ICAM-1, d'une manière dose dépendante. De plus, ils ont rapporté, toujours *in vitro*, que l'exposition aux rayonnements γ (20 Gy) améliore la lyse de cette lignée cellulaire murine par les LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques de l'antigène par l'intermédiaire de la voie Fas/Fas-L (Chakraborty et al., 2003).

Une étude de suivi a observé si ce phénomène se produisait aussi pour les cellules cancéreuses humaines. Une grande variété de lignées de carcinome humain ont été utilisées (12 de côlon, 7 de poumon, et 4 de prostate). Garnett *et al.* ont investigué si des rayonnements γ de 10 ou 20 Gy pouvaient altérer l'expression de multiples molécules impliquées dans la lyse tumorale induite par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (à savoir la molécule Fas, des molécules d'adhérence, les molécules de CMH-I, et des TAA : CEA et MUC-1). Ils ont constaté qu'au minimum, une de ces molécules était surexprimée dans 91 % des lignées cellulaires après irradiation (Garnett et al., 2004). Enfin, les 5 lignées de cancer du côlon CEA⁺-HLA-A2⁺ ont été détruites plus efficacement par les LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques du complexe CMH-peptide, HLA-A2-CEA, suite à leur irradiation par rapport aux témoins non irradiés (Garnett et al., 2004). Ces études *in vitro* démontrent collectivement que la RT peut rendre les cellules tumorales murines et humaines plus sensibles à la reconnaissance et à la lyse par le système immunitaire.

Pour tester l'effet d'une irradiation par un émetteur de particules β^- , le samarium-153, utilisé en clinique pour le traitement palliatif des métastases osseuses, a été testé sur 10 lignées cancéreuses humaines (4 cancers de la prostate, 2 cancers du sein et 4 cancers du poumon). Toutes les tumeurs investiguées ont vu leur expression de Fas et de CEA augmenter en réponse au samarium-153 et la majorité a montré une augmentation de MUC-1 (70%), des CMH-I (40%) et de ICAM-1 (30%). Un test de cytotoxicité a également été réalisé sur une des lignées de cancer de la prostate (LNCaP). Cette lignée était plus sensible à la lyse par des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques des TAA : PSA, CEA ou MUC-1 après traitement au samarium-153 (Chakraborty et al., 2008b). L'ensemble de ces travaux démontre clairement que l'irradiation entraîne une sensibilité accrue des cellules tumorales à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques.

Il a aussi été montré que les radiations ionisantes peuvent induire l'augmentation d'expression de multiples ligands de NKG2D, récepteur activateur des cellules NK, à la surface des cellules tumorales. L'expression de ces ligands favorise la lyse des cellules tumorales par les cellules NK (Kim et al., 2006).

Les effets potentiels induits par les rayonnements ionisants sur la tumeur et le microenvironnement tumoral en relation avec le système immunitaire pour faciliter le rejet de la tumeur sont résumés sur la figure 28 :

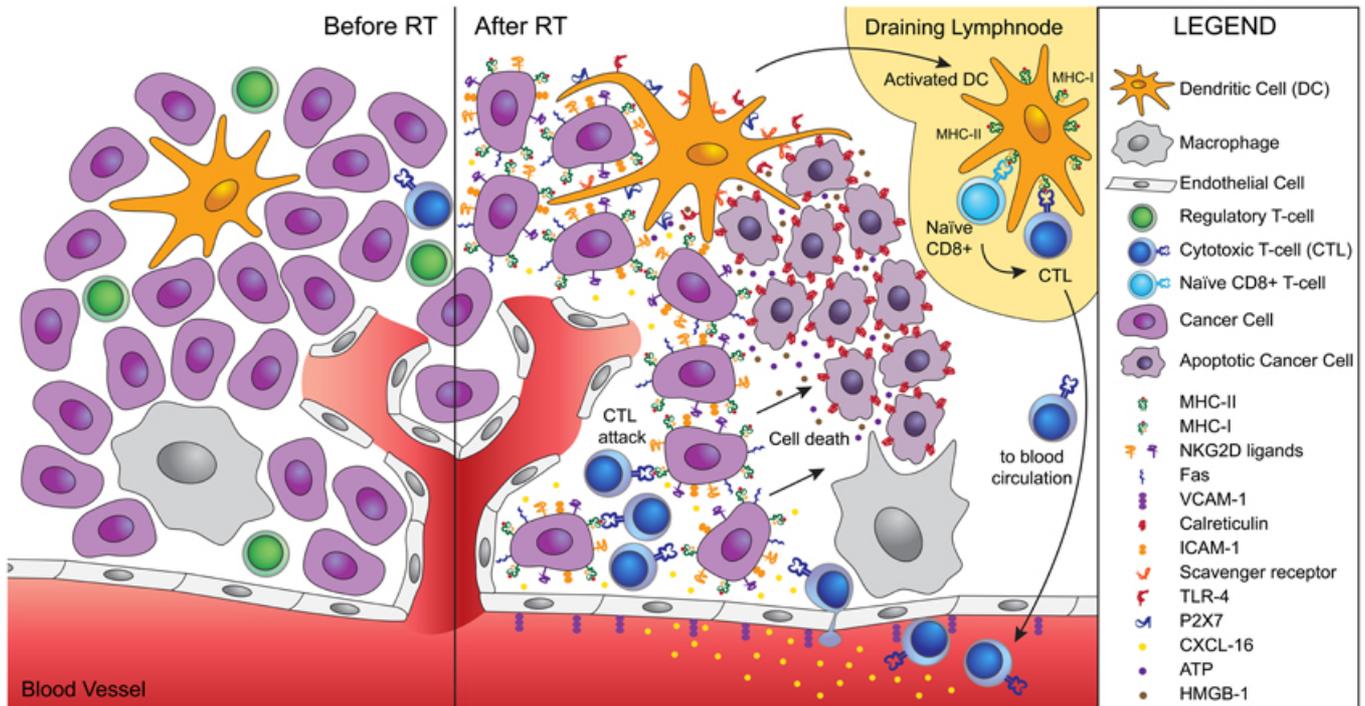


Figure 28 : Les rayonnements ionisants agissent comme des modificateurs du microenvironnement tumoral afin de permettre au système immunitaire d'être efficace (Demaria and Formenti, 2012).

La RT induit une mort cellulaire immunogène des cellules tumorales, caractérisée par la translocation de la calréticuline à la surface des cellules mourantes, la libération de protéines HMGB-1 et de l'ATP. La CRT permet la phagocytose des cellules mourantes par les DC et sa liaison à des récepteurs dits « scavenger ». La protéine HMGB-1 se lie au TLR4 et favorise la présentation croisée des antigènes de tumeur, tandis que l'ATP se lie à P₂X₇ et déclenche l'activation de l'inflammasome. Les DC activées migrent vers le ganglion lymphatique drainant, où ils activent les LT naïfs spécifiques d'antigènes tumoraux. Les lymphocytes T CD8⁺ activés acquièrent des fonctions effectrices et vont circuler jusqu'à la tumeur guidée par des chimiokines induites par les rayonnements. L'infiltration tumorale de ces LT CD8⁺ cytotoxiques est facilitée par la surexpression de VCAM-1 induite par les rayonnements sur l'endothélium vasculaire. Une fois dans la tumeur, les LT CD8 cytotoxiques vont interagir efficacement avec les cellules tumorales exprimant des niveaux élevés de CMH-I, ICAM-1, des ligands de NKG2D, et Fas qui favorisent la formation de synapses immunologiques stables entre les cibles et les effecteurs afin de détruire les cellules tumorales. Les cellules tumorales tuées par les LT CD8⁺ cytotoxiques deviennent à leur tour, une source d'antigènes pour la présentation croisée par les DC, alimentant ainsi le processus.

L'ensemble de ces données suggère que les rayonnements ionisants peuvent activer le système immunitaire, et donc envisager des associations thérapeutiques semblent être une alternative intéressante pour augmenter la destruction des cellules tumorales.

III.3 Association thérapeutique : rayonnements ionisants et immunothérapies anti-tumorale

Les nombreuses études citées précédemment démontrent collectivement que les rayonnements ionisants peuvent être utilisés pour rendre les cellules tumorales plus sensibles à la reconnaissance et à la destruction par le système immunitaire. Cette constatation est à la base de l'utilisation combinatoire de l'irradiation de la tumeur et des stratégies d'immunothérapie.

III.3.1 Evidences précliniques de la synergie suite à l'association de la radiothérapie et de l'immunothérapie.

Il y a près de 40 ans, Milas *et al.* ont étudié dans un modèle préclinique la possibilité de stimuler le système immunitaire par l'administration de bactéries pour améliorer les effets anti-tumoraux de la RT locale (Milas et al., 1975). En 2005, le groupe de Demaria a proposé le concept d'exploiter la RT pour aider l'immunothérapie (Demaria et al., 2005a). Malgré l'incrédulité initiale, au cours des années suivantes, le nombre d'études précliniques qui ont rapporté de bons résultats en combinant l'irradiation locale et l'immunothérapie n'ont cessé d'augmenter, induisant des effets bénéfiques sur le système immunitaire de l'hôte, comme le résume le tableau 12.

Tableau 12 : Combinaisons de stratégies d'immunothérapie et de radiothérapie locale testées dans des modèles précliniques (Formenti and Demaria, 2013).

Stratégie d'immunothérapie	Programme thérapeutique	Effets des rayonnements ionisants sur le système immunitaire	Immunomodulations détectées	Référence
Injection de Flt3 ligand	Post-irradiation	Relargage TAA	Stimulation des DCs Induction d'une immunité anti-tumorale dépendante des LT	(Chakravarty et al., 1999; Demaria et al., 2004)
Injection de DC en s.c ou i.v	Post-irradiation	Recrutement de DC et relargage TAA	Induction d'une immunité anti-tumorale dépendante des LT	(Nikitina and Gabrilovich, 2001)

Injection de DC en intra-tumorale	Post-irradiation	Relargage TAA	Induction d'une immunité anti-tumorale dépendante des LT	(Teitz-Tennenbaum et al., 2003; Kim et al., 2004)
Injection de CpG en s.c , péri-tumorale ou intra-tumorale	Pré-irradiation et post-irradiation	Relargage TAA	Induction d'une immunité anti-tumorale dépendante des LT	(Milas et al., 2004; Mason et al., 2005)
Injection d'un agoniste du TLR9 en s.c	De façon concomitante et post-irradiation	Relargage TAA	Recrutement et activation de NKDC	(Zhang et al., 2012)
Injection de l'ECI301 en i.v	Post-irradiation	Relargage TAA	Induction d'une immunité anti-tumorale dépendante des LT	(Shiraishi et al., 2008)
Injection d'un anticorps anti-CTLA-4 en i.p	Post-irradiation	Relargage TAA	Induction d'une immunité anti-tumorale dépendante des LT	(Demaria et al., 2005b; Dewan et al., 2009)
		Relargage CXCL16	Amélioration du recrutement de LT CD8 ⁺ effecteurs CCR6 ⁺	(Matsumura et al., 2008)
		Induction de l'expression de ligands de NKG2D sur les cellules tumorales	Interactions stables entre les LT CD8 ⁺ effecteurs NKG2D ⁺ et les cellules tumorales	(Ruocco et al., 2012)
Injection d'un anticorps anti-CD137 en i.p ou en i.v	Post-irradiation	Relargage TAA et/ou l'expression de CMH-I sur les cellules tumorales	Induction d'une immunité anti-tumorale dépendante des LT	(SHI and SIEMANN, 2006; Newcomb et al., 2010)
Injection d'anticorps anti-CD137 et anti-PD-1 en i.p	De façon concomitante et post-irradiation	Relargage TAA	Induction d'une immunité anti-tumorale dépendante des LT	(Verbrugge et al., 2012)
Transfert adoptif de lymphocytes T	Post-irradiation	Induction du récepteur de Fas sur les cellules tumorales	Amélioration de la destruction tumorale par les LT CD8 ⁺ effecteurs transférés	(Chakraborty et al., 2003)
		Surexpression de CMH-I sur les cellules tumorales		(Reits et al., 2006)
Injection de vaccins et d'avipox recombinants exprimant le CEA et des molécules de co-stimulations des LT	Pré-irradiation et post-irradiation	Induction du récepteur de Fas sur les cellules tumorales	Amélioration de la destruction tumorale par les LT induits par le vaccin	(Chakraborty et al., 2004)
Injection de vaccins à base de cellules tumorales exprimant le GM-CSF	Post-irradiation	Surexpression de CMH-I sur les cellules tumorales	Amélioration de la destruction tumorale par les LT induits par le vaccin	(Newcomb et al., 2006)

A) Combinaison de la radiothérapie et du transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques (ACT)

Un certain nombre d'études précliniques ont démontré que le traitement localisé de tumeurs avec de faibles doses de RT externe agit en synergie avec le transfert adoptif de LT spécifiques de tumeurs pour améliorer les réponses immunitaires anti-tumorales (cf tableau 12).

Chakraborty *et al.* ont démontré que la radiothérapie externe (8 Gy) de tumeurs sous-cutanées MC38-hCEA⁺ améliore nettement l'efficacité de l'immunothérapie par ACT de CTL. Dans cette étude, des souris C57BL6 transgéniques pour le CEA humain ont été injectées avec des cellules MC38-hCEA⁺ en sous-cutané dans la patte arrière. Neuf jours plus tard, les souris ont été réparties en groupe pour recevoir, la RT externe de la tumeur seule ou l'ACT de CTL spécifiques du CEA seul, la combinaison de la RT externe et de l'ACT ou aucun traitement. La RT externe seule ou l'ACT seul n'ont pas eu d'impact significatif sur la croissance des tumeurs chez ces souris par rapport à des témoins non traités (Chakraborty et al., 2003). Cependant, le traitement de tumeurs avec la combinaison de la RT externe et l'ACT de CTL a entraîné une réduction significative de la croissance et du volume tumoral. De plus, 50% des souris recevant le traitement combiné sont restées sans tumeur pendant toute la durée de l'expérience (40 jours; (Chakraborty et al., 2003)).

Dans une étude similaire, des souris ont été implantées avec les cellules tumorales de carcinome MC38. Une fois les tumeurs établies, les souris ont reçu la RT externe (10 Gy) et/ou l'ACT de CTL spécifiques de gp70 (Reits et al., 2006). Ni la RT, ni l'ACT seul n'ont pu soigner les souris. Cependant, la combinaison de l'irradiation locale de la tumeur et l'ACT de CTL a réduit significativement la masse tumorale et dans la plupart des souris, la tumeur a pu être éradiquée complètement.

Enfin, dans un modèle murin de mélanome, il a été rapporté que l'administration de fortes doses d'irradiations avant l'ACT de LT spécifiques de la tumeur, est associée à une plus grande probabilité de réponse contre la tumeur (Wrzesinski et al., 2010). Dans cette étude, il est montré que la lymphodéplétion créée suite à la RT permet l'obtention d'un contexte inflammatoire anti-tumoral bénéfique (augmentation de l'IL-1 α , IL-6 et LPS dans le sérum) et un ratio favorable des LT CD8⁺ injectés par rapport aux cellules immunosuppressives (LTreg, MDSCs).

B) Combinaison de la radioimmunothérapie et de l'immunothérapie

Très peu d'études ont étudié le potentiel immunologique de la RIT, quelque soit le radioisotope utilisé. Toutefois, une étude récente a décrit la possibilité de modifier le phénotype de cellules tumorales afin d'améliorer leur ciblage par le système immunitaire grâce à un AcM radiomarqué à un émetteur β^- (Chakraborty et al., 2008a). Dans cette étude, les mêmes souris que précédemment, transgéniques pour le CEA humain, ont été injectées avec des cellules tumorales MC38-hCEA, puis traité avec un AcM anti-CEA couplé à l'yttrium-90 seul ou en combinaison avec une thérapie vaccinale ciblant le CEA. Une dose unique de l'AcM radiomarqué en combinaison avec le vaccin augmente significativement la survie des souris gréffées avec la tumeur par rapport à ces mêmes souris traitées par le vaccin seul ou l'AcM couplé à l'yttrium-90 seul. Il est intéressant de noter que les souris recevant l'association thérapeutique ont également une augmentation du pourcentage de LT CD8⁺ spécifiques du CEA viables infiltrant les tumeurs par rapport aux souris recevant le vaccin seul. Cela prouve que ces cellules n'ont pas été affectées par la source de rayonnements ionisants. De façon semblable à ce qui a été constaté avec la RT externe, les souris soignées ont développé une cascade de TAA, entraînant des réponses T CD4⁺ et T CD8⁺ non seulement contre le CEA, mais également contre des TAA non codés par le vaccin.

III.3.2 Evidences cliniques de la synergie suite à l'association de la radiothérapie et de l'immunothérapie.

Certaines de ces combinaisons précliniques réussies se sont montrées très prometteuses en clinique. Par exemple, les stratégies visant à améliorer le nombre et/ou les capacités fonctionnelles des DC ont inspiré deux essais cliniques. Le premier a testé la combinaison de l'injection sous-cutanée de GM-CSF avec une RT locale chez des patients atteints de tumeurs solides métastatiques. Dans ce protocole, la RT a été donnée pendant 2 semaines avec des injections sous-cutanées de GM-CSF introduites au cours de la deuxième semaine et maintenue pendant 14 jours consécutifs. Une réponse abscopale a été détectée chez 30% des patients (Formenti and Demaria, 2009). Le deuxième exemple vient d'un essai de phase I au cours duquel a été fait une injection intratumorale de DC autologues, deux jours après la RT, chez des patients atteints de carcinome hépatocellulaire avancé. Une réponse partielle a été signalée dans 2 des 14 patients (Formenti and Demaria, 2013). Dans une autre

étude, les DC ont été injectées dans des sarcomes de façon concomitante à une RT fractionnée. Lors de la chirurgie, les tumeurs ont présenté une infiltration par des LT, avec des réponses immunitaires spécifiques de la tumeur démontrées chez 9 des 17 patients (Finkelstein et al., 2012).

L'injection intratumorale de CpG, stimulant les DC par sa fixation au TLR9, chez 15 patients atteints de lymphome B, recevant la RT sur le même site tumoral, a donné lieu à un effet abscopal au niveau des tumeurs non irradiées avec le développement de LT CD8⁺ spécifiques de la tumeur. Une réponse clinique complète et trois réponses partielles ont été observées (Brody et al., 2010).

Un essai de phase I/II a testé, chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique hormono-résistant, la combinaison de la RT avec l'ipilimumab, un anticorps anti-CTLA-4 utilisé normalement chez des patients atteints de mélanome métastatique. Une RT unique de 8 Gy a été donnée avant le début du traitement à l'ipilimumab, cette association a montré le même profil de toxicité et les mêmes réponses contre l'antigène prostatique que lorsque l'anticorps est administré seul (Slovin et al., 2013). Des essais randomisés de phase III sont en cours pour tester les effets positifs potentiels de cette combinaison.

Un cas récent d'effet abscopal a été démontré après RT et injection d'ipilimumab chez une patiente atteinte d'un mélanome en progression (et ayant également reçu de l'ipilimumab avant la RT) (Postow et al., 2012). Cet événement démontre la synergie de la thérapie combinée associant RT et anticorps anti-CTLA-4 mise en évidence dans des études précliniques (Demaria et al., 2005b; Dewan et al., 2009).

Dans un essai de phase II, Gulley *et al.* ont testé un vaccin à base de virus de la variole exprimant l'antigène spécifique de la prostate (PSA) en combinaison avec une RT standard chez des patients atteints d'un cancer localisé de la prostate (Gulley et al., 2005). La première vaccination a été réalisée avant la RT, et les sept suivantes tous les mois. Le but de cette étude était de tester la faisabilité de la vaccination dans le cadre de la RT. Des réponses T anti-PSA ont été observées dans 13 des 17 patients ayant terminés les vaccinations, et chez les patients recevant la thérapie combinée, de nouvelles réponses T contre d'autres antigènes de la prostate ont été démontrées (PSCA, MUC-1 et PAP : antigène-spreading).

A) Combinaison de la radiothérapie et du transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques

Comme nous l'avons vu et décrit dans la partie ACT du chapitre I (I.4.2 partie B) ACT), cette stratégie combinatoire, au niveau clinique, a été réalisée principalement pour le traitement du mélanome. Avant la réinjection de ces cellules dont la prolifération s'est faite *ex vivo*, les patients reçoivent une chimiothérapie avec ou sans une irradiation corporelle totale. Cette approche a démontré une efficacité remarquable dans le traitement du mélanome (Rosenberg et al., 2011). Comme nous l'avons décrits, le « vide » provoqué par la RT suite à la lymphodéplétion va favoriser l'action et la prolifération des LT transférés et dans une comparaison de plusieurs études pilotes, les régimes d'irradiation corps totale utilisant les doses les plus hautes de RT (12 Gy en 6 fractions) ont donné lieu à des taux de réponse plus élevés (Dudley et al., 2008), comme cela a été mis en évidence au niveau préclinique (Wrzesinski et al., 2010).

B) Combinaison de la radioimmunothérapie et de l'immunothérapie

Cette stratégie combinatoire est encore sous investigation, des essais cliniques sont en cours et les résultats ne sont pas encore connus. La RIT β est principalement utilisée en raison de l'approbation par la FDA de certains anticorps radiomarqués par des émetteurs β^- . Ces essais cliniques étudient principalement l'association de la RIT β avec la chimiothérapie ou des anticorps froids (Vacchelli et al., 2013).

Chapitre IV : Le myélome multiple : modèle d'association thérapeutique pour la RIT α et l'immunothérapie anti-tumorale

IV.1 Epidémiologie et caractéristiques cliniques

Le myélome multiple (MM), ou maladie de Kahler, est un cancer touchant certaines cellules spécifique du sang, les plasmocytes. Les plasmocytes sont des LB effecteurs différenciés au niveau des centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires, et que l'on trouve par la suite localisés dans les organes lymphoïdes périphériques ou dans la moelle osseuse. En situation normale, ces lymphocytes jouent un rôle important dans le système immunitaire car ces cellules produisent des anticorps qui vont permettre de combattre un grand nombre d'infections et de maladies. Les cellules cancéreuses dans le MM sont des plasmocytes tumoraux monoclonaux qui se trouvent dans la moelle osseuse. Ces cellules vont sécréter une immunoglobuline monoclonale (appelée paraprotéine ou protéine-M). Ce cancer disséminé à un développement rapide et se trouve être particulièrement invalidant.

Cette hémopathie maligne représente environ 1% des cancers et 13% des cancers hématologiques. Dans les pays occidentaux, l'incidence annuelle est estimée à 5,6 cas pour 100 000 personnes (Altekruse et al., 2010). L'âge médian, au moment du diagnostic, est d'environ 70 ans. Trente sept pour cent des patients ont moins de 65 ans , 26 % ont entre 65 et 74 ans, et 37 % sont âgés de 75 ans ou plus (Altekruse et al., 2010; Kristinsson et al., 2007).

Au niveau clinique, le MM est caractérisé par la prolifération clonale de ces plasmocytes tumoraux dans le microenvironnement de la moelle osseuse. Le plus souvent, la présence en quantité importante d'immunoglobulines monoclonales dans le sang (majoritairement IgG ou IgA) et/ou de chaînes légères dans les urines (protéinurie de Bence Jones, le type κ étant deux fois plus fréquent que le λ) sont détectées. Les patients atteints de MM peuvent développer une insuffisance rénale, des lésions du squelette avec ou sans hypercalcémie, une diminution de la sécrétion d'immunoglobulines par les plasmocytes

normaux, une déficience de l'hématopoïèse et des infections bactériennes récurrentes (Kyle and Rajkumar, 2004). Les symptômes cliniques les plus fréquents sont la fatigue et des douleurs osseuses pouvant aller à des fractures pathologiques spontanées.

IV.2 Caractéristiques biologiques

L'origine du MM reste indéterminée. Néanmoins, de plus en plus d'études suggèrent que le développement d'un MM découle de plusieurs étapes incluant l'acquisition de plusieurs modifications structurales chromosomiques. Ces modifications chromosomiques comprennent des chromosomes surnuméraires (hyperdiploïdies), des amplifications ou délétions, ou des translocations impliquant les gènes codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines (Fonseca et al., 2009). Cette maladie d'origine hématopoïétique se caractérise par une prolifération plasmocytaire maligne touchant essentiellement la moelle osseuse.

IV.2.1 Rôle du microenvironnement hématopoïétique dans la progression du myélome multiple

Le microenvironnement de la moelle osseuse participe activement à la pathogenèse et à la progression de la maladie. En effet, les composants du stroma influencent profondément de nombreuses étapes de la progression de la tumeur, telles que la prolifération tumorale, l'invasion, l'angiogenèse, les métastases, et même les transformations malignes (Dvorak et al., 2011). La moelle osseuse, où les cellules de MM ont élu majoritairement domicile, offre un microenvironnement hautement adapté aux plasmocytes néoplasiques, qui va à son tour, être façonnée par les interactions avec les cellules de MM (Tripodo et al., 2011; Burger et al., 2009; Hideshima et al., 2007). Les cascades de signalisation induites par les cellules situées dans le microenvironnement de la moelle osseuse, ainsi que par les cellules osseuses affectent non seulement la propagation et la survie des cellules tumorales, mais aussi la différenciation et l'activation des ostéoblastes et ostéoclastes, contribuant ainsi à l'apparition de lésions ostéolytiques.

Le microenvironnement de la moelle osseuse est constitué de nombreux types cellulaires: des cellules hématopoïétiques, des cellules du système immunitaire, des cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC), des cellules souches mésenchymateuses (MSC), des ostéoclastes, des ostéoblastes et des cellules endothéliales (CE), qui sont intégrés dans une matrice extracellulaire (MEC) (figure 29).

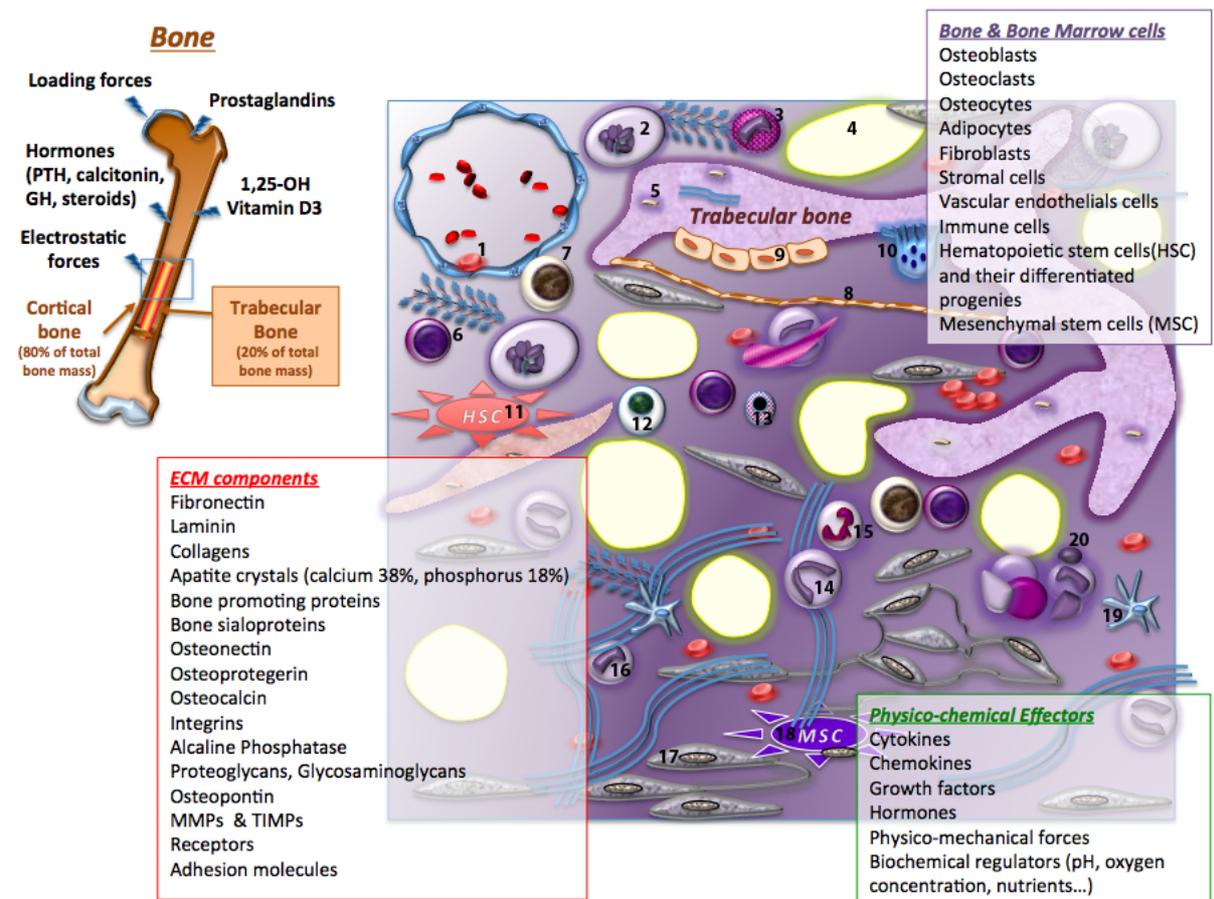


Figure 29 : Le microenvironnement de la moelle osseuse (Ferrarini et al., 2013).

1- Globules rouges, 2- mégacaryocytes, 3- basophiles, 4- adipocytes, 5-ostéocytes, 6- lymphocytes B, 7- Monocytes, 8- lignées d'ostéoblastes, 9- ostéoblastes, 10-ostéoclastes, 11- niche de cellules souches hématopoïétiques, 12- lymphocytes T, 13- cellules NK, 14- éosinophiles, 15- neutrophiles, 16- monocytes, 17- cellules stromales, 18- niche de cellules souches mesenchymateuses, 19- cellules dendritiques, 20- plaquettes

L'homéostasie osseuse est le résultat d'un réseau complexe de stimuli, comprenant les hormones, les vitamines et les forces physico-mécaniques. En plus des ostéoblastes et des ostéoclastes, responsables du dépôt et de la résorption osseuse, le microenvironnement hématopoïétique englobe plusieurs types de cellules, comme les cellules hématopoïétiques, les cellules endothéliales et les cellules mésenchymateuses, toutes noyées dans une matrice extra-cellulaire complexe (MEC).

La domiciliation sélective des cellules tumorales dans le microenvironnement médullaire dépend de chimiokines, notamment de l'interaction de SDF-1 (CXCL12, stromal cell-derived factor-1) avec le récepteur CXCR4 qui est exprimé sur les cellules tumorales de MM (Alsayed et al., 2007). Dans un second temps, elles interagissent avec la MEC et les cellules de la moelle osseuse au moyen de molécules d'adhésion comme les intégrines. Les interactions complexes entre les cellules de MM et le microenvironnement hématopoïétique ainsi que les événements tumoraux associés sont représentés sur la figure 30 (partie supérieure).

Ces différentes interactions induisent la libération de facteurs solubles (figure 30, partie inférieure). Ces facteurs solubles vont permettre la survie/prolifération des cellules de MM, une déficience des fonctions immunitaires, une augmentation de l'ostéoclastogenèse ainsi que de l'angiogenèse. L'ensemble de ces facteurs va permettre aux cellules de MM de proliférer, de survivre et de résister aux agents de chimiothérapie (Hideshima et al., 2007). De plus, l'adhérence des cellules de MM aux BMSC et aux composants de la MEC déclenche, non seulement des signaux anti-apoptotiques, mais aussi la libération d'un facteur de survie : l'IL-6. Enfin, les cellules de MM plasmatiques et les BMSCs vont libérer des facteurs activateurs des ostéoclastes comme l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α , RANK-L et MIP-1 α . Il est intéressant de noter que les cellules de MM peuvent également participer à la formation d'ostéoclastes par interaction avec le stroma et en particulier les DC (Kukreja et al., 2009).

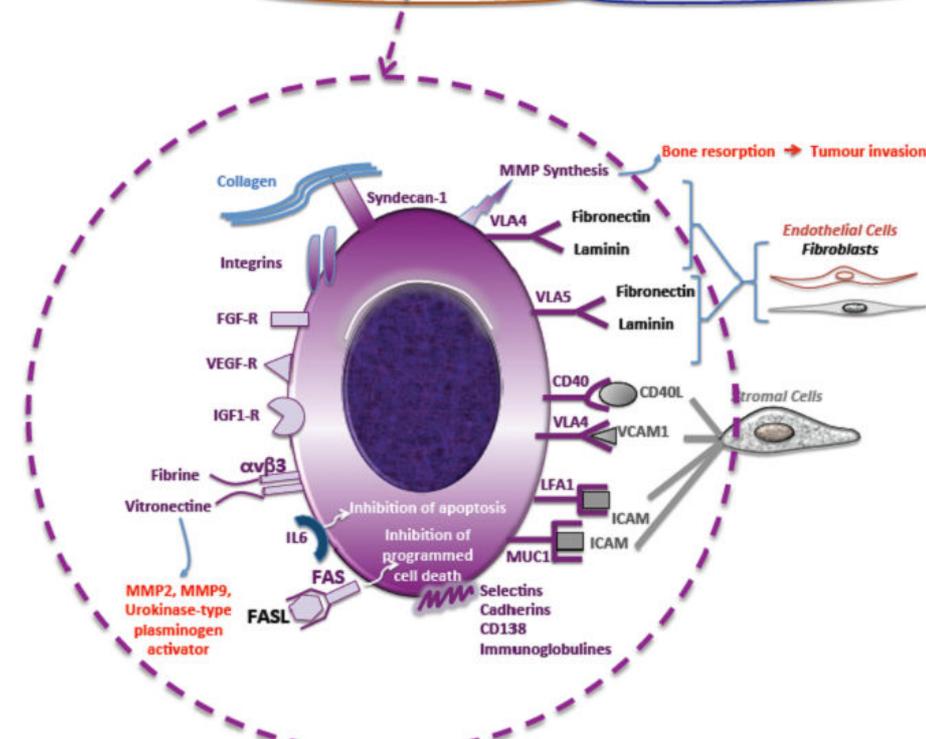
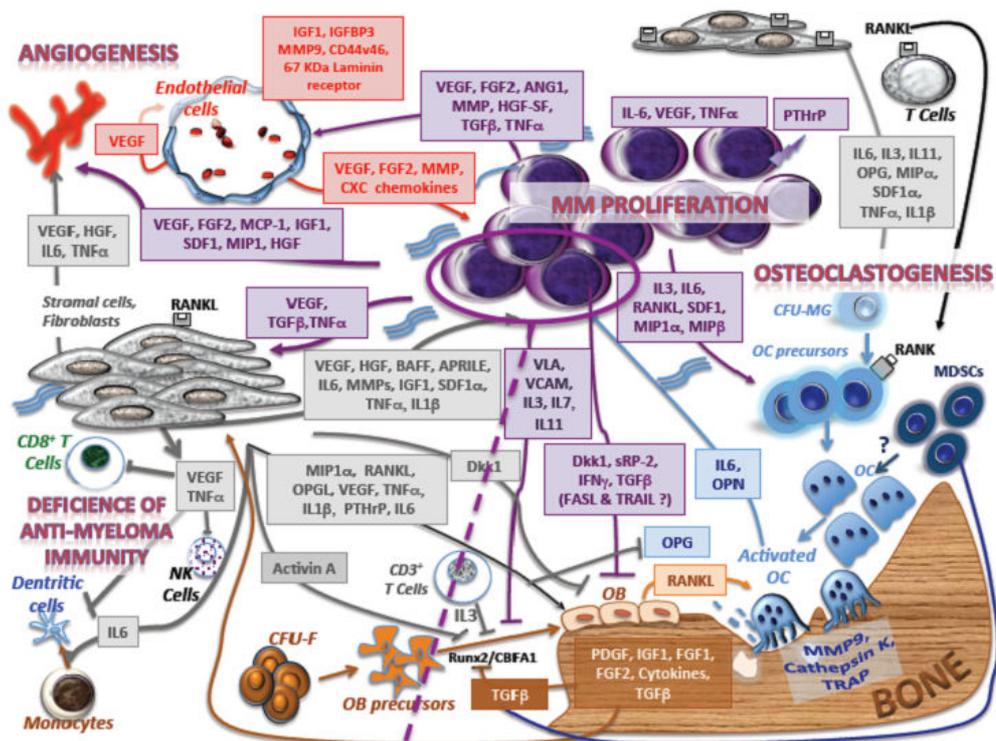


Figure 30 : Interactions entre les cellules de MM et le microenvironnement de la moelle osseuse (Ferrarini et al., 2013).

Partie supérieure: représentation schématique des cellules de MM dans le microenvironnement; les facteurs solubles impliqués dans le développement de la pathologie, à savoir : la prolifération et la survie tumorale, l'angiogenèse, l'ostéoclastogénèse et la déficiences des fonctions immunitaires sont représentées.

La partie inférieure illustre les principaux récepteurs de facteurs de croissance et les molécules d'adhérence utilisés par les cellules de MM pour interagir avec la MEC et les composants cellulaires du microenvironnement de la moelle osseuse.

IV.2.2 Système immunitaire et myélome multiple

Les cellules de MM ont également la capacité d'échapper à la surveillance immunitaire via plusieurs mécanismes, comme la diminution du potentiel cytotoxique des effecteurs du système immunitaires dont les LT et l'induction de dysfonctionnement des DC (figure 30) (Oranger et al., 2013).

Chez la souris, les cellules de MM inhibent la différenciation et l'activation des DC, comme le montre la faible expression d'antigènes par les DC et leur faible capacité d'activation des LT (Wang et al., 2006a).

Brown *et al.* ont documenté la déficience des DC circulantes de patients atteints de MM. En effet, il est apparu que ces DC ne pouvaient pas induire l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation du système immunitaire (Brown et al., 2001). Une étude suggère que la réduction de la fonction des DC implique une progression de la maladie (Brown et al., 2001). Les cytokines produites activement par les cellules de MM telles que l'IL-6, l'IL-10, le TGF- β et le VEGF (Brown et al., 2001) sont abondantes dans la moelle osseuse, ainsi que dans le sérum (Wang et al., 2006b). Ces cytokines vont induire une diminution de la production de DC fonctionnelles. Par ailleurs, les DC de patients atteints de MM ont des capacités de phagocytose réduites (Ratta et al., 2002). Enfin, les DC dérivées de monocytes chez ces patients, présentent une baisse de l'expression des marqueurs d'activation et des aptitudes à présenter des antigènes aux LT diminuées (Wang et al., 2006b). Ainsi, la genèse d'une réponse T anti-tumorale efficace ne peut être induite.

La faible activité des DC peut également être liée à une augmentation des LTregs (Onishi et al., 2008), concordant ainsi avec certaines études qui trouvent une augmentation du nombre de LTreg chez les sujets atteints de MM (Beyer et al., 2006; Brimnes et al., 2010; Feyler et al., 2009). Des études contradictoires ont été publiées concernant fréquence des LTreg chez les patients présentant un MM, en montrant soit leur diminution soit leur augmentation. Le groupe du Dr. Prabhala a montré que les LTregs étaient considérablement réduits chez des patients atteints de MM (Prabhala et al., 2006). D'autres groupes ont démontré que les LTreg sont augmentés seulement chez les patients nouvellement diagnostiqués pour un MM mais pas chez les patients en rémission. Une autre étude portant

sur des patients présentant un MM montre que les groupes ayant un MM traité ou non présentaient une fréquence de LTreg augmentée par rapport aux témoins sains (Beyer et al., 2006).

Dans le MM, des anomalies concernant le compartiment lymphocytaire au sein de la moelle osseuse ont été décrites : le nombre des LT y était augmenté et à la différence du compartiment du sang périphérique, un ratio CD4/CD8 légèrement plus élevé a été observé. Dans la moelle osseuse de patients atteints de MM, le groupe de Dhodapkar a constaté une forte proportion des LT auxiliaires T_H17 qui produisent de l'IL-17 (Dhodapkar et al., 2008). L'IL-17 est une cytokine qui, en plus d'exercer un effet sur la croissance et la survie cellulaire du MM (Prabhala et al., 2010), est un inducteur clé de la pathologie osseuse du MM (Noonan et al., 2010). Fait intéressant, l'importance de la lyse osseuse dans cette maladie semble être principalement réalisé par l'IL-17 produite par les LT auxiliaires T_H17, indépendamment de la charge tumorale, ce qui souligne le rôle essentiel de l'interaction du système immunitaire avec le microenvironnement tumoral dans la pathologie du MM (Noonan et al., 2010).

IV.3 Traitements du myélome multiple

IV.3.1 Les traitements actuels

La médiane de survie des patients atteints de MM était de moins d'un an avant l'introduction des traitements utilisant des agents alkylants dont le melphalan dans les années 1960. Ces agents qui empêchent la séparation et la réplication de l'ADN, inhibant ainsi la multiplication cellulaire, ont permis d'améliorer la survie de ces patients (Kumar et al., 2008).

Dans les années 1980, Le traitement par la chimiothérapie à haute dose et la transplantation de cellules souches (ASCT : Autologous Stem Cell Transplantation) a été réalisé. Les essais randomisés ont démontré depuis un avantage de survie pour cette modalité de traitement par rapport à la chimiothérapie conventionnelle (McElwain and Powles, 1983; Attal et al., 1996; Child et al., 2003).

Ces thérapies « classiques » ont permis d'améliorer les médianes de survie jusqu'à 3 à 5 ans (Strobeck, 2007). Toutefois, au cours de la dernière décennie, des moyens importants ont été consacrés à l'amélioration du traitement du MM, et les nouvelles thérapies qui en résultent ont créé un renouveau dans la prise en charge de la maladie.

En 2003, **le bortézomib** (Velcade®, Millenium) est devenu le premier médicament approuvé par la FDA pour une utilisation chez les patients atteints de MM en rechute ou réfractaire. Le Bortézomib, administré par voie intraveineuse, inhibe le protéasome 26S. Son activité permet d'empêcher la dégradation de protéines anti-cancéreuses clés. Le bortézomib, en association avec le melphalan et la prednisone (stéroïde possédant des propriétés anti-tumorales), a récemment été étudié. Cette combinaison, également connu sous le nom de VMP, a donné un taux de réponse complète de 16% et un taux de réponse global de 89% (Mateos et al., 2006).

En mai 2006, **le thalidomide** (Thalomid®, Celgene), un médicament administré par voie orale et possédant des propriétés anti-angiogéniques et immunomodulatrices, est devenu le premier traitement approuvé par la FDA pour des patients atteint d'un MM nouvellement diagnostiqué. Un essai de phase III, a montré que les patients recevant l'association thalidomide et dexaméthasone (un anti-inflammatoire) présentaient un taux de réponse de 63%, contre 41% pour ceux ayant reçu la dexaméthasone seule (Rajkumar et al., 2006).

Pour augmenter l'activité du thalidomide et minimiser ses effets toxiques, Celgene a conçu une série de «médicaments immunomodulateurs» (les IMiDs). **Le lénalidomide** (Revlimid®, Celgene) est le plus avancé de ces médicaments et a été approuvé par la FDA en Juin 2006 pour le traitement de patients atteints de MM ayant échoué à au moins une thérapie au préalable. Le Lénalidomide en association avec le melphalan et la prednisone (RMP) est actuellement en cours d'évaluation comme une option de traitement pour les patients nouvellement diagnostiqués avec MM. Les résultats d'un essai de phase I/II ont montré que 100% des patients ayant reçu les deux doses les plus élevées de la RMP ont eu une réponse : une réponse complète dans 24% des cas et une réponse globale de 86% a été observée pour le groupe recevant la dose maximale tolérée (Palumbo and Anderson, 2011). Ces résultats indiquent que le lénalidomide pourrait être plus efficace que le bortezomib ou le thalidomide dans le traitement de patients atteints de MM.

Ces nouvelles drogues utilisées dans le traitement du MM en phase avancée ont un impact pronostique important : si le traitement de la rechute inclut l'un de ces agents, la médiane de survie globale est prolongée de 16 mois (Kumar et al., 2008). Néanmoins, la maladie peut développer une résistance face à ces traitements et la majorité des patients atteints de MM rechutent avec généralement une espérance de vie relativement courte (Durie, 2010).

Il est donc essentiel de continuer à découvrir et développer de nouvelles thérapies plus ciblées qui pourraient améliorer le traitement de ce type de cancer. Un certain nombre de nouvelles thérapies pour le MM ont vu le jour sur la base des progrès récents dans la compréhension de l'oncogenèse de la maladie. Actuellement plus de 250 études cliniques évaluent les combinaisons de thérapies expérimentales dans le traitement de patients atteints de MM.

La RIT α et le transfert adoptif de cellules T effectrices spécifiques du MM semblent être des stratégies ciblées, adaptées pour le traitement de cette maladie disséminée.

IV.3.2 Immunothérapies par transfert adoptif de lymphocytes T et myélome multiple

Une approche de thérapie cellulaire possible pour le traitement du MM est le transfert adoptif de lymphocytes T. La diversité des approches précliniques est importante, cependant, à ce jour, seules quelques-unes ont été testées et rapportées comme thérapie pour le MM.

- **ACT de lymphocytes T infiltrant la moelle osseuse (MIL) dont l'amplification est réalisée *ex vivo*.** Des données précliniques suggèrent que les MIL ont une plus grande capacité à reconnaître les antigènes de tumeur associés au MM par rapport aux lymphocytes T du sang périphérique (Noonan et al., 2005). Des efforts sont faits actuellement pour développer cette stratégie dans le cadre clinique (<http://clinicaltrials.gov/>, numéro NCT01045460). Dans une première étude utilisant le transfert adoptif de MIL pour traiter le MM, la stimulation et l'expansion de MIL autologues ont été réalisées avec des billes anti-CD3/CD28 pendant 7 jours. Ces MIL ont été injectés au patient 3 jours après un protocole de conditionnement standard utilisant de fortes doses de melphalan puis la transfusion d'ASCT. Les patients obtenant une réponse complète (6 sur 22, 27%) ou partielle (10 sur 22, 45%) ont montré, à 60 jours, un infiltrat lymphocytaire T CD8⁺ dans la moelle osseuse plus important par rapport aux patients ayant une maladie stable ou en progression. Chez les patients avec une maladie stable ou en progression, l'infiltrat immunitaire dans la moelle osseuse a été caractérisée par un grand nombre de cellules T effecteurs mémoire et quelques cellules T CD8⁺ centraux mémoire indiquant le développement d'une réponse immunitaire (Locke et al., 2013).

- **ACT de populations de lymphocytes T modifiées génétiquement par les CAR (Chimeric Antigen Receptor).**

Deux essais cliniques sont en cours utilisant l'ACT de LT modifiés par les CAR dans le MM. La première étude (<http://clinicaltrials.gov/>, numéro: NCT00881920) utilise un CAR de deuxième génération contre la chaîne légère κ . Les résultats de cet essai ne sont pas encore connus mais les LT portant ce CAR ont montré une cytotoxicité spécifique *in vitro* et *in vivo* vis à vis des lignées tumorales restreintes par la chaîne légère κ (Vera et al., 2006). Même si presque toutes les cellules de MM sécrètent une immunoglobuline monoclonale, l'inconvénient potentiel de cette approche réside dans le fait que très peu de ces cellules

expriment cette immunoglobuline à leur surface cellulaire (Ocqueteau et al., 1996). La deuxième étude est un essai de phase I/II débuté en juin 2013 en Chine, utilisant un CAR de deuxième génération anti-CD138 (<http://clinicaltrials.gov/>, numéro: NCT01886976). Une fois encore, ce type de CAR permet, *in vitro*, une cytotoxicité spécifique de différentes lignées de MM humaines (Garfall et al., 2014).

Deux LT modifiés par des CAR ciblant le MM sont en développement pré-clinique. Le premier est un CAR anti-CD38. Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée par les LB, les LT, les NK et les précurseurs de cellules myéloïdes (common myeloid progenitor), son ciblage peut donc potentiellement induire une forte myélotoxicité (Manz et al., 2002). Toutefois, l'utilisation d'un anticorps anti-CD38 (daratumab) dans un essai de phase I/II chez des patients atteints de MM a montré de bons résultats cliniques sans qu'une myélotoxicité ne soit décelée (Garfall et al., 2014), suggérant la pertinence de cibler cet antigène. La lyse spécifique de lignées de MM par des LT modifiés portant un CAR anti-CD38 a été démontrée *in vitro* (Mihara et al., 2012).

Le second est un CAR ciblant BCMA. BCMA (*B Cell Maturation Antigen*, CD269) est exprimé sur la plupart des cellules de MM (Novak et al., 2004). L'utilisation de ce CAR anti-BCMA de deuxième génération a permis l'élimination de cellules de MM humaines greffées en intradermique dans des souris immunodéprimées (Carpenter et al., 2013). Dans cette étude, l'expression de BCMA a été évaluée pour une large gamme de tissus sains humains par immunohistochimie. Mis à part dans les tissus lymphoïdes, aucune expression de cet antigène n'a été identifiée. Collectivement, ces résultats suggèrent que les LT modifiés par un CAR anti-BCMA ont un profil d'efficacité et de toxicité très favorables pour le traitement du MM.

IV.3.3 RIT α et myélome multiple

Les échecs dans le traitement du MM peuvent être attribués à la persistance des cellules tumorales, ainsi qu'au développement de résistances aux traitements utilisés. La RIT α peut permettre le ciblage de ces cellules tumorales résiduelles et disséminées.

Le phénotype des plasmocytes est souvent basé sur la présence de l'antigène CD138. À ce marqueur s'ajoute une expression élevée de CD27, CD38 et une faible expression de CD19 (Caraux et al., 2010). Ainsi le ciblage du CD138 dans le MM semble approprié. Jusqu'à présent, l'antigène de différenciation CD138 (syndecan-1 ou SDC-1) est utilisé comme unique marqueur de surface permettant la reconnaissance de plasmocytes matures sains ou malins, bien que l'existence de plasmocytes CD138⁻ ait été rapportée dans la littérature mais ceux-ci restent minoritaires (Caraux et al., 2010). Il s'agit d'un protéoglycane transmembranaire de type 1, dont la majorité du poids moléculaire provient des molécules de sulfates d'héparane qui y sont liées. Cette molécule joue un rôle dans l'adhésion cellulaire en provoquant une agrégation homotypique des cellules (Bernfield et al., 1999).

Notre équipe a pu valider la RIT α du myélome, *in vitro*, par l'utilisation d'un anticorps anti-CD138 (B-B4) couplé au bismuth-213 sur des lignées de myélome multiple humaines (Couturier et al., 1999). De plus, autre étude clinique a montré par dosimétrie, la faisabilité de la RIT par l'utilisation de cet anticorps. En effet, chez des patients atteints de MM, suite à l'injection du B-B4 couplé à l'iode-131, les images en immunoscintigraphie ont montré une haute absorption à la moelle osseuse. Ceci reflétant le ciblage des cellules MM par l'anticorps monoclonal radiomarqué (Rousseau et al., 2012). Enfin, une étude plus récente a évalué la toxicité et l'efficacité d'un anticorps de rat anti-CD138 murin couplé au bismuth-213 dans un MM murin, utilisant la lignée cellulaire 5T33, injectés dans des souris syngéniques C57BL/KaLwRij. Par l'injection d'une activité d'anticorps radiomarqué de 3,7 MBq, une légère et réversible toxicité hématologique a été observée, associée à une survie à long terme (Chérel et al., 2013).

L'ensemble de ces résultats supporte la pertinence du développement clinique de la RIT α chez des patients atteints de MM.

IV.3.4 Modèle de myélome multiple murin syngénique et immunocompétent: le modèle 5T33MM

Le modèle 5T a été développée dans les années 1970 par l'injection de souris avec des cellules de MM murines syngéniques obtenues à partir de souris âgées C57BL/KaLwRij développant spontanément une pathologie comparable au MM humain (J Radl, 1978). Les modèles les plus utilisés sont la 5T2MM et la 5T33MM. Ces MM murins sont caractérisés par la localisation sélective des cellules de MM dans la moelle osseuse, la production d'une immunoglobuline monoclonale IgG2b, κ dans le sérum et une augmentation de l'angiogenèse dans la moelle osseuse. La 5T2MM présente une croissance modérée et un développement de lésions ostéolytiques reproduisant la maladie humaine, tandis que la 5T33MM affiche un comportement plus agressif avec une croissance rapide (Menu et al., 2004).

Les études faites sur ces modèles, essentiellement par le groupe du Dr. Vanderkerken, ont fourni de précieuses informations sur la biologie du MM. En particulier sur les mécanismes responsables de cette maladie osseuse, sur la néo-angiogénèse associée au MM, et sur le tropisme de ces cellules à la moelle osseuse (Menu et al., 2004). En effet, grâce à ces modèles, il a été possible de disséquer les étapes conduisant à la prise de la maladie: la chimio-attraction, l'adhérence, la migration trans-endothéliale et l'invasion (Menu et al., 2004). En outre, ces modèles permettent l'évaluation de l'impact de différentes stratégies anti-cancéreuses sur les cellules MM à l'intérieur de leur microenvironnement approprié.

Dans le modèle 5T33, l'injection intraveineuse d'un million de 5T33 aboutit au développement du myélome multiple et à la mort des souris en 45 à 50 jours post inoculation. Des lésions de type ostéolytiques ont été rapportées de façon similaire à l'évolution du myélome multiple chez l'homme (Garrett et al., 1997). Lors de l'apparition de la paralysie des membres postérieurs, les cellules 5T33 sont détectables dans la moelle osseuse, la rate, le foie et dans les nœuds lymphatiques. La sévérité de la paralysie postérieure est directement liée à la sévérité de l'infiltration de la moelle osseuse par les cellules myélomateuses (Alici et al., 2004). L'avantage principal de ce modèle, outre sa concordance phénotypique et évolutive avec le myélome humain, est qu'il est syngénique et immunocompétent, donc parfaitement adapté à l'étude de la réaction immunitaire anti-tumorale suite aux différentes stratégies anti-tumorales testées.

PROJET DE RECHERCHE

Objectifs du travail de thèse

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché, dans un premier temps, à documenter **l'impact des rayonnements α sur le système immunitaire**, domaine dans lequel il existe pour l'instant très peu de données. L'utilisation des rayonnements α en thérapie anti-cancéreuse est très récente. De nombreuses études ont démontré le potentiel prometteur de l'utilisation de radionucléides émetteurs de particules α dans le traitement de certains types de tumeurs (Baidoo et al., 2013). Les émetteurs α représentent un outil idéal pour la destruction de cellules tumorales isolées ou de faible densité numérique. Et cela, grâce à leurs caractéristiques physiques spécifiques (TEL élevé, faible parcours dans les tissus) et à leur efficacité qui ne dépend que faiblement du débit de dose, du degré d'oxygénation des tissus ou de l'état du cycle cellulaire. Peu d'études ont investigué les conséquences biologiques directes des particules α sur les cellules tumorales, et encore plus rares sont celles ayant analysées l'effet des rayonnements α sur l'activation du système immunitaire.

Toutefois, une nouvelle approche d'administration des particules α a permis de mettre en évidence une réponse immunitaire anti-tumorale. Cette approche développée pour le traitement des tumeurs solides est la RT par diffusion d'émetteurs α (DaRT). L'idée de cette méthode est d'insérer la source radioactive (le radium-224) directement dans la tumeur ce qui libère continuellement des atomes émetteurs de particules α , de courte durée de vie.

Suite à ce traitement à base de rayonnements α , les résultats montrent 1) une inhibition de la croissance de la tumeur primaire de sein ou de colon chez des souris. 2) Une diminution des métastases pulmonaires, 3) une prolongation de la survie des animaux et enfin 4) la destruction de la tumeur par les radiations α qui stimule une immunité anti-tumorale, effet pouvant être renforcé lorsqu'elles sont combinées avec un immunostimulant, le CpG (Keisari et al., 2014).

Par conséquent, la biologie du tissu irradié par des particules α et son interaction avec son environnement pourraient jouer un rôle tout aussi important que la RT externe. Les effets « bystander » impliquant l'activation des voies de signalisation et le système immunitaire doivent être étudiés avec plus de précision (Elgqvist et al., 2014).

L'objectif premier de cette thèse fut donc d'évaluer l'immunogénicité tumorale et l'activation du système immunitaire suite à l'irradiation par le bismuth-213 d'un adénocarcinome murin (MC38).

Dans la continuité de cette étude, nous nous sommes intéressés à **l'association de la RIT α et de l'immunothérapie.**

Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique, les associations entre différents types de traitements anti-tumoraux sont en effet largement investiguées. Certaines de ces associations reposent sur l'utilisation de rayonnements ionisants. Ainsi des études montrent que la RT pouvait réduire la croissance d'une tumeur implantée à distance du champ d'irradiation lorsqu'elle est combinée à l'injection d'un facteur de croissance des DC. Cette association permet le développement d'une réponse lymphocytaire T spécifique de la tumeur (Demaria et al., 2004). Ces résultats, obtenus chez l'animal suite à une irradiation externe à l'aide de rayonnements γ , soulignent l'intérêt de développer des approches thérapeutiques associant rayonnements ionisants et les voies de stimulation du système immunitaire.

A ce titre, l'immunothérapie a été largement étudiée afin de potentialiser le système immunitaire de patients. Cette potentialisation peut se faire grâce à l'immunothérapie passive qui est une forme de thérapie de transfusion consistant en l'injection d'effecteurs spécifiques de la tumeur générés *in vitro* comme les LT. Les différentes approches d'immunothérapies permettent d'observer fréquemment des réponses immunologiques mais les réponses cliniques sont beaucoup plus rares.

Ainsi, nous avons évalué le potentiel thérapeutique de l'association de la RIT α au bismuth-213, avec l'immunothérapie passive, par transfert adoptif (ACT) de LT spécifiques de tumeur dans un modèle de myélome multiple, maladie incurable et diffuse, dont le groupe a déjà démontré qu'il était un modèle pertinent pour le traitement par la RIT α .

L'objectif de cette deuxième partie de thèse était d'évaluer une éventuelle complémentarité des deux stratégies, aussi bien sur la potentialisation d'une destruction tumorale, que sur la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

RESULTATS

I- Partie I : Rayonnements α et système immunitaire

Dans cette première partie de thèse, nous avons porté notre attention sur l'immunogénicité tumorale après irradiation par les particules α . Nous avons déjà mentionné que les rayonnements ionisants sont capables de modifier les cellules tumorales afin que celles-ci puissent être prises en charge par le système immunitaire pour le développement d'une immunité anti-tumorale spécifique dépendante des LT et permettant un bénéfice thérapeutique (Chakravarty et al., 1999; Reits et al., 2006; Demaria and Formenti, 2012). Cet effet peut s'expliquer par l'induction d'une mort cellulaire immunogène de la cellule tumorale et le relargage de divers DAMP (Kroemer and Zitvogel, 2012; Kroemer et al., 2013). Ces deux événements vont permettre l'activation et la prise en charge de la tumeur par les DC induisant ainsi une immunité anti-tumorale.

Nous avons donc étudié les effets du bismuth-213 sur l'immunogénicité d'un adénocarcinome colique murin (MC38) *in vitro* et *in vivo* dans la souris immunocompétente C57BL6. Nos travaux démontrent que l'irradiation α de cellules tumorales par le bismuth-213 permet l'induction d'une immunité anti-tumorale durable et spécifique. Cette immunité anti-tumorale est dépendante des LT montrant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Les particules α , en plus de pouvoir induire une destruction tumorale, vont permettre le déclenchement d'une mort immunogène des cellules tumorales. Celles-ci vont sécréter des DAMP permettant, entre autre, l'activation des DC pour la mise en place de l'immunité anti-tumorale dépendante des LT.

Ces résultats sont à mettre en relation avec des études s'intéressant aux effets sur l'immunité anti-tumorale d'autres types de radiation comme les rayons γ et les particules β^- . En effet, il a été montré que l'irradiation par RT externe (Chakraborty et al., 2004; Reits et al., 2006; Garnett et al., 2004) ou par les émetteurs β^- (Chakraborty et al., 2008b; a) permet la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace lorsqu'elle est combinée à des stratégies vaccinales ou à l'ACT de LT spécifiques de tumeur. Nos résultats démontrent que l'irradiation des tumeurs par les particules α peut conduire à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Ainsi, cette étude explicite de nouvelles propriétés sur le mécanisme d'action des particules α et supporte l'intérêt de l'utilisation et du développement de ces rayonnements en thérapie anti-cancéreuse. Les perspectives seraient

donc de tester l'efficacité de cette thérapie par l'irradiation de particules α pour le traitement d'une maladie préalablement établie en complément d'une stratégie d'immunothérapie dans un modèle tumoral immunocompétent.

Article I : Anti-tumour immunity induced after alpha irradiation

Jean-Baptiste Gorin, Jérémie Ménager, Sébastien Gouard, Catherine Maurel, Yannick Guilloux, Alain Faivre-Chauvet, Alfred Morgenstern, Frank Bruchertseifer, Michel Chérel, François Davodeau et Joëlle Gaschet

Neoplasia (2014) 16, 319–328

Antitumor Immunity Induced after α Irradiation^{1,2,3}

Jean-Baptiste Gorin^{*,†,‡,§}, Jérémie Ménager^{*,†,‡},
Sébastien Gouard^{*,†,‡}, Catherine Maurel^{*,†,‡},
Yannick Guilloux^{*,†,‡}, Alain Faivre-Chauvet^{*,†,‡,¶},
Alfred Morgenstern[#], Frank Bruchertseifer[†],
Michel Chérel^{*,†,‡,§}, François Davodeau^{*,†,‡},
and Joëlle Gaschet^{*,†,‡}

*CRCNA–UMR 892 INSERM, Nantes, France; †CNRS, Nantes, France; ‡University of Nantes, Nantes, France; §Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France; ¶Nuclear Medicine Department, CHU Nantes, Nantes, France; #Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany

Abstract

Radioimmunotherapy (RIT) is a therapeutic modality that allows delivering of ionizing radiation directly to targeted cancer cells. Conventional RIT uses β -emitting radioisotopes, but recently, a growing interest has emerged for the clinical development of α particles. α emitters are ideal for killing isolated or small clusters of tumor cells, thanks to their specific characteristics (high linear energy transfer and short path in the tissue), and their effect is less dependent on dose rate, tissue oxygenation, or cell cycle status than γ and X rays. Several studies have been performed to describe α emitter radiobiology and cell death mechanisms induced after α irradiation. But so far, no investigation has been undertaken to analyze the impact of α particles on the immune system, when several studies have shown that external irradiation, using γ and X rays, can foster an antitumor immune response. Therefore, we decided to evaluate the immunogenicity of murine adenocarcinoma MC-38 after bismuth-213 (²¹³Bi) irradiation using a vaccination approach. *In vivo* studies performed in immunocompetent C57Bl/6 mice induced a protective antitumor response that is mediated by tumor-specific T cells. The molecular mechanisms potentially involved in the activation of adaptive immunity were also investigated by *in vitro* studies. We observed that ²¹³Bi-treated MC-38 cells release “danger signals” and activate dendritic cells. Our results demonstrate that α irradiation can stimulate adaptive immunity, elicits an efficient antitumor protection, and therefore is an immunogenic cell death inducer, which provides an attractive complement to its direct cytolytic effect on tumor cells.

Neoplasia (2014) 16, 319–328

Abbreviations: BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; CTL, cytotoxic T lymphocyte; DAMP, danger-associated molecular pattern; RIT, radioimmunotherapy
Address all correspondence to: Joëlle Gaschet, PhD, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, CRCNA–UMR 892 INSERM, 6299 CNRS, 8 quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes cedex 1, France. E-mail: Joelle.Gaschet@univ-nantes.fr

¹ Conflict of interest statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

² Authors' contributions: Conception and design—J.-B.G., F.D., and J.G. Development of methodology—J.-B.G. and J.G. Acquisition of data—J.-B.G., J.M., S.G., C.M., A.F.-C., A.M., and F.B. Analysis and interpretation of data—J.-B.G., J.M., S.G., M.C., F.D., and J.G. Writing, review, and/or revision of the manuscript—J.-B.G., J.M., S.G., Y.G., M.C., F.D., and J.G. Study supervision—F.D. and J.G.

³ Grant support: This work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer and from the Pays de la Loire Council “Nucléaire pour la Santé” (NucSan). J.-B.G. and J.M. are supported by grants from the French Ministry of Research and Higher Education. A.M. and F.B. are supported by the European Commission.

Received 22 January 2014; Revised 25 March 2014; Accepted 26 March 2014

© 2014 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved 1476-5586/14
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2014.04.002>

Introduction

Radiotherapy is one of the most common treatments of cancer and has been efficiently used for decades. Ionizing radiation is used to eradicate cancer cells through direct cytotoxicity potentially associated with a bystander and other nontargeted effects [1–3]. Numerous radiotherapy modalities have been developed, among which radioimmunotherapy (RIT) is one of the most promising for the treatment of disseminated cancers. RIT is an internal form of radiotherapy using radiolabeled vectors to target antigens expressed on tumor cells [4]. This therapeutic approach has significantly progressed for the past 20 years with the development of new vectors, improvement of labeling efficiencies, and availability of new radionuclides [5]. Among those, α particles are very attractive for clinical development. Indeed, the physical and biologic characteristics of those radioisotopes appear to be especially suited for targeting isolated cancer cells, small clusters of tumor cells, or micrometastasis. α particles exhibit a high linear energy transfer (~ 100 keV/ μm) with an energy comprised in between 5 and 9 MeV and a short path of 50 to 90 μm in the tissues. Like other high linear energy transfer particles, α emitters induce more DNA double-strand breaks than γ or X rays and provoke a cell cycle arrest in the G_2 phase that is more marked than with γ rays [6,7]. It has been shown that irradiation of the nucleus with a few α particles is sufficient to result in cell death [8] and only a few dozens are needed when the membrane is targeted, whereas several thousands of β emitters are required for the same effect [9]. Furthermore, radiobiologic effects associated to α radionuclides are advantageously less sensitive to dose rate, hypoxia, and cell cycle distribution than β particles or γ rays [10]. Other aspects of α emitter radiobiology have been less investigated. For instance, few studies have analyzed cell death mechanisms, and those are sometimes conflicting. Some groups showed that cells undergo apoptosis following exposure to α particles [11,12] when others observed cell death independent from apoptosis [13,14].

However, it has become increasingly clear that direct cytotoxicity is not the only factor accounting for tumor destruction by ionizing radiation *in vivo*. Indirect effects such as radiation-induced biologic bystander effects significantly contribute to the effectiveness of irradiation [15], and numerous studies have demonstrated that external treatment with γ and X rays can have a beneficial effect at distance from the field of irradiation. This phenomenon is called *abscopal effect* and has been shown to be mediated by the immune system [16,17]. Accumulating evidence also shows that the immune response may play an important role in patient response to radiation [18]. Several mechanisms have been proposed to explain the implementation of such an antitumor response after radiotherapy. First, irradiation induces local inflammation of tumor sites and microenvironment that favors the recruitment of immune cells, in particular dendritic cells (DCs). Additionally, DCs are capable of cross-presenting antigens from the tumor cells killed by irradiation to stimulate a specific T cell response. Finally, the stress induced by ionizing radiation provides the immune system with signals, called “danger signals” or danger-associated molecular patterns (DAMPs), needed for activation of antigen-presenting cells (APCs) such as DCs [19]. These results, obtained in animals after external irradiation, underline the importance of studying the impact of ionizing radiation on immune cells and their potential in stimulating an immune response that could complement the direct effect of irradiation and establish a long-term antitumor response. Nevertheless, the influence of α radiation on immunity has not been investigated so far.

Therefore, our study aims to investigate the potential of bismuth-213 (^{213}Bi), an α emitter generated from an actinium-225/ ^{213}Bi generator, in stimulating immune cells. We used MC-38 tumor cells, a murine adenocarcinoma, which has been reported to be weakly immunogenic and a good model for immunotherapy studies [20,21]. To study the impact of the radioelement on the tumor cells only, without irradiating the microenvironment and without any vectorization that could also act on the tumor cells, we chose a vaccination approach in immunocompetent C57Bl/6 mice. Additional *in vitro* studies were conducted to investigate the molecular mechanisms involved after MC-38 irradiation on the activation of adaptative immunity, in particular DCs and T cells, and the establishment of long-term protection toward tumor cells. Here, we report for the first time that tumor cells irradiated with an α particle emitter lead to the development of a long-lasting antitumor immune response mediated by specific T cells *in vivo*. We also demonstrate *in vitro* that irradiation of MC-38 cells with ^{213}Bi induces the release of DAMPs [i.e., heat shock protein 70 (Hsp70) and homeostatic group box protein 1 (HMGB1)] and triggers the activation of DCs.

Materials and Methods

Cell Culture

MC-38 murine colon carcinoma (established by Rosenberg's laboratory, National Cancer Institute, Bethesda, MD [20] and kindly provided by Dr Pèlerin, CRLC Val d'Aurelle-Paul Lamarque, Montpellier, France) and B16-F10 murine melanoma (ATCC[®]: CRL-6475, LGC Standards, Molsheim, France) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, France), 2 mM glutamine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 100 U/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Gibco) at 37°C and 5% CO_2 .

^{213}Bi Irradiation

Cyclohexyl diethylene triamine penta-acetic acid (Macrocyclics, Dallas, Texas) was conjugated to BSA as previously described [22] and controlled by indium labeling. For labeling with ^{213}Bi , conjugated BSA was incubated with ^{213}Bi eluted from an actinium-225/ ^{213}Bi generator (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany) for 10 minutes at 37°C in 0.6 M sodium acetate (pH 5.3) and 0.01% ascorbic acid. The resulting ^{213}Bi -BSA conjugate was purified from unbound ^{213}Bi by size exclusion chromatography using a PD-10 column (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Radiochemical purity was >95%, as determined by Instant Thin Layer Chromatography - Silica Gel using 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). A solution containing ^{213}Bi -BSA diluted in culture media was then added to the cells at a final activity of 2.22 MBq/ml ^{213}Bi for vaccination and 0.74 MBq/ml for *in vitro* studies. ^{213}Bi -BSA was removed after 6 hours, by centrifugation and washing the cells with fresh medium, when used for vaccination.

Annexin V and 4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Staining

Staining was performed according to manufacturer's instructions (Annexin V-APC Apoptosis detection kit, BD, Le Pont de Claix, France). Briefly, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended at 1×10^6 cells per milliliter in $1 \times$ Annexin binding buffer [10 mM Hepes/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl_2]. A population of 10^5 cells was then stained with 5 μl of Annexin V-APC and/or 1 μl of DAPI for 2 minutes at room temperature in the dark. At least 10,000 events were analyzed using BD FACSCanto II flow cytometer and FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR).

Caspase-3 Assay

Caspase-3 assay was performed using the PE Active Caspase-3 Apoptosis kit (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were washed once in PBS and resuspended in BD Cytotax/Cytoperm on ice for 20 minutes. After two washes in BD Perm/Wash, cells were stained with the PE antiactive caspase-3 antibody for 30 minutes at room temperature. At least 50,000 events were analyzed using BD FACSCalibur flow cytometer and FlowJo software.

Mice and Vaccination

Wild-type C57Bl/6 (H-2^b) mice aged between 11 and 17 weeks and 14-week-old nude mice (RjOrl:NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were immunized with 3×10^6 irradiated MC-38 injected subcutaneously in the left flank. The injection was performed after 6 hours of incubation with the radioconjugate to allow for complete radioactive decay of ²¹³Bi before injection, thus limiting irradiation of the mice. Seven days later, the mice were challenged with 2×10^5 live MC-38 s.c. in the right flank. Tumor progression was then assessed regularly using calipers, and mice were killed when tumor volume reached 2500 mm³ or when signs of tumor necrosis were observed. Experiments performed in this study were approved by the local veterinary committee (License No. CEEA.2013.2).

T Cell Preparation

Mice were killed 5 days after their last injection, and axillary, inguinal, popliteal, and mesenteric lymph nodes were recovered. T cells were then purified using Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) and stimulated *in vitro* with 5 μ g/ml anti-CD3 ϵ (clone 145-2C11; eBioscience) and 2 μ g/ml anti-CD28 (clone 37.51; eBioscience). T cells were then cultured until they went back to a resting state (no proliferation).

Cytotoxicity Assay

Cytotoxic activity was tested using a standard ⁵¹Cr release assay. Briefly, MC-38 or B16-F10 autologous tumor cell lines were used as a target and labeled with 2.77 MBq of Na²⁵¹CrO₄ for 1 hour at 37°C, washed five times, and then plated onto 96-well U-bottom plates. Effector-to-target ratios (E:T ratios) were 20:1, 10:1, 5:1, and 2.5:1. After 16 hours of incubation at 37°C, 25 μ l of supernatant from each well was removed, mixed with 100 μ l of Betaplate Scint (PerkinElmer, Waltham, MA), and read using 1450 MicroBeta Plus counter (Wallac, Gaithersburg, MD). Each test was performed in triplicate. Results were expressed as a percentage of lysis according to the following formula: (experimental release - spontaneous release)/(maximal release - spontaneous release) \times 100, where experimental release represents mean cpm release from target cells in the presence of effector cells, spontaneous release represents that from targets incubated without effectors, and maximum release represents that from target cells incubated with 1% triton.

DAMP Detection in Culture Media

DAMP release in cell culture was assessed using ELISA directed against Hsp70 (R&D Systems, Abingdon, UK) and HMGB1 (IBL International, Hamburg, Germany) following the manufacturers' protocols.

Bone Marrow-Derived Dendritic Cell Production

Bone marrow cells were flushed with RPMI medium from C57Bl/6 thighbones and filtered through a 70- μ m cell strainer. Adherent cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10%

fetal calf serum (PAA Laboratories), 2 mM glutamine (Gibco), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Gibco), 100 μ M 2-mercaptoethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), minimum essential medium nonessential amino acids (Gibco), and murine GM-CSF (purified from the supernatant of a transgenic GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)-producing cell line [23]) to induce bone marrow-derived dendritic cell (BMDC) differentiation. On day 3, fresh medium was added; on days 6 and 8, half of the medium was removed and replaced by fresh medium; and BMDCs were used on day 10.

Coculture Assays

For BMDC coculture assay with tumor cells, 1×10^6 murine BMDCs were plated onto six-well dishes with 5×10^6 MC-38 and incubated 24 hours at 37°C. Maturation was then analyzed by immunofluorescence phenotyping. For BMDC maturation with tumor cell supernatant, 1 ml of tumor cell supernatant was added to 1×10^6 BMDCs and plated onto 12-well dishes. BMDC phenotype was analyzed by immunofluorescence after 24 hours of incubation.

Immunofluorescence Analysis

Cells were washed once in PBS-BSA (0.1%) and then stained for 1 hour at 4°C with primary antibody. When secondary antibody was needed, cells were washed three times in PBS-BSA (0.1%) before incubation with secondary antibody. After staining, cells were washed twice in PBS-BSA (0.1%) and once in PBS before acquisition in flow cytometer. The following antibodies and their respective control isotypes were used in this study: Alexa 647 anti-mouse CD11c (N418; eBioscience), fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse CD11b (M1/70; BD), FITC anti-mouse CD34 (RAM34; BD), FITC anti-mouse CD80 (16-10A1; BD), APC anti-mouse CD86 (GL1; BD), and APC anti-mouse CD40 (1C10; eBioscience). Immunofluorescence analyses were performed using BD FACSCalibur flow cytometer and analyzed with FlowJo software.

Data Analysis

Data are expressed as the means \pm SD. Survival data were analyzed using the log-rank test and Kaplan-Meier method. Comparisons of continuous variables were done using nonparametric Mann-Whitney tests or two-way analysis of variance (GraphPad Prism version 5.0, La Jolla, CA). *P* values of less than or equal to .05 are considered significant.

Results

Vaccination of Mice with Irradiated Cells Induces a Protective Antitumor Response *In Vivo*

To determine whether α -irradiated cells could foster an antitumor response *in vivo*, we conducted vaccination studies on syngeneic C57Bl/6 mice. Mice were vaccinated 7 days before MC-38 engraftment by s.c. injection of 3×10^6 ²¹³Bi-treated MC-38 (without any adjuvant), in the left flank. Irradiation was performed using ²¹³Bi-BSA conjugates; however, BSA does not target tumor cells. This approach was chosen to avoid any interaction that specific vectors such as antibodies could have on tumor cells as well as with the immune response. This way, we only studied the effects of the radioelement and not the effects of the vector. Cells were incubated for 6 hours with the radioconjugate and then washed with fresh medium before injection. This allowed for complete radioactive decay and elimination of ²¹³Bi, thus limiting irradiation of the mice. At the time of injection, viability of ²¹³Bi-treated MC-38 was controlled

by Annexin V/DAPI double staining and detection of caspase-3 activation. Both analyses showed that irradiation had no impact yet on death mechanisms because percentages of the live cells were identical in ^{213}Bi -treated MC-38 and nonirradiated MC-38. However, irradiation induced >95% cell killing on the long term, as determined by clonogenic assays (data not shown). On day 0, mice were engrafted with 2×10^5 live MC-38 injected s.c. in the opposite flank to make sure that any response observed would have to be systemic and not just due to local control. Among nonvaccinated controls, 21 of the 25 mice rapidly developed a tumor and reached end-point value within 40 days (Figure 1A). However, only 3 of 25 vaccinated mice developed a tumor (Figure 1B). Median survival was 37 days for controls and was not reached for the vaccinated group after more than 100 days of monitoring. Overall survival at 73 days after live tumor cell engraftment was 88% for the vaccinated mice compared to 16% in

control group (Figure 1C). This demonstrates that ^{213}Bi -irradiated tumor cells are highly immunogenic and can elicit a strong antitumor response *in vivo*.

To follow the induced immune response, 17 of the 22 mice that rejected MC-38 on live tumor cell injection were challenged a second time on day 73. Remarkably, 100% of the animals showed full protection by rejecting that second engraftment (Figure 1D). This result demonstrates that the antitumor response was long lasting, hence most likely driven by the adaptive immunity.

An additional group of 10 mice was included in the study, receiving the vaccination but not the first challenge with live MC-38 cells on day 0. Vaccinated mice did not grow any tumor, showing that irradiated cells could not participate in tumor growth (Figure 2A). Those mice were then challenged 84 days after vaccination. Interestingly, among that group, 90% of the animals rejected the live tumor cell graft (Figure 2B). Those data confirm that α -irradiated

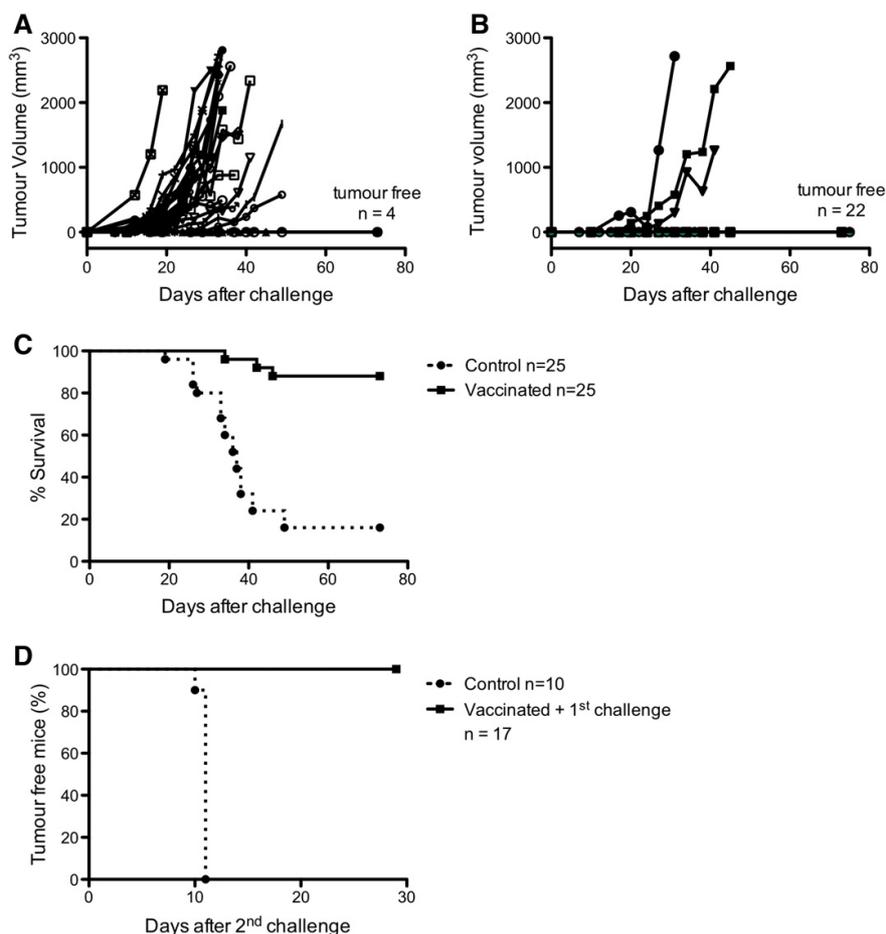


Figure 1. Tumor cells irradiated with ^{213}Bi give rise to antitumor protection *in vivo*. (A and B) Tumor volume progression for control (A) and immunized mice (B) after MC-38 engraftment. Volume was calculated as $(\text{length} \times \text{width} \times \text{height} \times \pi)/6$. (C) Kaplan-Meier analysis of mice immunized with ^{213}Bi -treated cells (square) versus control C57Bl/6 (circles) after subcutaneous challenge with 2×10^5 live MC-38. Median survival was 37 days for controls and was not reached for the immunized group. P value determined by the log-rank test was extremely significant ($P < .0001$). (D) Tumor-free fraction of mice after a second challenge with live MC38. $P < .0001$.

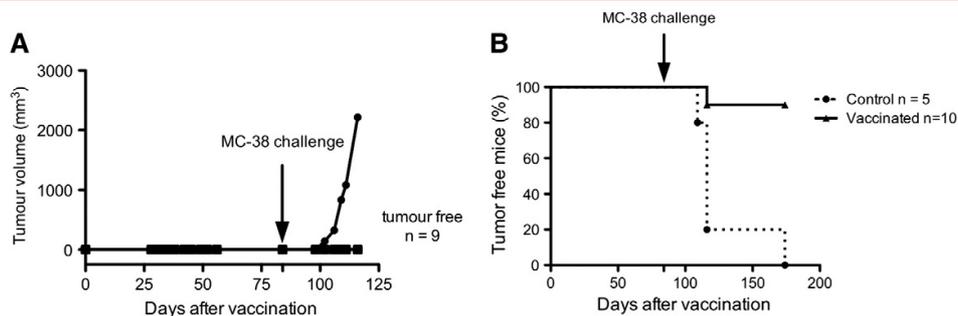


Figure 2. Tumor cells irradiated with ^{213}Bi do not give rise to tumors and allow for long-term antitumor protection. (A and B) Tumor volume progression for vaccinated mice (A), which did not receive live MC-38 engraftment before day 84. Kaplan-Meier analysis of mice immunized with ^{213}Bi -treated cells (triangles) versus control C57Bl/6 (circles) after subcutaneous challenge with 2×10^5 live MC-38. *P* value determined by the log-rank test was highly significant ($P < .0001$).

tumor cells are highly immunogenic and that a long-lasting immune response has been elicited without any boost or adjuvant.

The Antitumor Response Induced In Vivo Is T Cell Mediated

To investigate the cell subsets involved in the antitumor response induced through α -irradiated MC-38, we performed vaccination studies on immunodeficient athymic mice (*nude*) ($n = 5$), which lack T cells. We observed no protection against tumor challenge after vaccination. Kinetics of tumor development appeared very similar in all the mice (Figure 3, A and B), and median survival was 13 days for both the control and vaccinated groups (Figure 3C), indicating that T cells are essential for the antitumor effect obtained through vaccination.

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) are known as potent effectors in anticancer treatments; therefore, we investigated the presence of CTL specifically targeted toward MC-38 following immunization. T cells were purified from the mice lymph nodes and tested through a conventional chromium release assay (Figure 4). T cells from naïve mice exhibited a weak cytotoxic efficiency toward MC-38 cells, varying from 6.7% to 11.7% independently from the E:T ratio (Figure 4A). Similarly, cytotoxic efficiency toward another syngeneic, but nonrelated, tumor cell line (B16-F10 melanoma) was weak and did not exceed $3.4 \pm 3.8\%$ at any E:T ratio tested (Figure 4A). After vaccination with ^{213}Bi -irradiated MC-38 and subsequent tumor challenge a week later, a significant increase of cytotoxic efficiency toward MC-38 was observed, ranging from $40.0 \pm 9.7\%$ for an E:T ratio of 2.5:1 to $74.0 \pm$

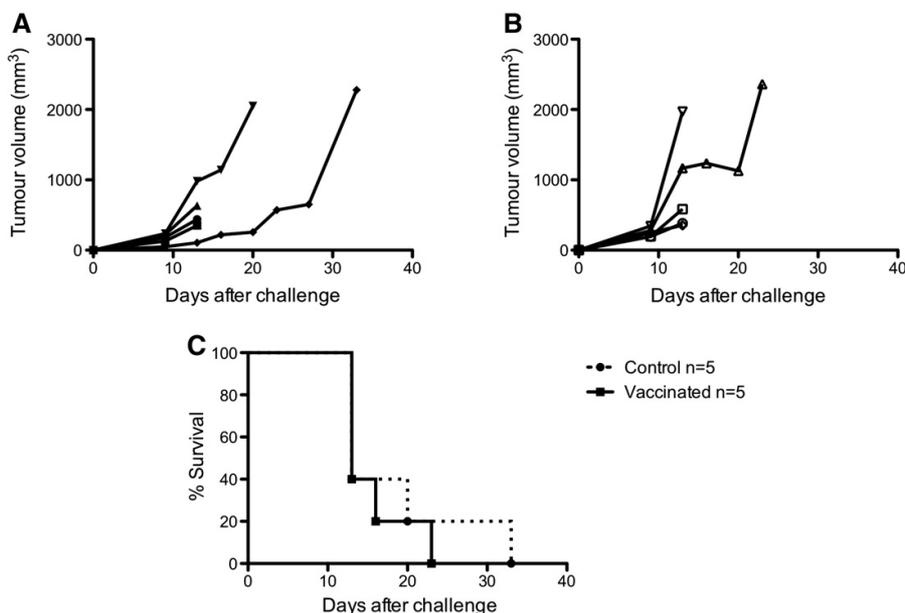


Figure 3. Immunization with α -irradiated MC38 fails in nude mice. (A and B) Tumor volume progression for control ($n = 5$) (A) and immunized nude mice ($n = 5$) (B) after MC38 engraftment. (C) Kaplan-Meier analysis of mice immunized with ^{213}Bi -treated cells (square) versus control nude mice (circles) after subcutaneous challenge with 2×10^5 live MC-38. Median survival was 13 days for both the control and immunized groups. $P = .5716$.

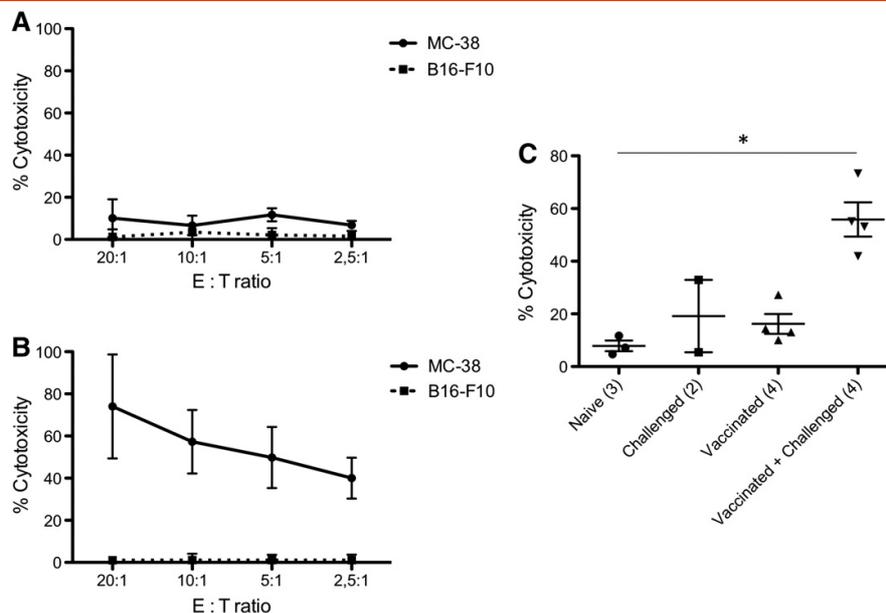


Figure 4. Antitumor response is dependent on cytotoxic T cells. (A and B) ^{51}Cr release assay against MC-38 or the irrelevant cell line B16-F10 was performed on T cells purified from naive mice (A) or mice that had been immunized with ^{213}Bi -treated MC-38 and subsequently challenged with live MC-38 (B). Assays were performed at different E:T ratios; data points represent means \pm SD of triplicate measurements for three naive mice (A) and four vaccinated + challenged mice (B). (C) Scatterplot of mean percentage of T cell cytotoxicity against MC-38 at the E:T ratio of 10:1 for different groups of mice. In parentheses, number of mice in each group. $P < .05$ between naive mice and mice that have been immunized and challenged. P value was determined by nonparametric Mann-Whitney test. Mean cytotoxicity was 7.87% for naive mice, 19.15% for challenged mice, 16.2% for vaccinated mice, and 55.85% for vaccinated + challenged mice.

24.7% for an E:T ratio of 20:1 (Figure 4B), indicating that an antitumor T cell response had been raised. On the contrary, cytotoxic efficiency toward B16-F10 melanoma did not increase and was only $1.0 \pm 1.8\%$ at the highest E:T ratio, indicating that the T cell response was specific to MC-38. Comparison of naive, challenged, vaccinated, and vaccinated + challenged mice showed that CTL activity was only significantly increased in vaccinated + challenged mice at the E:T ratio of 10:1 with 55.9% cytotoxicity compared to 7.9% in naive animals (Figure 4C). Together with our data on the vaccination of *nude* mice, these results suggest that CTL is the main effector of the antitumor response raised after vaccination with α -irradiated tumor cells.

Tumor Cells Treated with ^{213}Bi Activate DCs In Vitro

To further explore the mechanisms supporting the antitumor immune response to α particles, we analyzed the DC phenotype after *in vitro* irradiation of MC-38 cells. DCs express costimulatory molecules such as CD40, CD80, and CD86 on their cell surface, which are needed for activation of naive T cells. Activation of immature DCs results in increased expression of those costimulatory molecules. Immature BMDCs derived from syngeneic C57Bl/6 mice have been incubated for 48 hours with conditioned media from control or ^{213}Bi -treated MC-38. The media of irradiated tumor cells elicited a significant increase of 32% in CD40 expression [ratio of fluorescence intensity (RFI) increased from 4.5 to 5.9] and 44.8% in CD86 expression (22.7 to 32.6) and a slight increase, however not significant, of 4.4% in CD80 expression (3.3 to 3.4) on BMDCs (Figure 5, A–C). Besides, we observed that BMDCs aggregated in

clumps (Figure 5, D and E) when incubated in culture inserts with irradiated MC-38, which is a phenotypic characteristic of DC activation [24]. No activation was observed when immature BMDCs were exposed to irradiated culture medium only (data not shown). These results suggest that ^{213}Bi induces the release of soluble agents from MC-38 capable of activating DCs *in vitro*.

^{213}Bi Irradiation Causes Release of DAMPs from MC-38 Cells

Then, we tested the conditioned media of ^{213}Bi -treated MC-38 for the presence of DAMPs. DAMPs such as Hsp70 or HMGB1 are self-molecules normally expressed intracellularly, which can be released in the extracellular space upon cell stress or damage as a danger signal to the immune system [25,26]. Those molecules are known to activate DCs and have been implicated in the establishment of efficient antitumor response [27]. ELISA on MC-38 conditioned media showed a significant increase of HMGB1 and Hsp70 levels following ^{213}Bi irradiation (Figure 6). This increase in both DAMP concentrations started 24 and 48 hours post-irradiation for Hsp70 and HMGB1, respectively. Altogether, these data show that ^{213}Bi induces the release of DAMPs from irradiated tumor cells, which may contribute to the antitumor response by activating DCs.

Discussion

Radiotherapy is traditionally used for its cytotoxic effect on cancer cells. There is however growing evidence showing that direct cytotoxicity is not the only process through which radiation may

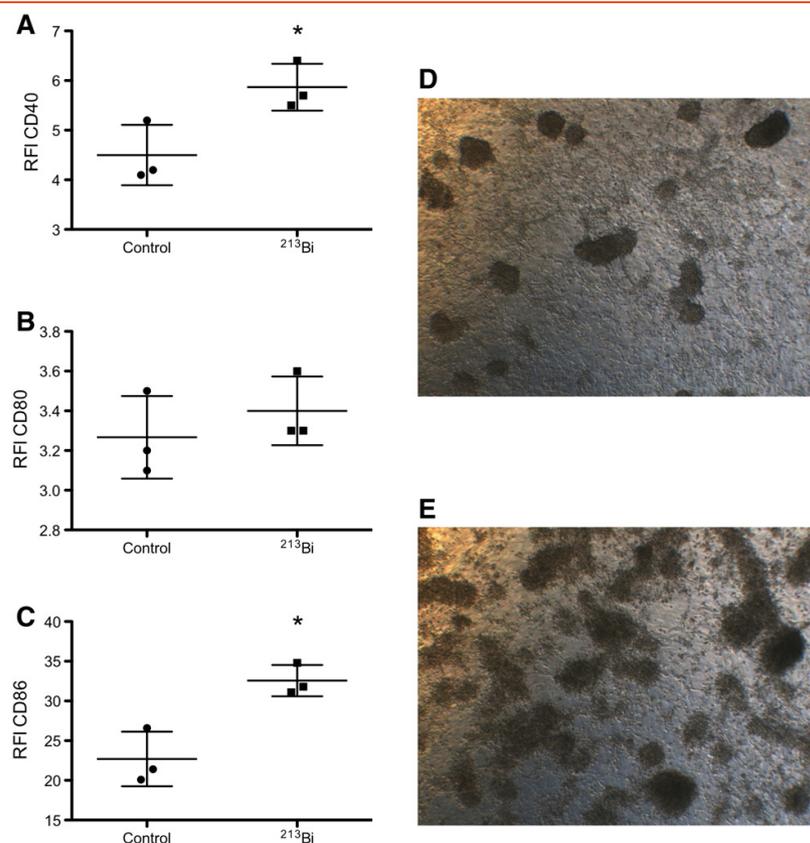


Figure 5. ^{213}Bi -irradiated MC-38 elicit DC maturation. (A–C) Triplicate analysis of RFI for CD40 (A), CD80 (B), and CD86 (C). RFI is calculated as geometric mean of fluorescence intensity of the specific antibody divided by that of the control isotype. (D and E) Snapshot of BMDC after 24 hours in culture with 5×10^6 control MC38 (D) or 5×10^6 irradiated MC-38 (E). * $P \leq .05$ determined using Mann-Whitney nonparametric test.

contribute to tumor elimination. Here, we demonstrate that ^{213}Bi -irradiated tumor cells are highly immunogenic and can elicit a strong antitumor response *in vivo* that protects immunocompetent hosts against further tumor challenge with the same tumor. Indeed, 88% of the vaccinated animals survived to the injection of live MC-38 tumor cells. α particles therefore fulfill the first requirement defined by

Kroemer's group to be defined as an immunogenic cell death inducer [28]. Our results show that irradiation of tumor cells with ^{213}Bi can lead to the elimination of other tumor cells in a distant site, even long after the irradiation. The protective effect of vaccination was indeed long lasting (at least 2 months) and must therefore involve memory cells. Strikingly, this immune protection was observed in all the

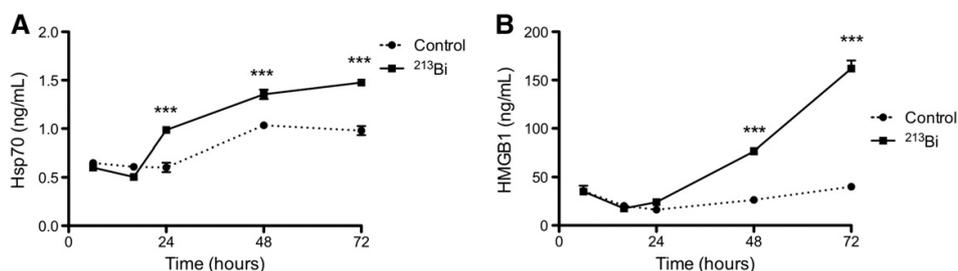


Figure 6. DAMP release after irradiation. (A and B) Evolution of Hsp70 (A) and HMGB1 (B) concentrations determined by ELISA on MC-38 conditioned media after irradiation with ^{213}Bi (squares) and on controls (circles). Data points represent means \pm SD of triplicate measurements. *** $P < .001$ as determined by two-way analysis of variance and Bonferonni posttests. Results are representative of two independent experiments.

animals subjected to a second challenge with live MC-38 cells. The response was T cell mediated as demonstrated by the presence of specific cytotoxic T cells and by the lack of protection in nude mice. This kind of specific, systemic, and long-lasting response would be highly desirable for anticancer therapy because it should help in eliminating distant metastases and preventing relapse. However, T cells may not be the only cells needed for an efficient antitumor effect. Nude mice have functional Natural Killer (NK) and B cells that could participate in the immune response. Further experiments will help to clarify the role of each immune subset in the antitumor response.

Interestingly, tumors grew much faster in nude mice with a median survival of 13 versus 37 days in C57Bl/6 immunocompetent mice. Moreover, 4 of the 25 challenged mice did not develop a tumor, and the rest of the challenged animals showed a slight increase in cytotoxicity against MC-38 compared to naïve mice (however not significant). These data suggest that live tumor cells exhibit some level of immunogenicity, probably related to the fact that the MC-38 cells we used express high levels of major histocompatibility complex class I molecules (data not shown). Although this immune response slows down tumor growth to some extent, it is not sufficient for tumor control in 84% of the animals. This could mean two things: either tumor cells multiply too quickly for the immune response to cope with it, or the immune system sees the tumor as harmless self and represses the initial antitumor response. In both cases, α radiation delivered through RIT would be of great therapeutic interest. Indeed, the high cytotoxicity of α particles could reduce tumor load, and at the same time, α -irradiated tumor cells could activate the immune response and tip the balance toward an effective antitumor response. Additional studies using less immunogenic tumors will however be required to determine whether α radiation would be as efficient in triggering an immune response in such settings.

To depict the mechanisms that could contribute to activation of T cells *in vivo*, we pursued *in vitro* studies on DCs. Their role in anticancer immunity is indeed crucial. When activated with the adequate stimuli, DCs can cross-present tumor-derived antigens to T cells and secrete stimulatory cytokines, which will lead to the establishment of an effective cell-mediated antitumor response. Conversely, if not properly activated, DCs may promote tolerance and T cell unresponsiveness. In fact, in a majority of cancer, the antitumor response is repressed by the host's immune regulatory cells [29]. Here, we exposed immature BMDCs to conditioned media from irradiated MC-38 tumor cells and observed significant changes in both DC morphology and expression profile of several DC activation markers, demonstrating the potency of α -irradiated tumor cells in triggering immune activation.

To further investigate the molecular processes that could contribute to the activation of DCs *in vitro*, we conducted ELISA tests on the conditioned media of α -irradiated tumor cells to detect the presence of well-characterized DAMPs [30]. *In vivo*, as irradiated tumor cells were washed in PBS before vaccination, the molecules involved in immune cells activation cannot be irradiated molecules from the culture medium and have to be secreted by the tumor cells after exposure to ^{213}Bi . Besides, irradiated culture medium alone did not induce DC activation. We showed that ^{213}Bi causes the release of Hsp70 and HMGB1 from MC-38 cells. Such molecules, which are normally endogenous, get released in the extracellular environment after a stress or nonphysiological cell death and can activate immune cells [26,31]. HSP are chaperone proteins capable of binding numerous peptides. The HSP-peptide complexes released from dying cells can be taken up by APC through the common receptor

CD91 to allow for antigen processing and re-presentation to T cells [32]. HMGB1 is a ubiquitous nonhistone nuclear factor that mediates inflammation and immune responses when released from dying cells [33]. HMGB1 production in patients with cancer has conversely been reported in association with both good [34] and poor prognoses [35,36]. HMGB1 has also been involved in numerous processes facilitating tumor progression, such as proliferation [37], metastasis [38,39], angiogenesis [40], and chronic inflammation [41]. The differential activity of HMGB1 is related to the balance of its different redox states (i.e., all-thiol, disulfide, and sulfonated) that are produced in the extracellular environment [42]. In the case of radiotherapy, a rapid and local increase of HMGB1 might act differently on the immune system than a chronic systemic secretion. Notably, HMGB1 has been shown to be mandatory for cross-presentation of antigen derived from dying tumor cells to T cells after radiotherapy, leading to efficient antitumor immune response [43]. Further studies will be required to determine the importance of these DAMPs in the establishment of an immune response in our settings. Using larger screening techniques (i.e., mass spectrometry), it will also be important to identify other species produced after irradiation contributing to such bystander phenomena.

All these data underline the importance of the immune system in response to radiotherapy of cancer. Nevertheless, most studies on RIT efficacy are performed on xenograft models in immunodeficient mice. Therefore, the participation of the immune system in response to therapy is completely overseen. In the future, it will be of prime importance to assess the response to cancer therapy in both immunodeficient and immunocompetent models to take into account the effect of radiation on both tumor cells and the immune environment.

In conclusion, the data presented here show that irradiation of tumor cells with ^{213}Bi induces the release of DAMPs, promotes DC activation, and leads to a systemic and long-lasting antitumor response. A few studies have investigated the impact of γ or β irradiation on the immune system. It has been shown that external beam [44–46] or β emitters like ^{90}Y [21] or ^{153}Sm [47] could elicit effective antitumor response when combined with vaccine or CTL transfer. Our study is in line with these investigations and is the first to demonstrate that irradiation of tumors using an α particle emitter can also lead to the establishment of an efficient antitumor immune response *in vivo*. Even though the impact of α irradiation on the immune response to cancer will have to be further characterized, this study brings new insights on the mechanism of action of α particles and further supports the interest in developing the use of such emitters for cancer therapy.

Acknowledgments

We thank Marie-Hélène Gaugler for critical review of the manuscript. We also thank Sandrine Minault (CRCNA [Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers]) for her technical help, as well as the staff of Unité Thérapeutique Expérimentale (UTE), Cytocell, and Radioactivity facilities (Structure Fédérative de Recherche [SFR] François Bonamy, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes [IRS-UN], University of Nantes).

References

- [1] Goldberg Z and Lehnert BE (2002). Radiation-induced effects in unirradiated cells: a review and implications in cancer. *Int J Oncol* **21**, 337–349.
- [2] Morgan WF (2003). Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene* **22**, 7094–7099.

- [3] Mothersill C and Seymour CB (2004). Radiation-induced bystander effects—implications for cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 158–164.
- [4] Barbet J, Bardiès M, Bourgeois M, Chatal JF, Chérel M, Davodeau F, Faivre-Chauvet A, Gestin JF, and Kraeber-Bodéré F (2012). Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy. *Methods Mol Biol* **907**, 681–697.
- [5] Sharkey RM and Goldenberg DM (2011). Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy* **3**, 349–370.
- [6] Lücke-Huhle C (1982). α -irradiation-induced G₂ delay: a period of cell recovery. *Radiat Res* **89**, 298–308.
- [7] Yong KJ, Milenic DE, Baidoo KE, and Brechbiel MW (2012). ²¹²Pb-radioimmunotherapy induces G₂ cell-cycle arrest and delays DNA damage repair in tumor xenografts in a model for disseminated intraperitoneal disease. *Mol Cancer Ther* **11**, 639–648.
- [8] Soyland C and Hassfjell SP (2000). Survival of human lung epithelial cells following *in vitro* α -particle irradiation with absolute determination of the number of α -particle traversals of individual cells. *Int J Radiat Biol* **76**, 1315–1322.
- [9] Humm JL and Cobb LM (1990). Nonuniformity of tumor dose in radioimmunotherapy. *J Nucl Med* **31**, 75–83.
- [10] Sgouros G, Roeske JC, McDevitt MR, Palm S, Allen BJ, Fisher DR, Brill AB, Song H, Howell RW, and Akabani G, et al (2010). MIRD Pamphlet No. 22 (abridged): radiobiology and dosimetry of α -particle emitters for targeted radionuclide therapy. *J Nucl Med* **51**, 311–328.
- [11] Seideman JH, Stancevic B, Rotolo JA, McDevitt MR, Howell RW, Kolesnick RN, and Scheinberg DA (2011). Alpha particles induce apoptosis through the sphingomyelin pathway. *Radiat Res* **176**, 434–446.
- [12] Friesen C, Roscher M, Hormann I, Leib O, Marx S, Moreno J, and Miltner E (2013). Anti-CD33-antibodies labelled with the alpha-emitter Bismuth-213 kill CD33-positive acute myeloid leukaemia cells specifically by activation of caspases and break radio- and chemoresistance by inhibition of the anti-apoptotic proteins X-linked inhibitor of apoptosis protein and B-cell lymphoma-extra large. *Eur J Cancer* **49**, 2542–2554.
- [13] Supiot S, Gouard S, Charrier J, Apostolidis C, Chatal JF, Barbet J, Davodeau F, and Chérel M (2005). Mechanisms of cell sensitization to α radioimmunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. *Clin Cancer Res* **11**, 7047s–7052s.
- [14] Seidl C, Port M, Gilbertz KP, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Schwaiger M, Röper B, Senekowitsch-Schmidtker R, and Abend M (2007). ²¹³Bi-induced death of HSC45-M2 gastric cancer cells is characterized by G₂ arrest and up-regulation of genes known to prevent apoptosis to avoid necrosis and mitotic catastrophe. *Mol Cancer Ther* **6**, 2346–2359.
- [15] Boyd M, Ross SC, Dorrens J, Fullerton NE, Tan KW, Zalutsky MR, and Mairs RJ (2006). Radiation-induced biologic bystander effect elicited *in vitro* by targeted radiopharmaceuticals labeled with α -, β -, and auger electron-emitting radionuclides. *J Nucl Med* **47**, 1007–1015.
- [16] Chakravarty PK, Alfieri A, Thomas EK, Beri V, Tanaka KE, Vikram B, and Guha C (1999). Flt3-ligand administration after radiation therapy prolongs survival in a murine model of metastatic lung cancer. *Cancer Res* **59**, 6028–6032.
- [17] Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, and Formenti SC (2004). Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 862–870.
- [18] Golden EB, Pellicciotta I, Demaria S, Barcellos-Hoff MH, and Formenti SC (2012). The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Front Oncol* **2**, 88.
- [19] Formenti SC and Demaria S (2012). Combining radiotherapy and Cancer Immunotherapy: a Paradigm Shift. *J Natl Cancer Inst* **1–10**.
- [20] Cameron RB, Spiess PJ, and Rosenberg SA (1990). Synergistic antitumor activity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Interleukin-2 and local tumor irradiation. *J Exp Med* **171**, 249–263.
- [21] Chakravorty M, Gelbard A, Carrasquillo JA, Yu S, Mamede M, Paik CH, Camphausen K, Schlom J, and Hodge JW (2008). Use of radiolabeled monoclonal antibody to enhance vaccine-mediated antitumor effects. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 1173–1183.
- [22] Nikula TK, Curcio MJ, Brechbiel MW, Gansow OA, Finn RD, and Scheinberg DA (1995). A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nucl Med Biol* **22**, 387–390.
- [23] Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, and Mulligan RC (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3539–3543.
- [24] Delemarre FG, Hoogveen PG, De Haan-Meulman M, Simons PJ, and Drexhage HA (2001). Homotypic cluster formation of dendritic cells, a close correlate of their state of maturation. Defects in the biobreeding diabetes-prone rat. *J Leukoc Biol* **69**, 373–380.
- [25] Matzinger P (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301–305.
- [26] Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, and Lotze M (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* **249**, 158–175.
- [27] Nace G, Evankovich J, Eid R, and Tsung A (2012). Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity. *J Innate Immun* **4**, 6–15.
- [28] Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, and Zitvogel L (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* **31**, 51–72.
- [29] Gabrilovich D (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* **4**, 941–952.
- [30] Bianchi ME (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**, 1–5.
- [31] Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, and Agostinis P (2010). Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta* **1805**, 53–71.
- [32] Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, and Srivastava PK (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* **14**, 303–313.
- [33] Andersson U and Tracey KJ (2011). HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* **29**, 139–162.
- [34] Suzuki Y, Mimura K, Yoshimoto Y, Watanabe M, Ohkubo Y, Izawa S, Murata K, Fujii H, Nakano T, and Kono K (2012). Immunogenic tumor cell death induced by chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **72**, 3967–3976.
- [35] Chung H, Lee SG, Kim H, Hong D, Chung J, Stroncek D, and Lim JB (2009). Serum high mobility group box-1 (HMGB1) is closely associated with the clinical and pathologic features of gastric cancer. *J Transl Med* **7**, 38.
- [36] Yang GL, Zhang LH, Bo JJ, Huo XJ, Chen HG, Cao M, Liu DM, and Huang YR (2012). Increased expression of HMGB1 is associated with poor prognosis in human bladder cancer. *J Surg Oncol* **106**, 57–61.
- [37] Riuizi F, Sorci G, and Donato R (2006). The amphoterin (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) pair modulates myoblast proliferation, apoptosis, adhesiveness, migration, and invasiveness. Functional inactivation of RAGE in L6 myoblasts results in tumor formation *in vivo*. *J Biol Chem* **281**, 8242–8253.
- [38] Kuniyasu H, Oue N, Wakikawa A, Shigeishi H, Matsutani N, Kuraoka K, Ito R, Yokozaki H, and Yasui W (2002). Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J Pathol* **196**, 163–170.
- [39] Sasahira T, Akama Y, Fujii K, and Kuniyasu H (2005). Expression of receptor for advanced glycation end products and HMGB1/amphoterin in colorectal adenomas. *Virchows Arch* **446**, 411–415.
- [40] van Beijnum JR, Buurman WA, and Griffioen AW (2008). Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways *via* high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* **11**, 91–99.
- [41] Campana L, Bosurgi L, and Rovere-Querini P (2008). HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr Opin Immunol* **20**, 518–523.
- [42] Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, Liu J, Antonelli A, Preti A, and Raeli L, et al (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med* **209**, 1519–1528.
- [43] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, and Saulnier P, et al (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13**, 1050–1059.
- [44] Garnett CT1, Palena C, Chakravorty M, Tsang KY, Schlom J, and Hodge JW (2004). Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* **64**, 7985–7994.
- [45] Chakravorty M, Abrams SI, Coleman CN, Camphausen K, Schlom J, and Hodge JW (2004). External beam radiation of tumors alters phenotype of tumor cells to render them susceptible to vaccine-mediated T-cell killing. *Cancer Res* **64**, 4328–4337.

- [46] Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, Camphausen K, Luiten RM, de Ru AH, and Neijssen J, et al (2006). Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* **203**, 1259–1271.
- [47] Chakraborty M, Wansley EK, Carrasquillo JA, Yu S, Paik CH, Camphausen K, Becker MD, Goeckeler WF, Schlom J, and Hodge JW (2008). The use of chelated radionuclide (samarium-153-ethylenediaminetetra-methylenephosphonate) to modulate phenotype of tumor cells and enhance T cell-mediated killing. *Clin Cancer Res* **14**, 4241–4249.

II- Partie II : Association de la RIT α et de l'immunothérapie

Le système immunitaire peut donc jouer un rôle important dans l'effet anti-tumoral de la RT par les particules α et de la RT en général. Beaucoup de traitements ne sont testés que sur des animaux immunodéficients en préclinique négligeant totalement l'effet sur la réponse immunitaire, il est donc important d'inclure des tests sur des animaux possédant un système immunitaire fonctionnel. L'environnement immunosuppresseur observé chez les patients cancéreux est l'une des raisons pour lesquelles l'effet abscopal induit par la RT est si rarement observé en clinique (Formenti and Demaria, 2013). Toutefois, de récents essais cliniques ont montré qu'il est possible d'augmenter significativement la probabilité d'un effet abscopal grâce à des traitements combinant la RT à l'immunothérapie (Vacchelli et al., 2013; Formenti and Demaria, 2013). A la lumière du rôle anti-tumoral que peut générer l'irradiation α , tester des combinaisons thérapeutiques alliant RIT α et diverses immunothérapies sont donc une voie à investiguer.

La RIT α offre la possibilité de traiter des maladies disséminées ou résiduelles, tout en gardant une exposition acceptable des tissus sains aux rayonnements ionisants avec une toxicité limitée. Le MM, par sa localisation, permet d'étudier l'efficacité de ce type de traitement. Dans l'équipe 13, la RIT α d'un modèle murin de MM syngénique et immunocompétent a été réalisée donnant lieu à des résultats encourageants (Chérel et al., 2013).

Afin de potentialiser l'efficacité de ce traitement, l'objectif de cette deuxième partie du travail de thèse a été d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une approche combinatoire de la RIT α et de l'ACT de LT spécifiques du MM. Cette approche est réalisée dans ce modèle de MM murin où la participation du système immunitaire en réponse aux thérapies peut avoir lieu.

Pour cela, la lignée de MM, la 5T33 MM exprimant le CD138 et l'ovalbumine (5T33-OVA), présentée à la surface cellulaire sous forme de complexe CMH-peptide dérivé de l'ovalbumine (H_2K^b -OVA₂₅₇₋₂₆₄), est injectée chez des souris immunocompétentes, les C57BL/6/KaLwRij. Puis, l'injection, 10 jours après la greffe tumorale, d'une activité de 3,7 MBq d'un anticorps anti-CD138 couplé au bismuth-213 permet la RIT α du MM. L'ACT s'effectue par l'injection de LT CD8⁺ activés spécifiques du complexe H_2K^b -OVA₂₅₇₋₂₆₄ (LT CD8⁺ OT-I).

Cette deuxième partie des résultats débute par un premier article traitant de la mise en place du modèle 5T33-OVA et de la combinaison thérapeutique (figure 31). En effet, la réalisation de ce modèle nécessite tout d'abord de transduire un plasmide codant pour l'ovalbumine cytoplasmique dans les 5T33. Ainsi l'ovalbumine peut être exprimée en surface sous forme de complexes H_2K^b -OVA₂₅₇₋₂₆₄, reconnus par les LT CD8⁺ OT-I. Nous devons ensuite vérifier que le phénotype des 5T33-OVA est stable et que ces cellules sont toujours non immunogènes une fois injectées chez la souris. Puis, l'étape du transfert adoptif doit être déterminée, à savoir, la date d'injection après la RIT α et la quantité de LT CD8⁺ OT-I à injecter. Enfin, l'efficacité thérapeutique et le devenir des LT CD8⁺ OT-I injectés pourront être appréciés. Pour évaluer plus rapidement ces paramètres *in vivo*, l'injection des 5T33-OVA est faite en s.c.

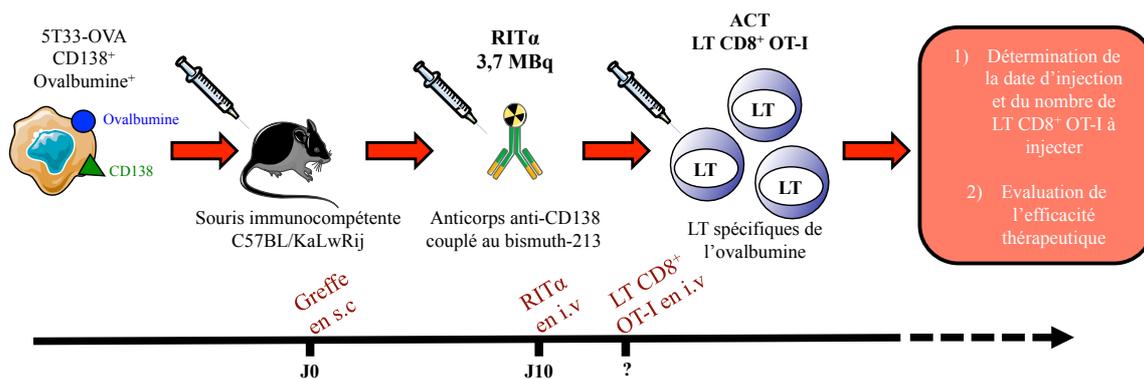


Figure 31 : Schéma de l'association thérapeutique (5T33-OVA en s.c)

A) Article II : Combining α -RIT and adoptive T cell therapy to treat Multiple Myeloma

Jérémie Ménager, Jean-Baptiste Gorin, Cédric Louvet, Sébastien Gouard, Catherine Maurel, Michel Chérel, Alain Faivre-Chauvet, Alfred Morgenstern, Frank Bruchertseifer, François Davodeau, Joëlle Gaschet et Yannick Guilloux

Manuscrit en soumission

Combining α -RIT and adoptive T cell therapy to treat Multiple Myeloma

Jérémie Ménager^{1,2,3}, Jean-Baptiste Gorin^{1,2,3}, Cédric Louvet⁴, Sébastien Gouard^{1,2,3}, Catherine Maurel^{1,2}, Michel Chérel^{1,2,3,5}, Alain Faivre-Chauvet^{1,2,3,6}, Alfred Morgenstern⁷, Frank Bruchertseifer⁷, François Davodeau^{1,2,3}, Joëlle Gaschet^{1,2,3} and Yannick Guilloux^{1,2,3}

¹ CRCNA - UMR 892 INSERM, ² 6299 CNRS, ³ Université de Nantes, Nantes, France

⁴ INSERM U1064 –ITUN, Nantes, France

⁵ Institut de Cancérologie de l’Ouest, Saint-Herblain, France

⁶ CHU Nantes, Nuclear Medicine Department, Nantes, France

⁷ Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany

Corresponding author : Yannick Guilloux, INSERM, U892 - CRCNA, 44007 Nantes cedex 1, France, Tel :+33 228 080 234

Key words : radioimmunotherapy, alpha particles, immunotherapy, adoptive cell transfer

Grant support: This work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer, from LABEX Immunotherapy Graft-Oncology (LABEX IGO) and from the Pays de la Loire Council “Nucléaire pour la Santé” (NucSan). J.-B.G. and J.M.

are supported by grants from the French Ministry of Research and Higher Education. A.M. and F.B. are supported by the European Commission.

Abstract

Alpha radio-immunotherapy is a cancer therapy that allows delivery of α radionuclides to tumor cells. α -RIT is currently evaluated in the treatment of different type of cancers. *In vivo*, investigation of α -RIT mechanisms is rare and very few combined treatments have been performed. Therefore, as for external beam radiotherapy, optimizing α -RIT efficacy may be considered to foster immunity against cancer. Combining α -RIT with adoptive T-cell transfer is one way to boost the immune system. In the present study, mice bearing myeloma cell line, 5T33-OVA grafted subcutaneously, were treated with α -RIT then adoptive transfer of OT-I T-cells and compared with control and each of monotherapy arms. We showed that OT-I T-cells efficiently recognized 5T33-OVA, *in vitro*. Mice, injected with 5T33-OVA and treated with α -RIT combined with OT-I transfer, demonstrated significant tumor growth control and improved survival compared to α -RIT or OT-I T-cells treatment alone (median survival: 31 vs. 28 days for α -RIT alone and 27 days for OT-I T-cells alone). Monitoring of injected cells showed that OT-I T-cells migrate to the tumor site. These results demonstrate efficacy of the therapeutic combination and a significant impact on efficacy of OT-I T-cells. This preclinical study provides encouraging results to combine adoptive transfer of tumor specific T lymphocytes with α -RIT for cancer treatment.

Introduction

Multiple myeloma (MM) is characterized by excess monoclonal plasma cells in the bone marrow (BM), often associated with monoclonal protein in blood and/or in urine. Despite the development of new drugs including proteasome inhibitor bortezomib and immunomodulatory drugs (IMiDs) thalidomide and lenalidomide, MM is still an incurable hematological malignancy with a median survival of 4 years (Kyle and Rajkumar, 2008; Anderson, 2012). This gives way to new therapeutic approaches such as radiotherapy

Radiotherapy is one of the most successful cancer therapies, 50% of therapies incorporate radiation as one of the more efficacious forms of therapy (Teshima et al., 1996). The effects of local radiotherapy on tumors are rapidly emerging as opportunities to remodel and enhance immunity against cancer. Implementation of an immune response may be explained by the impact of ionizing radiations on tumor cells and tumor cell microenvironment that favour the increase expression of MHC-peptide complex (Garnett et al., 2004; Reits et al., 2006; Newcomb et al., 2006), death receptor (Chakraborty et al., 2003) and the release of various danger signals such as Heat shock proteins (HSP), danger associated molecular pattern (DAMP), or others cytokines by cancer cells (Apetoh et al., 2007; Kroemer et al., 2013).

So interesting, several studies have described that radiotherapy can induce tumoral regression with development of an adaptive immune response dependent on tumor specific T-lymphocytes in preclinical models (Chakravarty et al., 1999; Reits et al., 2006; Demaria et al., 2004; Demaria and Formenti, 2012). During the past years, the number of clinical and preclinical studies that have reported successful results by combining local radiation and immunotherapy strategies has steadily increased (Formenti and Demaria, 2013; Cameron et al., 1990; Rosenberg et al., 2008; Postow et al., 2012; Vacchelli et al., 2013).

One of the challenges in MM therapy is to maximize survival outcomes and minimize treatment-related toxicities, while offering the best supportive care. Alpha radioimmunotherapy (α -RIT) could satisfy these requirements. α -RIT is an anticancer therapeutic that deliver an α emitter in close contact with target cells. This strategy involves the use of monoclonal antibody (mAbs) for the delivery of therapeutic alpha radionuclides to tumor cells (Supiot et al., 2007; Chérel et al., 2013; Supiot et al., 2005). (α -particles are ^4He nucleus. With a +2 charge) α -particles are more effective ionization agents, have a high linear

energy transfer (LET), in the range of 100 KeV/ μm , and are highly efficient in depositing energy over a short range in tissue (50–100 μm). This allows effective targeting and killing of disseminated cancer cells with minimal effects on healthy tissue. Based on alpha particle characteristics, α -RIT is a therapy used in the treatment of different type of cancers. (Navarro-Teulon et al., 2013; Baidoo et al., 2013).

In vivo, investigation of α -RIT mechanisms (impact on immune system, protein release by death cells...) is rare and very few combination treatments have been performed (Yong et al., 2013). Therefore, in the same way as external beam radiotherapy, optimizing the α -RIT may be considered through a combination with the effects of tumor-specific cellular immunotherapy. The objective is to help the immune system. Thus, the combination of α -RIT with the adoptive transfer of autologous tumor-specific T-cells seems to be relevant.

The study of combination therapy: α -RIT and adoptive cell transfer (ACT) was evaluated in a Multiple Myeloma (MM) immunocompetent mouse model, by injection of The 5T33 MM cell line, which express the CD138 antigen (syndecan-1) and ovalbumin. Then α -RIT of MM was done by injection of an anti-CD138 antibody coupled to the alpha emitter, 213-bismuth. Subsequently, ACT was performed by injection of ovalbumin specific T-cells (OT-I T-cells). Here, we report here for the first time that α -RIT in combination with ACT result in a significant tumor growth inhibition associated with increased survival.

Materials and methods

Animals

Female C57BL6/KaLwRij mice were purchased from Harlan CPB (Horst, The Netherlands) and housed in UTE animal facility (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes, licence number: B-44-278), under conventional conditions. All mice were 8 to 10 weeks old at the beginning of each experiment. Experiments performed in this study were approved by the Animal Experimentation Ethic Committee of the Pays-de-Loire (protocol n° CEEA.2013.2).

C57BL/6, OVA-specific CD8⁺ (OT-I) CD45.1⁺ mice, were originally purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and maintained at the INSERM UMR 1064 germ-free animal facility. These mice were backcrossed for at least 5 generations with C57BL/6 RAG^{-/-} mice.

5T33-OVA Multiple Myeloma Cells

5T33-OVA cell line was produced by modification of the 5T33 murine MM cell line kindly provided by Dr. Harvey Turner (Department of Nuclear Medicine, Fremantle Hospital, Western Australia) with the permission of Dr. J. Radl (TNO Institute, Leiden, The Netherlands) (Radl et al., 1988; Garrett et al., 1997).

To produce the 5T33-OVA cells, a sequence containing the cDNA coding for cytoplasmic Ovalbumin was obtained by BamHI-EcoRI digestion of the cytoplasmic Ovalbumin vector (Addgene). The fragment was cloned into BamHI and EcoRI sites of the retroviral vector pMX (Onishi et al., 1996). Phoenix-Ampho packaging cells were then transfected with the ovalbumin retroviral construct, supernatants were collected and used to transduce 5T33 cells as previously described. Three days after retroviral transduction, 5T33-OVA cells were sorted by flow cytometry (FACS ARIA III, BD) by using mAb 25-D1.16 (eBioscience), specific for H₂K^d/OVA₂₅₇₋₂₆₄ complexes.

5T33-OVA cells were cultured in RPMI1640 medium (Gibco) containing 2 mM L-glutamine, and 10% heat-inactivated fetal calf serum (PAA) and were incubated at 37°C, 5% CO₂, 95% humidity. Aliquots of early passaged cells were frozen in 10% dimethylsulfoxide, 90% FCS and stored at -196°C.

OT-I cell generation and Adoptive cell transfer (ACT)

Spleen and lymph nodes from C57BL/6 OT-I transgenic mice were extracted under aseptic conditions and dissociated into single-cell suspensions. OT-I CD8⁺ T-cells were subsequently purified using CD8a⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany) according to the manufacturer instructions. Efficacy of the selection was controlled by flow cytometry; the resulting cell suspension typically contained more than 80% of CD45.1 OT-I CD8⁺ T cells.

Stimulation of OT-I CD8⁺ T-cells was done by incubating 1×10^6 purified OT-I T-cells with 5×10^6 irradiated syngeneic spleen cells in 2 ml DMEM supplemented with 10% FCS (Life Technologies, Paisley, Scotland) containing 5 μ M Ovalbumin peptide (SIINFELK), 5U/mL IL-2, and 20ng/ml murine IL-12. On day 3, the cultures were split into four aliquots and fed with fresh medium containing IL-2. On day 6, cells were harvested and washed with DMEM medium at least three times. The activated OT-I CD8⁺ T cells were then used for ACT experiments and were injected intravenously 11 days after the graft of 5T33-OVA myeloma cells.

Cytotoxic assay

Cytotoxic activity was assessed using a standard ⁵¹Cr-release assay. Target cells were labeled with 75 μ Ci ⁵¹Cr for 1 h at 37°C, washed four times with culture medium, and then plated at the indicated effector to target (E:T) cell ratio in a 96-well V-bottom plate. After a 4-h incubation at 37°C, 25 μ l of supernatant were removed from each well, mixed with 100 μ l of scintillation fluid, and ⁵¹Cr activity was counted in a scintillation counter. Each test was performed in triplicate. The results are expressed as the percentage of lysis, which is calculated according to the following equation: $(\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximal release} - \text{spontaneous release}) \times 100$, where experimental release represents the mean cpm for the target cells in the presence of effector cells, spontaneous release represents the mean cpm for target cells incubated without effector cells, and maximal release represents the mean cpm for target cells lysed with 1% Triton X-100.

Antibody Radiolabeling and RIT treatment

The rat anti-mouse CD138 antibody was conjugated to 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-cyclohexyl-diethylenetriaminepenta-acetic acid (SCN-CHX-A''-DTPA, Macrocylics, Dallas, TX, USA). For radiolabeling, the immunoconjugate was incubated with ^{213}Bi eluted from a $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ generator (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany) for 10 min at 37°C in 0.6 M sodium acetate (pH 5.3) and 0.01% ascorbic acid. The resulting ^{213}Bi - labeled immunoconjugate was purified from unbound ^{213}Bi by size exclusion chromatography using a PD-10 column (Sephadex G-25). Radiochemical purity was $>95\%$, as determined by ITLC-SG using 0.1M citrate buffer pH 4.5. Treatment was initiated 10 days after transplantation with 3,7 MBq (100 μCi) of ^{213}Bi -labeled anti-mouse CD138 antibody injected intravenously (i.v.) in tail vein.

Recovery of Tumor-infiltrating Lymphocytes.

After sacrifice, tumors were extracted from mice that were inoculated subcutaneously with 5T33-OVA cells. Single cell suspensions were prepared by grinding the tumors on cell strainer 70 μm (BD Falcon). These cells were analyzed by single or two-color flow cytometry.

Antibodies and flow cytometry

Fluorochrome-conjugated mouse specific mAbs directed against CD45.1, CD8b antigens, isotype control mAbs and Fc blockTM were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Fluorochrome-conjugated mAbs directed against $\text{H}_2\text{K}^{\text{d}}$ /OVA₂₅₇₋₂₆₄ complexes, CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, NK1.1, CD11c, CD19 were purchased from eBioscience (Paris, France).

Cell surface staining was done using standard procedure in the presence of 0,1% BSA. Adequate isotypic controls were used in parallel. Stained samples were analyzed on a FACS Canto flow cytometer using Diva software (BD Biosciences) and on FACS Calibur flow cytometer using Cell Quest Pro software (BD biosciences).

Statistical analysis

Tumor volumes were calculated via three measurements of tumor with caliper and using the formula $4/3\pi \times r^3$, which is derived from a formula for calculating the volume of a sphere. Data were represented as mean \pm SD as indicated in each experiment. Comparisons between the groups were made using two-way analysis of variance (ANOVA) and by student's t test. The median survival of mice with the different treatments was calculated by using the Kaplan–Meier method and analyzed using log rank test. A p value of <0.05 was considered significant for all the experiments.

Results

I- 5T33-OVA phenotypic analysis

The prerequisite to evaluate the association of α -RIT and ACT was to develop a suitable tumor model expressing two antigens, the first one allowing targeting with a radiolabeled antibody and the second one for specific T-cells recognition. Therefore, we used the 5T33 murine myeloma cell line, expressing CD138 antigen for RIT treatment, and we modify the cells to express H₂K^d/OVA₂₅₇₋₂₆₄ complexes which can be specifically recognized by OT-I CD8⁺ T-cells (derived from C57BL/6 OT-I transgenic mice). These modified 5T33 cells were generated by transduction with a plasmid coding for the cytoplasmic ovalbumin gene. Then transduced 5T33 cells, called 5T33-OVA cells, expressed ovalbumin in the cytosol and H₂K^d/OVA₂₅₇₋₂₆₄ complexes on the plasma membrane.

5T33-OVA cells were purified by FACS sorting based on the expression of H₂K^d/OVA₂₅₇₋₂₆₄ complexes. The purity of the sorting was controlled by cell labeling with the 25-D1.16 antibody specific for H₂K^d/OVA₂₅₇₋₂₆₄ complexes. As shown in Fig. 1A, 73.36% \pm SD of 5T33-OVA cells expressed this CMH-peptide complex compared parental 5T33 cells. CD138 was also controlled to ensure that the transduction did not modify its expression on the 5T33-OVA cells. As shown in Fig. 1B, respectively 96,36 % and 97.13 % \pm SD of 5T33 and 5T33-OVA cells were labeled by the anti-CD138 antibody (Fig 1B).

Together, these data demonstrate that transduction of cytoplasmic ovalbumin was efficient and stable since the 5T33-OVA cells express ovalbumin derived MHC-peptide complexes without altering the expression of CD138 antigen at the cell surface.

II- *In vitro* Recognition of 5T33-OVA cells

To further characterize the 5T33-OVA cells, we performed a cytotoxic assay to evaluate the recognition efficiency by OT-I CD8⁺ T-cells. For this experiment, CD8⁺ T-cells derived from OT-I mouse splenocytes were cultured *in vitro* for 5 days with irradiated syngeneic spleen cells loaded with 5 μ M of the K^b-restricted OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide. Primed OT-I lymphocytes did not kill parental 5T33 cells (Fig. 2, <5%), whereas 5T33-OVA cells and 5T33 pulsed with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide were killed, with lysis of 17% to 59% and 28% to 73% respectively at the different E:T ratios (Fig. 2). These data indicate that the 5T33-OVA express enough H₂K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ complexes to be recognized by the OT-I T-cells. Moreover, we observe a nice correlation between the high level of H₂K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ expression on 5T33-OVA cells, seen by flow cytometry (Fig 1A), and the efficient recognition by OT-I T-cells.

III- *In vivo* proliferation of 5T33-OVA cells

To complete the validation of our model, we investigated the *in vivo* proliferation capability of 5T33-OVA subcutaneously. Such study was performed by injection of 2.10⁶ of 5T33 or 5T33-OVA in C57BL6/KalwRij mice and tumor progression was monitored. As shown in Fig.3, no growth difference was detected between parental 5T33 and 5T33-OVA (2 way ANOVA, p<0,05).

These data show that there is no significant difference between the growth of parental 5T33 and 5T33-OVA tumors *in vivo* suggesting an absence or a low recognition of 5T33-OVA by the C57BL6/KalwRij mice endogenous immune system.

IV- Adoptive immunotherapy using OT-I

To assess the impact of ACT on tumor growth, 1.10⁶, 2.10⁶ or 5.10⁶ OT-I T-cells were injected intravenously in mice tail vein, eleven days after subcutaneous tumor engraftment. As shown in Fig 4A, mice injected with 2 or 5.10⁶ OT-I T-cells exhibited a significant tumor growth reduction compared with mice receiving no treatment or receiving 1.10⁶ OT-I T-cells (p< 0.001). There was no significant difference between untreated mice and those receiving 1.10⁶ OT-I T-cells (p>0.05).

OT-I T-cells express the CD45.1 congenic marker while the C57BL6/KaLwRij mice are homozygous for the CD45.2 alloantigen. Thus the CD45.1 antigen enabled us to evaluate the ability of OT-I cells to infiltrate the tumor *in vivo*. T-cell infiltrates were analyzed when tumors reached endpoint (Fig. 4B). Tumors were mechanically dilacerated and cell suspensions were analyzed by flow cytometry to quantify OT-I T-cells. The injected OT-I T-cells were detectable in the tumor up to 14 days after injection and the proportion of OT-I T-cells among CD8⁺ T-cells was higher in mice injected with 5.10⁶ OT-I T-cells compared to that injected with 1.10⁶ or 2.10⁶ OT-I T-cells.

These results demonstrated the ability of injected OT-I T-cells to reach and infiltrate the tumor. Since the injection of 2 or 5.10⁶ OT-I had similar effects on tumor progression, we decided to perform the ACT with 5.10⁶ OT-I T-cells in order to facilitate T cell tracking *ex vivo*.

V- Combining α -RIT + ACT is the most efficient treatment towards tumor development

Next, we investigated whether the combination of α -RIT with ACT could efficiently inhibit tumor growth and increase survival of mice transplanted with 5T33-OVA.

For this purpose, α -RIT was performed 10 days after tumor engraftment, by i.v. injection of 3.7 MBq of bismuth-213 labelled anti-CD138 antibody. Since the radionuclide half-life is short (45.6 minutes), ACT was made 1 day after RIT, i.e 11 days after 5T33-OVA engraftment. Tumor growth was also evaluated for each treatment alone.

No significant difference was observed between tumor growth after α -RIT treatment alone or after ACT treatment alone (Fig. 5A). However, the mice receiving the combination of α -RIT followed by ACT exhibited a significant decrease in tumor development compared to the control mice that received PBS or the one that received RIT alone or ACT alone. Monitoring of those animals was also done with regards to their survival after each treatment; the mice being sacrificed when tumour reached an endpoint volume of 2500 mm³ (Fig. 5B). Once again, there was a significant difference in median survival of mice received the combination of RIT and ACT (31 days) compared to mice receiving ACT alone (28 days, p = 0.0391), or RIT alone (27 days, p = 0.0413). Altogether these data demonstrated that

combining RIT and ACT was the most efficient therapeutic approach in terms of tumor development and survival.

Discussion

RIT and immunotherapy are two type of strategies developed for the treatment of diverse solid and disseminated cancers (Navarro-Teulon et al., 2013). On one hand, RIT has been evaluated in animal models as well as in human and has emerged as one of the most promising treatment option, particularly for hematologic malignancies (Walter et al., 2010). However, despite progress in targeting and vectorisation, new therapeutic association needs to be evaluated in order to improved disease outcome. On the other hand, although many immunotherapies (e.g cytokines, cell therapies, tumor vaccines...) show potent anti-tumor responses *in vitro*, malignant cells oftentimes evade the immune system *in vivo* and produce factors that attenuate anti-tumor effects elicited by those immunotherapies (Alatrash et al., 2013).

Tumor response to vectorized or none vectorized radiation, can lead to the emergence of an immune response, including T lymphocyte-mediated immune response (Demaria and Formenti, 2012; Burnette et al., 2011). Moreover radiation has a general impact on the tumor cells and immune system: enhancing peptide production, the expression of Fas (Chakraborty et al., 2003), ICAM-I (Garnett et al., 2004) and as well as MHC class I (Reits et al., 2006) and tumor antigen (Garnett et al., 2004) expression onto the tumor. These events result in a better recognition of the tumor by CTL.

Tumor-specific antibodies coupled to α -particles, can mediate tumor destruction, deliver radiation on the tumor site with acceptable exposure to surrounding healthy tissus and lead to increased tumor immunogenicity (Keisari et al., 2014; Gorin et al., 2014). This prompted us to combine α -RIT with CD8⁺ T-cells targeting a specific MHC class I peptide complex expressed on the tumor, also called ACT. This novel combination may potentiate α -RIT and add a new perspective to established cancer treatments.

So this study aimed to develop, a tumor model in order to evaluate the relevance of combining α -RIT and ACT consisting in the injection of tumor specific T-lymphocytes. This therapeutic association was evaluated in the immunocompetent C57BL6/KaLwRij/5T33-OVA MM mouse model. Even though orthotopic development of the disease is possible in this model, we chose to study subcutaneous MM grafts, a setting that facilitates transfered T-cells monitoring, especially tumor infiltration. Injection of OT-I T-cells was perform 24 hours after α -RIT to benefit from the early effects of ionizing radiation on the tumor (e.g

inflammatory context, release of cytokines and/or DAMP...) without any harm to the adoptive T-cells because bismuth half life is very short.

The results show that OT-I T-cells persist over time, that the cells infiltrate the tumor and that their tropism for the tumor is dose-dependent (Fig. 3B). Persistence of effector T-cells *in vivo* is an essential parameter in cancer treatment because it can lead to enhanced antitumor efficacy *in vivo* (Singh et al., 2007; Kowolik et al., 2006). Moreover our data demonstrate that OT-I T-cells have the capabilities to migrate inside the tumor. Surprisingly the size of the T cell infiltrate in the tumor is inversely correlated with the therapeutic effect. Finally we demonstrate that ACT in combination with α -RIT results in significant better tumor growth control and improved survival compared to α -RIT or ACT alone. Moreover this combination demonstrate no adverse effects, especially no additional toxicity as demonstrated by the absence of early mortality in mice receiving ACT after α -RIT.

OT-I T cells have been stimulated the same way *in vitro* for both ACT alone or ACT combined with RIT. Surprisingly only the therapeutic combination resulted in a better tumor growth control *in vivo*. These results support the hypothesis that α -RIT can induce an inflammatory context in the tumor and its microenvironment (Gorin et al., 2014) that favor infiltration and function of the injected-OT-I T-cells.

This inflammatory context could potentiate the transition of activated T-cells to optimal induction of effector T-cells and thus facilitate tumor growth control. Such hypothesis has already been proposed in a mastocytoma tumor model (Guilloux et al., 2001). In addition, a transient hematologic toxicity is observed a few days after α -RIT (nadir = between 6 and 15 days after α -RIT) as a result of bismuth irradiation on blood cells and bone marrow (Chérel et al., 2013). This peripheral blood cell depletion, especially the lymphodepletion could therefore promote OT-I T-cell expansion and activation. Finally, it is also possible that radiation-induced remodeling of the abnormal tumor vessels, results in efficient tumor infiltration by adoptive T-cells and a better control of tumor proliferation (Ganss et al., 2002).

In summary, the current study explored the feasibility, safety and efficacy of combining ACT after α -RIT. In our model, this passive immunotherapy strategy limits tumor progression after α -RIT. It would be interesting to evaluate this combination in a disseminated tumor model where the efficacy of the α -RIT is proven, to confirm the synergy we observed here and to address in detail the anti-tumor immune response in a more physiological setting: epitope spreading of tumor antigens, stimulation of endogenous T-cells, implementation of a memory response.

Bibliography

- Alatrash, G., H. Jakher, P.D. Stafford, and E.A. Mittendorf. 2013. Cancer immunotherapies, their safety and toxicity. *Expert Opin Drug Saf.* 12:631–645. doi:10.1517/14740338.2013.795944.
- Anderson, K.C. 2012. The 39th David A. Karnofsky Lecture: bench-to-bedside translation of targeted therapies in multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 30:445–452. doi:10.1200/JCO.2011.37.8919.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M.C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F.J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.-P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. André, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 13:1050–1059. doi:10.1038/nm1622.
- Baidoo, K.E., K. Yong, and M.W. Brechbiel. 2013. Molecular pathways: targeted α -particle radiation therapy. *Clin. Cancer Res.* 19:530–537. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0298.
- Burnette, B.C., H. Liang, Y. Lee, L. Chlewicki, N.N. Khodarev, R.R. Weichselbaum, Y.-X. Fu, and S.L. Auh. 2011. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res.* 71:2488–2496. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2820.
- Cameron, R.B., P.J. Spiess, and S.A. Rosenberg. 1990. Synergistic antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes, interleukin 2, and local tumor irradiation. Studies on the mechanism of action. *J. Exp. Med.* 171:249–263.
- Chakraborty, M., S.I. Abrams, K. Camphausen, K. Liu, T. Scott, C.N. Coleman, and J.W. Hodge. 2003. Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. *J. Immunol.* 170:6338–6347.
- Chakravarty, P.K., A. Alfieri, E.K. Thomas, V. Beri, K.E. Tanaka, B. Vikram, and C. Guha. 1999. Flt3-ligand administration after radiation therapy prolongs survival in a murine model of metastatic lung cancer. *Cancer Res.* 59:6028–6032.
- Chérel, M., S. Gouard, J. Gaschet, C. Saï-Maurel, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, M. Bourgeois, J.-F. Gustin, F.K. Bodéré, J. Barbet, P. Moreau, and F. Davodeau. 2013. ²¹³Bi Radioimmunotherapy with an Anti-mCD138 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Multiple Myeloma. *J. Nucl. Med.* 54:1597–1604. doi:10.2967/jnumed.112.111997.
- Demaria, S., and S.C. Formenti. 2012. Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. *Front Oncol.* 2:95. doi:10.3389/fonc.2012.00095.
- Demaria, S., B. Ng, M.L. Devitt, J.S. Babb, N. Kawashima, L. Liebes, and S.C. Formenti. 2004. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58:862–870. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.09.012.

- Formenti, S.C., and S. Demaria. 2013. Combining Radiotherapy and Cancer Immunotherapy: A Paradigm Shift. *J. Natl. Cancer Inst.* doi:10.1093/jnci/djs629.
- Ganss, R., E. Ryschich, E. Klar, B. Arnold, and G.J. Hämmerling. 2002. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res.* 62:1462–1470.
- Garnett, C.T., C. Palena, M. Chakraborty, M. Chakraborty, K.-Y. Tsang, J. Schlom, and J.W. Hodge. 2004. Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 64:7985–7994. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1525.
- Garrett, I.R., S. Dallas, J. Radl, and G.R. Mundy. 1997. A murine model of human myeloma bone disease. *Bone.* 20:515–520.
- Gorin, J.-B., J. Menager, S. Gouard, C. Maurel, Y. Guilloux, A. Faivre-Chauvet, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, M. Chérel, F. Davodeau, and J. Gaschet. 2014. Antitumor Immunity Induced after α Irradiation. *Neoplasia.* 16:319–328. doi:10.1016/j.neo.2014.04.002.
- Guilloux, Y., X.F. Bai, X. Liu, P. Zheng, and Y. Liu. 2001. Optimal induction of effector but not memory antitumor cytotoxic T lymphocytes involves direct antigen presentation by the tumor cells. *Cancer Res.* 61:1107–1112.
- Keisari, Y., I. Hochman, H. Confino, R. Korenstein, and I. Kelson. 2014. Activation of local and systemic anti-tumor immune responses by ablation of solid tumors with intratumoral electrochemical or alpha radiation treatments - Springer. *Cancer Immunol. Immunother.* 63:1–9. doi:10.1007/s00262-013-1462-2.
- Kowolik, C.M., M.S. Topp, S. Gonzalez, T. Pfeiffer, S. Olivares, N. Gonzalez, D.D. Smith, S.J. Forman, M.C. Jensen, and L.J.N. Cooper. 2006. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res.* 66:10995–11004. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0160.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, O. Kepp, and L. Zitvogel. 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 31:51–72. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100008.
- Kyle, R.A., and S.V. Rajkumar. 2008. Multiple myeloma. *Blood.* 111:2962–2972. doi:10.1182/blood-2007-10-078022.
- Navarro-Teulon, I., C. Lozza, A. Pèlerin, E. Vivès, and J.-P. Pouget. 2013. General overview of radioimmunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy.* 5:467–487. doi:10.2217/imt.13.34.
- Newcomb, E.W., S. Demaria, Y. Lukyanov, Y. Shao, T. Schnee, N. Kawashima, L. Lan, J.K. Dewyngaert, D. Zagzag, W.H. McBride, and S.C. Formenti. 2006. The combination of ionizing radiation and peripheral vaccination produces long-term survival of mice bearing established invasive GL261 gliomas. *Clin. Cancer Res.* 12:4730–4737. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0593.

- Onishi, M., S. Kinoshita, Y. Morikawa, A. Shibuya, J. Phillips, L.L. Lanier, D.M. Gorman, G.P. Nolan, A. Miyajima, and T. Kitamura. 1996. Applications of retrovirus-mediated expression cloning. *Exp Hematol.* 24:324–329.
- Postow, M.A., M.K. Callahan, C.A. Barker, Y. Yamada, J. Yuan, S. Kitano, Z. Mu, T. Rasalan, M. Adamow, E. Ritter, C. Sedrak, A.A. Jungbluth, R. Chua, A.S. Yang, R.-A. Roman, S. Rosner, B. Benson, J.P. Allison, A.M. Lesokhin, S. Gnjatic, and J.D. Wolchok. 2012. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N. Engl. J. Med.* 366:925–931. doi:10.1056/NEJMoa1112824.
- Radl, J., J.W. Croese, C. Zurcher, M.H. Van den Enden-Vieveen, and A.M. de Leeuw. 1988. Animal model of human disease. Multiple myeloma. *The American Journal of Pathology.* 132:593.
- Reits, E.A., J.W. Hodge, C.A. Herberts, T.A. Groothuis, M. Chakraborty, E.K. Wansley, K. Camphausen, R.M. Luiten, A.H. de Ru, J. Neijssen, A. Griekspoor, E. Mesman, F.A. Verreck, H. Spits, J. Schlom, P. van Veelen, and J.J. Neefjes. 2006. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* 203:1259–1271. doi:10.1084/jem.20052494.
- Rosenberg, S.A., N.P. Restifo, J.C. Yang, R.A. Morgan, and M.E. Dudley. 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* 8:299–308. doi:10.1038/nrc2355.
- Singh, H., L.M. Serrano, T. Pfeiffer, S. Olivares, G. McNamara, D.D. Smith, Z. Al-Kadhimi, S.J. Forman, S.D. Gillies, M.C. Jensen, D. Colcher, A. Raubitschek, and L.J.N. Cooper. 2007. Combining adoptive cellular and immunocytokine therapies to improve treatment of B-lineage malignancy. *Cancer Res.* 67:2872–2880. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2283.
- Supiot, S., F. Thillays, E. Rio, M.A. Mahé, F.J. Barbet, F. Kraeber-Bodéré, and M. Chérel. 2007. [Alpha-radioimmunotherapy: a review of recent developments]. *Cancer Radiother.* 11:252–259. doi:10.1016/j.canrad.2007.05.001.
- Supiot, S., S. Gouard, J. Charrier, C. Apostolidis, J.-F. Chatal, J. Barbet, F. Davodeau, and M. Chérel. 2005. Mechanisms of cell sensitization to alpha radioimmunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. *Clin. Cancer Res.* 11:7047s–7052s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-1004-0021.
- Teshima, T., J.B. Owen, G.E. Hanks, S. Sato, H. Tsunemoto, and T. Inoue. 1996. A comparison of the structure of radiation oncology in the United States and Japan. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34:235–242. doi:10.1016/0360-3016(95)02046-2.
- Vacchelli, E., I. Vitale, E. Tartour, A. Eggermont, C. Sautès-Fridman, J. Galon, L. Zitvogel, G. Kroemer, and L. Galluzzi. 2013. Trial Watch: Anticancer radioimmunotherapy. *Oncoimmunology.* 2:e25595. doi:10.4161/onci.25595.
- Walter, R.B., O.W. Press, and J.M. Pagel. 2010. Pretargeted radioimmunotherapy for hematologic and other malignancies. *Cancer Biother. Radiopharm.* 25:125–142. doi:10.1089/cbr.2010.0759.

Yong, K.J., D.E. Milenic, K.E. Baidoo, and M.W. Brechbiel. 2013. Sensitization of tumor to ^{212}Pb radioimmunotherapy by gemcitabine involves initial abrogation of G2 arrest and blocked DNA damage repair by interference with Rad51. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 85:1119–1126. doi:10.1016/j.ijrobp.2012.09.015.

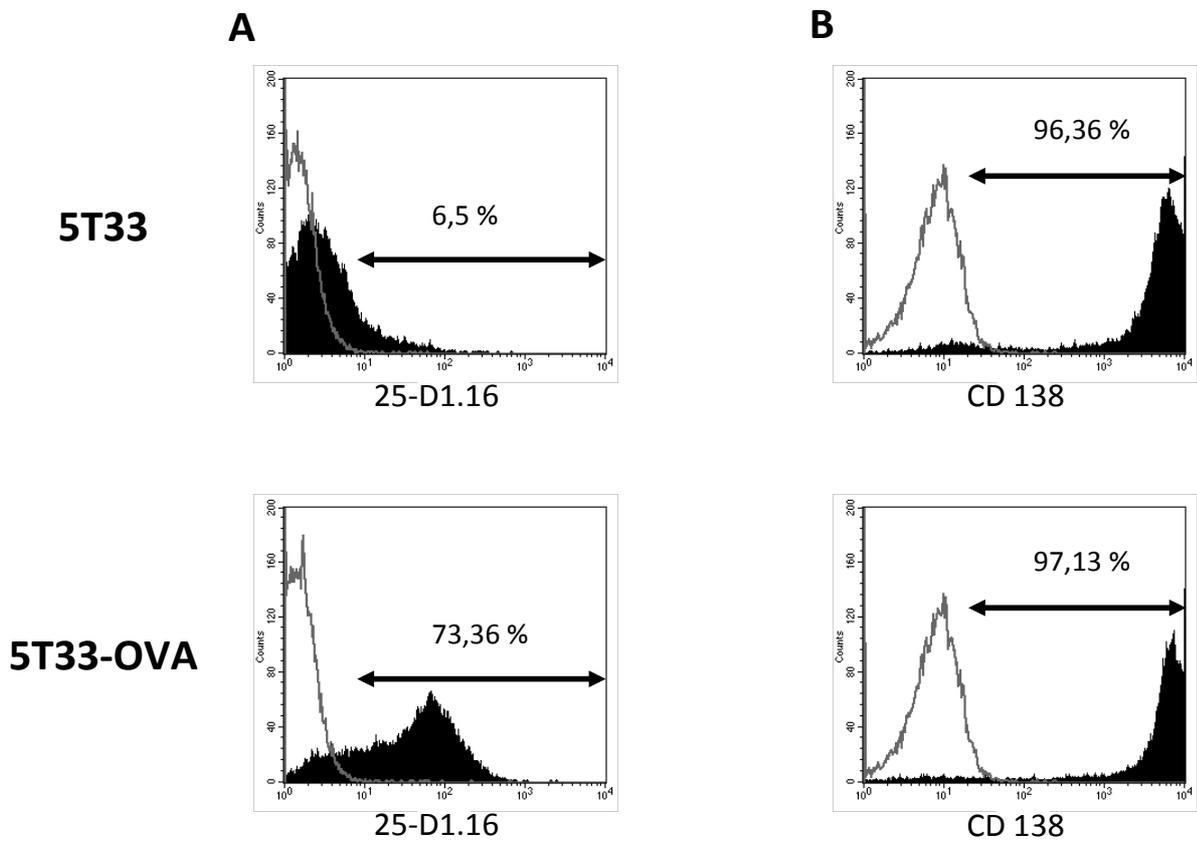


Figure 1 Ménager et al.

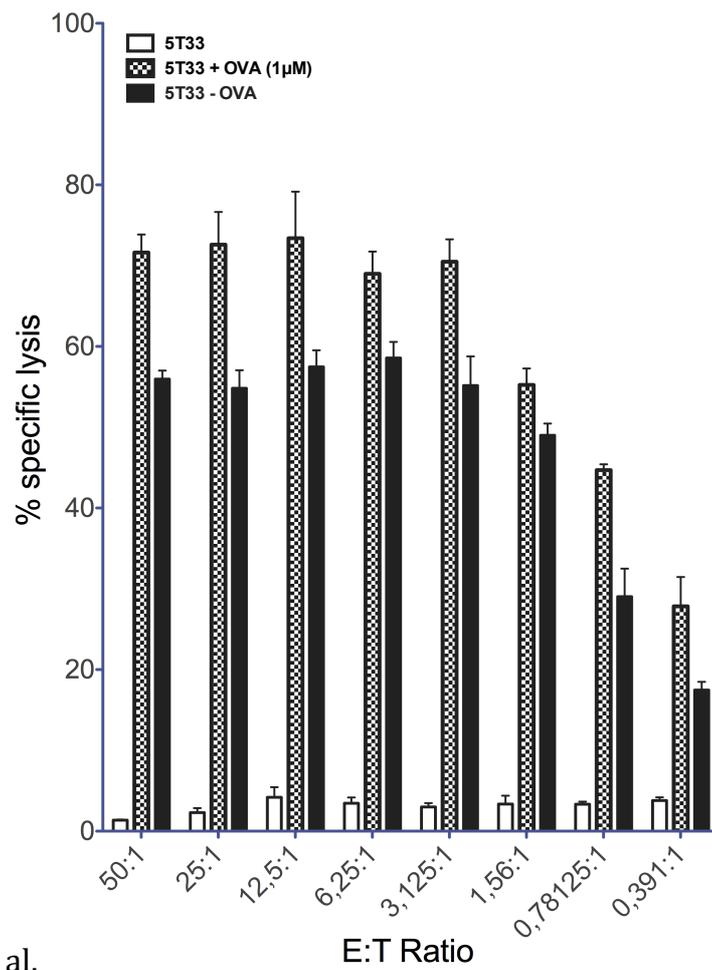


Figure 2 Ménager et al.

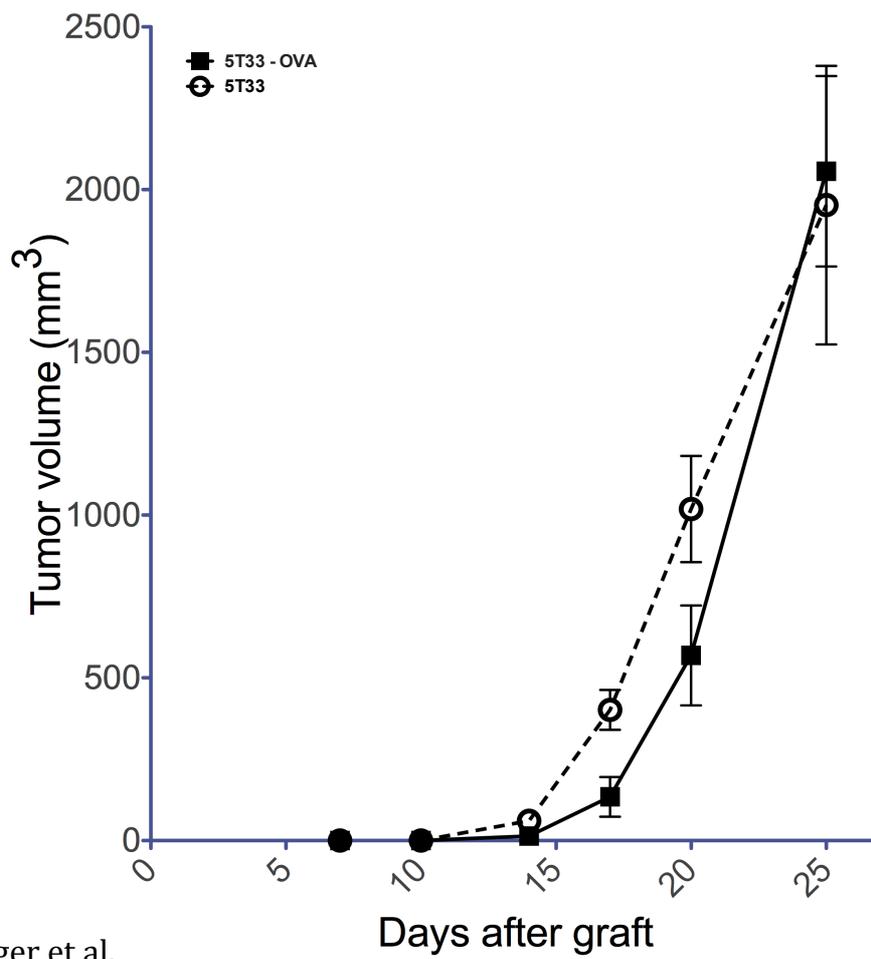


Figure 3 Ménager et al.

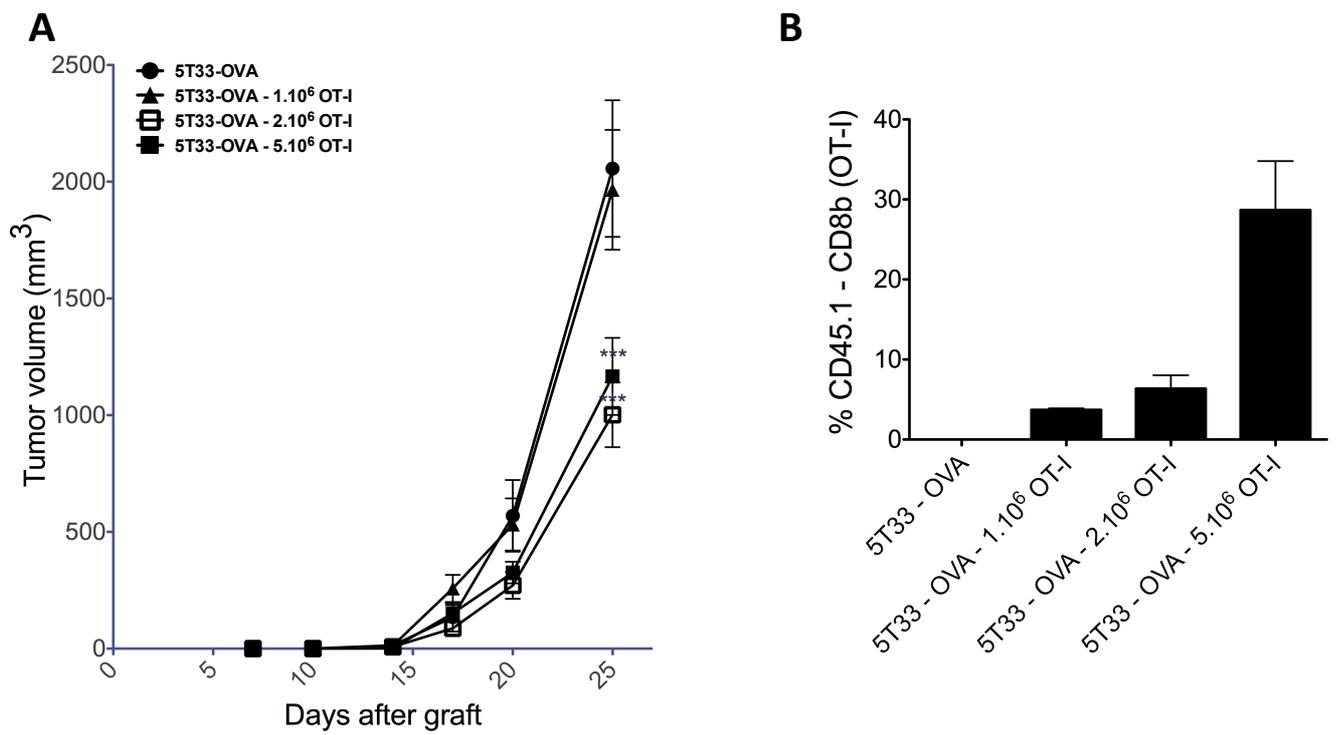


Figure 4 Ménager et al.

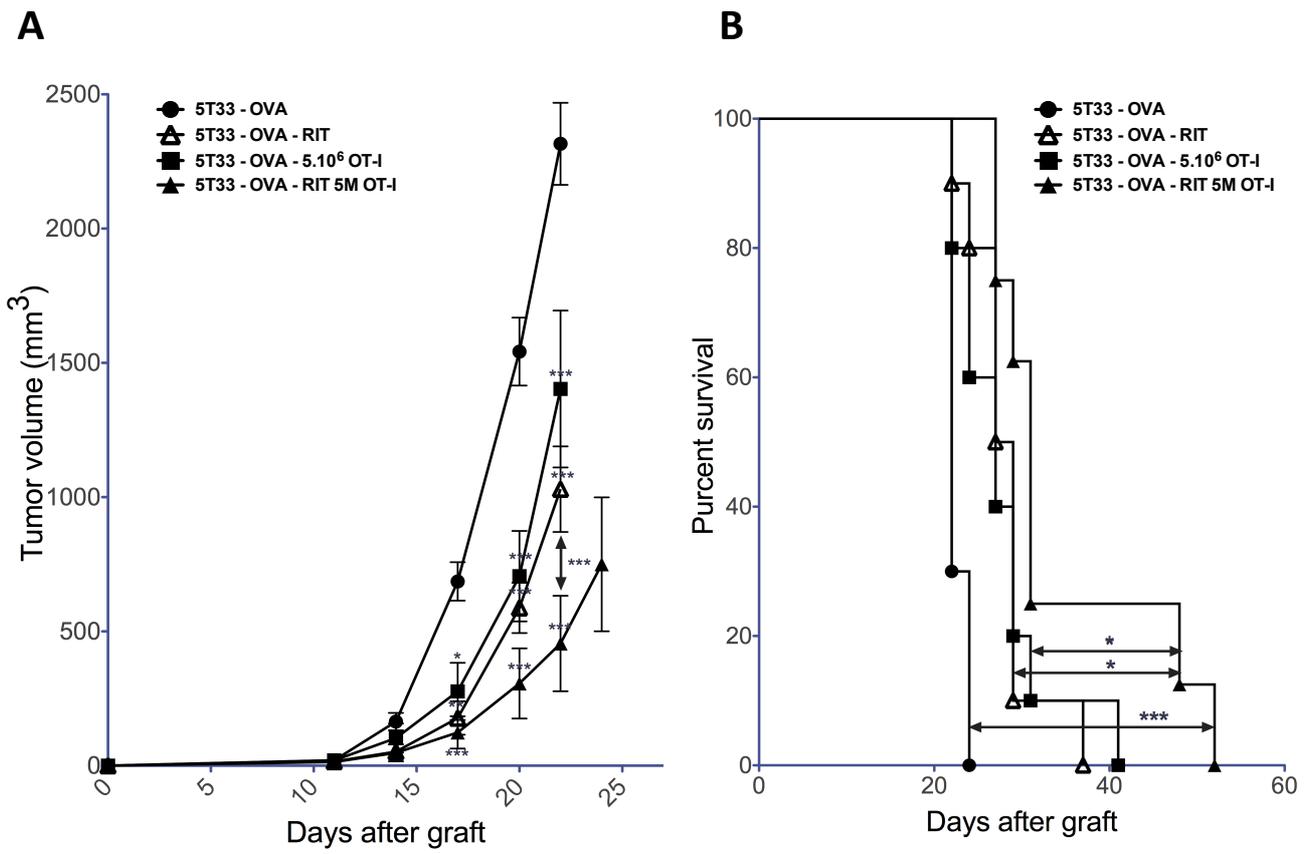


Figure 5 Ménager et al.

Legends

Figure 1: 5T33-OVA phenotypic analysis after transduction by a lentiviral vector encoding cytoplasmic ovalbumin A, 5T33 and 5T33-OVA staining with PE-conjugated antibody 25-D1.16, which specifically recognizes the OVA peptide ‘SIINFEKL’ bound to the MHC class I molecule H-2K^b and *B*, staining of 5T33 and 5T33-OVA with APC-conjugated anti-mouse CD138 mAb. Flow cytometry was performed on a BD FACSCalibur™ Flow Cytometry System.

Figure 2: *In vitro* recognition of 5T33-OVA. Cytotoxic T-cell-mediated lysis of 5T33-OVA targets. T cells isolated from OT-I mice were activated using irradiated splenocytes loading with OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFELK) peptide. *In vitro* T-cell-mediated cytotoxicity against 5T33-OVA was determined using a standard four-hour ⁵¹Cr release assay at several effector-to-target ratios (E: T Ratio).

Figure 3: *In vivo* proliferation of 5T33-OVA. Growth comparison of established tumors 5T33 versus 5T33-OVA. Animals were injected subcutaneous with 2.10⁶ tumor cells (n= 5 mice per group).

Figure 4: Adoptive OT-I T cells transfer. *A*, Dose response of 5T33-OVA tumor cells to adoptive transfer of OT-I T cells treatment. Animals were injected with 2.10⁶ tumor-cells in subcutaneous and received the indicated doses of OT-I (n= 10 mice per group), Tumor volume was determined by using a caliper. Data points represent mean ± SD of 10 measures. *** p<0,001 as determined by two-way ANOVA and Bonferonni post-tests. *B*, Tumors were explanted and single cell suspensions were prepared by grinding tumors in a tissu grinder. Cells were stained with monoclonal anti-CD8b PE and anti-CD45.1 FITC. Histograms represent the percentage of double-positive cells.

Figure 5: Combination of RIT with adoptive immunotherapy inhibits tumor growth and prolonged treated mice survival, Animals were injected with $2 \cdot 10^6$ tumor-cells in subcutaneous and received the indicated treatment (n= 10 mice per group). Tumor volume was measured. Data points represent mean \pm SD of 10 measures. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ as determined by two-way ANOVA and Bonferonni post-tests. *B*, Animals were injected with $2 \cdot 10^6$ tumor-cells in subcutaneous and received the indicated treatment (n=10 mice per group). The percentage of mice surviving was evaluated when tumor volume reach end-point of 2500 mm^3 . The combination of RIT + ACT significantly increased survival (median survival of 31 days; log-rank, 0.0001) when compared with control (n=10) or RIT alone (median survival of 28 days; log-rank, 0,0413) or the ACT transfer alone (median survival of 27 days; log-rank, 0,0391) cohorts. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney test.

B) Résultats complémentaires

1- Distribution des LT CD8⁺ OT-I

Afin de décrire plus précisément le rôle joué par les LT CD8⁺ OT-I injectés dans la régression tumorale suite à l'injection de la 5T33-OVA en s.c, nous nous sommes intéressés à leur distribution dans différents organes : la rate, les ganglions lymphatiques, le sang et la tumeur pour chaque traitement.

Lorsque la croissance tumorale des souris a atteint le point limite, les souris sont sacrifiées. Puis les cellules des différents organes sont extraites et analysées en cytométrie de flux (figure 32). Pour chacun de ces organes, les LT CD8⁺ OT-I ont pu être détectés lorsqu'ils avaient été injectés au préalable (conditions OT-I seuls et RIT α + OT-I). Ces LT CD8⁺ OT-I sont facilement détectables car ils expriment le marqueur congénique CD45.1 et sont injectés dans une souris qui exprime, quant à elle, le marqueur congénique CD45.2. Ainsi, un double marquage CD8-CD45.1 permet de les identifier spécifiquement en excluant les propres LT CD8⁺ (CD8⁺-CD45.2⁺) de la souris chez qui les LT CD8⁺ OT-I (CD8⁺-CD45.1⁺) sont injectés.

Dans l'article II, nous avons montré que l'ACT en i.v de 5.10⁶ LT CD8⁺ OT-I, 11 jours après la greffe des 5T33-OVA, induit une diminution de la prolifération tumorale. De plus, l'association de la RIT α et de l'ACT a permis une potentialisation de la destruction tumorale. Puisqu'en plus de fortement ralentir la progression tumorale, cette approche combinatoire augmente considérablement la médiane de survie des souris en comparaison des souris ayant reçues l'un ou l'autre des traitements. Comme le montre la figure 32, nous avons pu établir le tropisme de ces LT CD8⁺ OT-I pour chacun des organes analysés. En point limite, suite au traitement par l'ACT seul, les LT CD8⁺ OT-I injectés représentent 24% des LT CD8⁺ présents dans la tumeur contre 6% à l'issue de l'association thérapeutique.

De façon intéressante, on constate donc que l'efficacité de la réponse thérapeutique est inversement corrélée avec la quantité d'OT-I retrouvée dans chacun des organes étudiés. En effet, la réponse anti-tumorale étant plus efficace pour la combinaison thérapeutique RIT α + OT-I, moins de LT CD8⁺ OT-I sont détectés dans les souris traitées seulement avec les LT CD8⁺ OT-I.

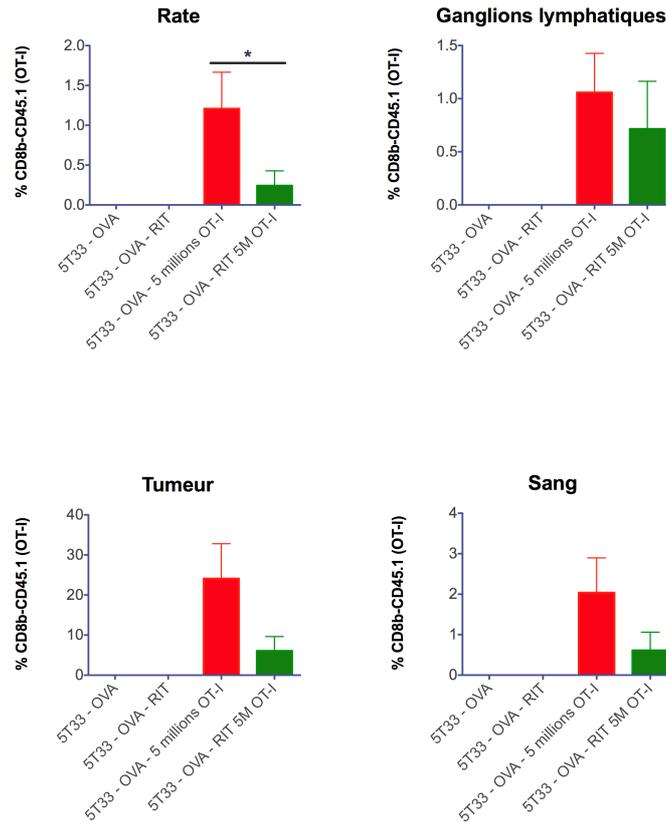


Figure 32 : Influence des différentes thérapies sur la distribution des OT-I.

Les suspensions cellulaires sont préparées à partir de la rate, des ganglions lymphatiques, de la tumeur et du sang. Les cellules sont marquées avec les anticorps anti-CD8b-PE et anti-CD45.1-FITC. Les histogrammes représentent les pourcentages de cellules doubles –positives. L’analyse statistique est réalisée en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney, chaque condition est comparée par rapport au groupe contrôle non traité.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats :

1) Tout d’abord, les souris RIT α + OT-I sont sacrifiées plus tardivement. Pendant ces quelques jours de survie supplémentaires par rapport aux souris recevant l’ACT seul, les LT CD8⁺ OT-I injectés vont mourir progressivement expliquant leur nombre moins élevé.

2) D’autre part, leur capacité à rejoindre, à reconnaître et à détruire la tumeur peuvent expliquer cette diminution des LT CD8⁺ OT-I. En effet, suite à la RIT α , le contexte inflammatoire et/ou immunitaire créé au niveau tumoral permet un meilleur tropisme des LT CD8⁺ OT-I. Dans ce modèle dynamique, ces LT CD8⁺ activés vont exercer leur activité anti-tumorale en plus grand nombre et plus efficacement que dans la condition où les LT CD8⁺ OT-I sont injectés seuls. De plus, cette destruction plus importante de la tumeur peut permettre le relargage de nombreuses molécules (DAMP, cytokines pro-inflammatoires...) favorisant le recrutement de ces effecteurs T à la tumeur. Les LT CD8⁺ OT-I générés *in vitro*

sont des effecteurs très puissants (cf. figure 2, article II) et sont susceptibles d'être sensibles à l'AICD (Brenner et al., 2008). L'AICD (Activation Induced Cell Death) consiste en l'induction de la mort par apoptose des LT déjà activés, par une seconde stimulation de leur TCR. Dans notre modèle *in vivo*, ces CTL injectés peuvent être restimulés par des CPA ou les cellules tumorales 5T33-OVA. Cette seconde stimulation augmente l'expression de Fas par les LT et les rend ainsi susceptibles à l'apoptose (Brenner et al., 2008). Le recrutement à la tumeur et l'AICD peuvent expliquer que, suite à l'association thérapeutique, un nombre moins important de LT CD8⁺ OT-I sont retrouvés dans l'ensemble des organes étudiés par rapport à l'ACT seul.

3) Enfin, une autre explication pourrait être l'épuisement des fonctions effectrices des LT CD8⁺ OT-I injectés seuls (Wherry, 2011). Cet épuisement est induit par l'environnement immunosuppresseur de la tumeur (expression de molécules PD-L1, Fas-L, de cytokines immunosuppressives ou la présence de LTreg).

La thérapie par l'ACT seul peut induire une immunosuppression tumorale plus importante. Ainsi, les LT CD8⁺ OT-I injectés qui arrivent au niveau de la tumeur sont dans l'incapacité de la reconnaître et s'accumulent dans les différents organes sans pouvoir être efficaces. En revanche, la thérapie combinée RITα + OT-I créant un contexte inflammatoire plus favorable empêche l'induction de cette immunosuppression.

Pour étayer ces hypothèses, nous nous sommes ensuite intéressés à l'environnement immunitaire des tumeurs pour chacun des traitements. Le but étant également d'étudier les conséquences immunologiques des différents traitements sur la tumeur.

2- Etude du microenvironnement tumoral

Comme précédemment, lorsque les tumeurs atteignent le point limite, le sacrifice des souris est effectué. Puis, les tumeurs sont prélevées, les cellules sont extraites puis marquées par différents anticorps afin de réaliser une étude phénotypique.

Les marquages effectués sont les suivants : le CD3 pour les LT totaux, CD3-CD8 pour les LT CD8⁺, CD3-CD4 pour les LT CD4⁺, CD3-CD4-Foxp3 pour les LTreg, CD11c pour les DC, NK1.1 pour les NK et CD19 pour les LB.

Concernant l'analyse des LT infiltrant la tumeur, la figure 33 ne montre pas de différence significative pour les pourcentages de LT totaux et ce quel que soit le type de traitement. En revanche, le pourcentage de LT CD8⁺ est plus important pour les souris ayant reçues le transfert adoptif seul, en accord avec le grand nombre de LT CD8⁺ OT-I détectés précédemment. De plus, le pourcentage de LT CD4⁺ est plus important pour les souris ayant reçues la RIT α seule. Cela n'est pas retrouvé pour la condition RIT α + OT-I, cela peut s'expliquer par le fait que les LT CD8⁺ OT-I atteignent la tumeur, ce qui élève le pourcentage des LT CD8⁺ totaux et par la même occasion masque l'augmentation du pourcentage des LT CD4⁺ dans cette condition RIT α + OT-I.

Pour finir, un pourcentage important de LTreg est retrouvé dans les tumeurs des souris recevant le transfert adoptif uniquement. Cela suggère une amplification de l'environnement tumoral immunosuppresseur avec ce type de traitement qui n'est pas retrouvé pour la condition RIT α + OT-I.

L'analyse des cellules NK, impliquées dans l'immunité innée (figure 34) montre être légèrement augmentée pour la condition RIT α + OT-I sans que celle-ci soit statistiquement significative. Il en est de même pour les DC, impliquées dans l'immunité adaptative et la mise en place d'une immunité anti-tumorale dépendante des LT. En revanche, aucune différence n'est détectée pour les recrutements des LB quelle que soit la condition.

De façon concordante avec les diminutions de prolifération tumorales observées, il semble que la RIT α , en plus de générer une destruction tumorale, module, dans l'environnement de la tumeur, un contexte favorable à l'action des LT CD8⁺ OT-I injectés par la suite. En effet, le recrutement des LT CD4⁺ provoqué suite à la RIT α pourrait permettre de

potentialiser leur action, différents travaux confèrent aux LT CD4⁺ un rôle essentiel pour permettre la persistance et le maintien de la réponse immunitaire de ces LT CD8⁺ anti-tumoraux (Matloubian et al., 1994; Yee et al., 1997). Contrairement à l'association RIT α + OT-I, l'ACT seul induit une augmentation significative du pourcentage de LTreg au niveau tumoral par rapport au groupe contrôle. Cette population immunosuppressive peut inhiber les fonctions effectrices des LT CD8⁺ OT-I retrouvés dans la tumeur (Wherry, 2011).

Enfin, l'analyse d'autres populations du système immunitaire a montré le recrutement de NK et de DC plus important même si une différence statistique significative n'est pas démontrée. Il est donc envisageable que la RIT α et le transfert adoptif des LT CD8⁺ OT-I puissent potentialiser la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale aussi bien innée que adaptative.

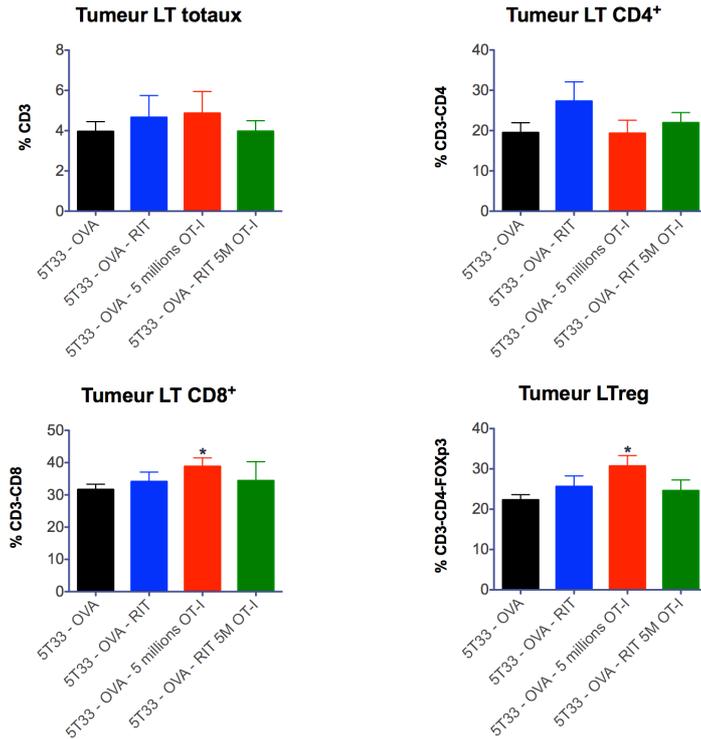


Figure 33 : Influence des différentes thérapies sur la distribution des LT.

Les suspensions cellulaires sont préparées à partir de la tumeur récupérée des souris pour les différents groupes (n = 10 souris par groupe). Les cellules sont marquées avec les anticorps anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4 et anti-foxp3. Les histogrammes représentent les pourcentages de cellules doubles ou triples –positives. L’analyse statistique est réalisée en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney, chaque condition est comparée par rapport au groupe contrôle non traité.

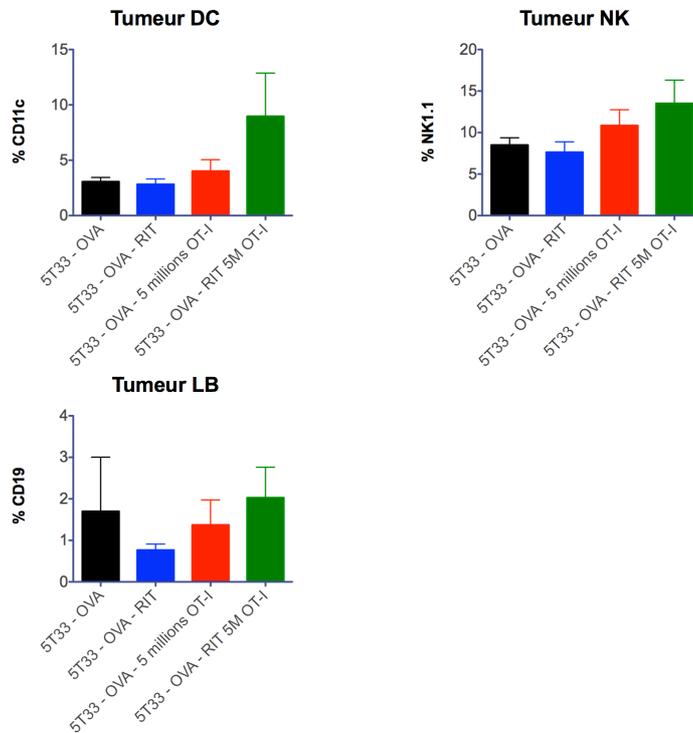


Figure 34 : Influence des différentes thérapies sur la distribution des DC, NK et LB.

Les suspensions cellulaires sont préparées à partir de la tumeur récupérée des souris pour les différents groupes (n = 10 souris par groupe). Les cellules sont marquées avec les anticorps anti-CD11c, anti-NK1.1 et anti-CD19. Les histogrammes représentent les pourcentages de cellules positives pour les différents anticorps. L’analyse statistique est réalisée en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney, chaque condition est comparée par rapport au groupe contrôle non traité.

Le premier objectif de cette deuxième partie était de pouvoir mettre en place un modèle *in vivo* combinant la RIT α et une stratégie d'immunothérapie passive par l'ACT de LT spécifiques de la tumeur greffée en s.c.

Néanmoins la prolifération très rapide de la tumeur injectée en s.c rend difficile son contrôle et une immunité anti-tumorale efficace par les traitements effectués. De plus, la RIT α étant plus adaptée dans le traitement de la maladie disséminée, il est tout à fait indiqué d'étudier cette association thérapeutique dans le cadre du modèle orthotopique de ce MM murin où la lignée 5T33-OVA sera injectée en i.v et non en s.c, mimant ainsi la pathologie du MM (figure 35).

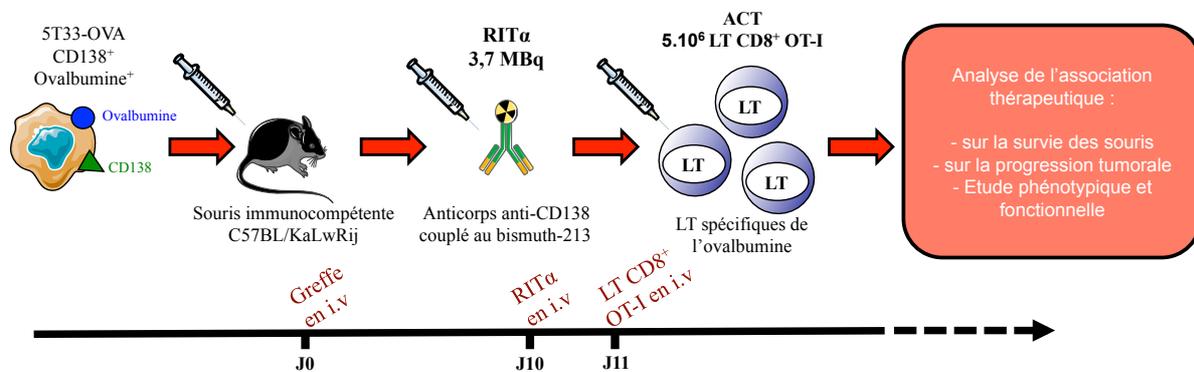


Figure 35 : Schéma de l'association thérapeutique (5T33-OVA en i.v)

Pour cela, les objectifs de la partie suivante sont 1) Evaluer l'efficacité thérapeutique de la RIT α et de l'ACT des LT CD8⁺ OT-I dans ce modèle syngénique et immunocompétent de MM engendrant la paralysie de l'animal non traité. 2) Etudier l'efficacité des LT CD8⁺ OT-I injectés lorsqu'ils sont donnés seuls ou en association à la RIT α . 3) Caractériser les populations du système immunitaire impliquées et les cytokines sécrétées. 4) Déterminer la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

C) Article III : Adoptive T cell therapy potentiates efficacy of alpha-radioimmunotherapy

Résultats préliminaires

Remarque préliminaire : Ce travail est toujours en cours, il sera donc présenté sous une forme proche d'un article mais en français.

Résumé

Plusieurs études ont montré que la radiothérapie externe est capable d'induire une régression de la progression tumorale par la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative anti-tumorale dépendante des lymphocytes T (LT). Ce rôle prépondérant des LT est renforcé par le fait que la radiothérapie d'une tumeur suivie d'un transfert adoptif (ACT) de lymphocytes T spécifiques de la tumeur induisait une puissante diminution de la prolifération tumorale. Le myélome multiple est une hémopathie maligne touchant les plasmocytes et se localisant dans la moelle osseuse. Cette maladie reste incurable et n'est pas traitable par radiothérapie externe. Toutefois de nouvelles stratégies thérapeutiques ont vu le jour et nous avons évalué l'association de la radioimmunothérapie alpha (RIT α), une stratégie de radiothérapie vectorisée avec l'ACT de lymphocytes T spécifiques du myélome multiple (MM). Cette association thérapeutique est réalisée chez la souris immunocompétente C57BL6/KalwRij après l'injection en intraveineuse (i.v) de cellules syngéniques de MM 5T33-OVA exprimant le CD138 et l'ovalbumine. La RIT α est réalisée par l'injection d'un anticorps anti-CD138 couplé au bismuth-213 et l'ACT par l'injection de LT CD8⁺ spécifiques de l'ovalbumine (LT CD8⁺ OT-I). Les résultats obtenus mettent en évidence le bénéfice de l'association thérapeutique puisque la médiane de survie des animaux ayant été traités par la combinaison RIT α et ACT est significativement augmentée par rapport aux groupes ayant reçu uniquement l'un ou l'autre des traitements. De plus, le suivi des LT CD8⁺ OT-I injectés montre que ceux-ci migrent, persistent et sont plus fonctionnels suite à leur administration après la RIT α . L'ensemble de ces résultats établit la pertinence d'associer la RIT α et l'ACT de LT spécifiques de tumeur pour traiter une maladie disséminée comme le MM.

Introduction

Le myélome multiple (MM), ou maladie de Kahler, est un cancer touchant certaines cellules spécifique du sang, les plasmocytes. Les plasmocytes sont des LB effecteurs différenciés au niveau des centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires, et que l'on trouve par la suite localisés dans les organes lymphoïdes périphériques ou dans la moelle osseuse. En situation normale, les plasmocytes jouent un rôle important dans le système immunitaire car ces cellules produisent des anticorps qui vont permettre de combattre un grand nombre d'infections et de maladies. Dans le MM, les plasmocytes tumoraux sont généralement monoclonaux et prolifèrent dans la moelle osseuse. Ces cellules vont sécréter une immunoglobuline monoclonale (appelée paraprotéine ou protéine-M). Ce cancer disséminé a un développement rapide et se trouve être particulièrement invalidant. Cette hémopathie maligne représente environ 1% des cancers et 13% des cancers hématologiques. Dans les pays occidentaux, l'incidence annuelle est estimée à 5,6 cas pour 100 000 personnes (Altekruse et al., 2010). Au niveau clinique, le MM est caractérisé par la prolifération clonale de ces plasmocytes tumoraux dans le microenvironnement de la moelle osseuse. Le plus souvent, la présence en quantité importante d'immunoglobulines monoclonales dans le sang (majoritairement IgG ou IgA) et/ou de chaînes légères dans les urines (protéinurie de Bence Jones, le type κ étant deux fois plus fréquent que le λ) sont détectées. Les patients atteints de MM peuvent développer une insuffisance rénale, des lésions du squelette avec ou sans hypercalcémie, une diminution de la sécrétion d'immunoglobulines par les plasmocytes normaux, une déficience de l'hématopoïèse et des infections bactériennes récurrentes (Kyle and Rajkumar, 2004). Les symptômes cliniques les plus fréquents sont la fatigue, des douleurs osseuses pouvant aller à des fractures pathologiques spontanées.

La médiane de survie des patients atteints de MM était de moins d'un an avant l'introduction des traitements utilisant des agents alkylants dont le melphalan dans les années 1960. Ces agents qui empêchent la séparation et la réplication de l'ADN, inhibant ainsi la multiplication cellulaire, ont permis d'améliorer la survie de ces patients (Kumar et al., 2008). Dans les années 1980, le traitement par la chimiothérapie à haute dose et la transplantation de cellules souches (ASCT : Autologous Stem Cell Transplantation) ont été réalisés. Les essais randomisés ont démontré depuis un avantage de survie pour cette modalité de traitement par rapport à la chimiothérapie conventionnelle (McElwain and Powles, 1983; Attal et al., 1996; Child et al., 2003). L'introduction du thalidomide, lenalidomide et du bortézomib a élargi l'arsenal thérapeutique dans le traitement du MM. Ces nouvelles approches ont permis

d'augmenter le taux de réponses complètes associées à une augmentation de la survie (Singhal et al., 1999; Rajkumar et al., 2005; 2006; Richardson et al., 2005). Néanmoins, la maladie peut développer une résistance face à ces traitements et la majorité des patients atteints de MM rechutent avec généralement une espérance de vie relativement courte (Durie, 2010).

Les échecs dans le traitement du MM peuvent être attribués à la persistance des cellules tumorales. La RIT peut permettre le ciblage de ces cellules tumorales résiduelles et disséminées, et en particulier la RIT utilisant des radionucléides émetteurs de particules α . En effet, contrairement aux particules β^- (électrons), les particules α sont des noyaux d'hélium et sont environ 8000 fois plus gros que les particules β^- . Lorsqu'ils sont émis suite à la décroissance du radionucléide, ils libèrent d'énormes quantités d'énergie sur une très courte distance. Typiquement, le trajet des α dans les tissus est de l'ordre de 50 à 100 μm avec un transfert d'énergie linéique élevé (TEL) correspondant à un dépôt d'énergie moyen de 100 keV/ μm , ce qui leur fournit la capacité de détruire plus spécifiquement les cellules tumorales sans endommager les tissus sains environnants. Ainsi, les caractéristiques des particules α font qu'un faible nombre de ces particules sont nécessaires pour détruire des cellules tumorales, la mort cellulaire se produit suite à la traversée du noyau de la cellule par une ou simplement quelques particules α (Nikula et al., 1999; Chouin et al., 2009). Cela est en partie dû à l'incapacité de ces cellules à réparer des cassures double-brin potentielles de l'ADN et à l'absence de l'influence de l'oxygène sur la cytotoxicité par ces particules (Zalutsky and Bigner, 1996; Kim and Brechbiel, 2012). Grâce à ces propriétés, la majorité des essais précliniques et cliniques ont montré que les émetteurs α comme le bismuth-213 sont parfaitement adaptés pour le traitement des petites masses tumorales, des maladies micrométastatiques, et des maladies disséminées (Kim and Brechbiel, 2012).

La majorité des cellules de MM expriment en surface la molécule CD138 ou syndecan-1. Une étude a montré par dosimétrie, la faisabilité de la RIT par l'utilisation d'un anticorps anti-CD138 (B-B4). En effet, chez des patients atteints de MM, suite à l'injection du B-B4 couplé à l'iode-131, les images en immunoscintigraphie ont montré une haute absorption à la moelle osseuse. Ceci reflétant le ciblage des cellules MM par l'anticorps monoclonal radiomarqué (Rousseau et al., 2012). De plus, La RIT α du MM a été validée, *in vitro*, par l'utilisation de cet anticorps B-B4 couplé au bismuth-213 sur des lignées de MM humaines (Couturier et al., 1999). Enfin, une étude plus récente a évalué la toxicité et l'efficacité d'un anticorps de rat anti-CD138 murin couplé au bismuth-213 dans un modèle de

MM murin, les 5T33, injectées dans des souris syngéniques C57BL6/KaLwRij. Par l'injection d'une activité d'anticorps marqué de 3,7 MBq, une légère et réversible toxicité hématologique a été observée, associée à une augmentation de la survie à long terme et des animaux définitivement soignés de la pathologie (Chérel et al., 2013).

Les radiations ionisantes sont capables d'induire des effets anti-tumoraux puissants, de plus, des études montrent que le système immunitaire de l'hôte peut contribuer au développement de réponses anti-tumorales induites par cette irradiation (Formenti and Demaria, 2013; Demaria and Formenti, 2012; Formenti and Demaria, 2009; Vacchelli et al., 2013). Ces résultats ont suggéré que l'augmentation de l'efficacité thérapeutique peut être obtenue en combinant la radiothérapie externe (RT) avec des stratégies d'immunothérapie stimulant l'activation et l'amplitude des réponses immunitaires anti-tumorales de l'hôte comme le transfert adoptif de LT spécifiques de tumeurs (ACT) (Reits et al., 2006; Chakraborty et al., 2003 article II).

Dans cette étude, nous avons donc utilisé un modèle orthotopique de souris syngénique et immunocompétent de MM afin de déterminer si une thérapie combinée utilisant la RIT α et l'ACT peut augmenter les effets anti-tumoraux dans cette maladie disséminée : le MM.

Matériel et méthodes

Lignées cellulaires

La lignée de myélome multiple murine 5T33 dérivée de la souris C57BL6/KalwRij, établie par le Dr. J Radl du TNO Institute (Radl et al., 1988), fut obtenue auprès du Dr. H Turner (Department of Nuclear Medicine, Fremantle Hospital, Australie) et la lignée de lymphome murin EL-4 provient de l'American Type Culture Collection (ATCC®-TIB-39™). La 5T33-OVA a été produite à par modification de la 5T33 (article II). Les 3 lignées sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (PAA), 2 mM de glutamine (Gibco), 100 U/mL de pénicilline (Gibco) et 100 µg/mL de streptomycine (Gibco). Toutes les cultures cellulaires sont réalisées dans un incubateur à 37°C avec une pression partielle en CO₂ de 5%. Toutes les manipulations de culture sont faites en conditions stériles.

Animaux

Les souris femelles C57BL6/KaLwRij, pesant de 20 à 30 grammes et âgées de 8 à 10 semaines, sont achetées chez le fournisseur Harlan® (Horst, Pays-Bas). Les souris sont hébergées dans l'animalerie UTE (SFR François Bonamy, IRS-UN, Université de Nantes, France) structure certifiée par les services vétérinaires (numéro de licence : B-44-278), dans les conditions standard. Les expériences animales réalisées dans cette étude ont été validées par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale des Pays-de-Loire (protocole N°CEEA.2013.2).

Les souris femelles C57BL6-CD8⁺ spécifiques de H₂K^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄ (OT-I) CD45.1⁺ proviennent à l'origine du laboratoire Jackson (Bar Harbor, ME, USA) et sont hébergées sous les conditions standard, à l'animalerie de l'INSERM UMR 1064 (Université de Nantes, France). Ces souris sont croisées pendant au moins 5 générations avec des souris C57BL6 RAG^{-/-}.

Modèle de greffe tumoral 5T33-OVA

Les souris femelles C57BL6/KaLwRij sont injectées en i.v dans la veine de la queue avec 1.10⁶ 5T33-OVA reprises dans un volume total de 100µL de PBS stérile. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale suite à la paralysie de l'animal ou en point limite (perte de

poids des souris supérieure à 20%) puis les différents organes ou échantillons sont prélevés (sang, ganglions lymphatiques et rate).

Radiomarquage de l'anticorps et traitement par la RIT α

Cf. matériel et méthode de l'article II

Génération des OT-I et (ACT)

La rate et les ganglions lymphatiques des souris femelles C57BL6-CD8⁺ spécifiques H₂K^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄ sont extraits stérilement et les cellules sont dissociées avec un tamis cellulaire 70 μ m (BD Falcon). Les LT CD8⁺ OT-I sont ensuite purifiés grâce au Kit CD8a⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Allemagne) selon le protocole du fournisseur. L'efficacité de la purification est contrôlée par cytométrie de flux ; la suspension cellulaire résultante contient généralement plus de 80% de LT CD8⁺ OT-I CD45.1⁺.

La stimulation des LT CD8⁺ OT-I est réalisée par co-culture de 1.10⁶ OT-I purifiés avec des cellules de rate provenant d'une souris syngénique en DMEM (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (PAA), 5U/mL d'IL-2, et 20ng/ml d'IL-12 murine. A J3, les cultures sont divisées en 4 fractions puis réensemencées avec du milieu frais contenant de l'IL-2. A J6, les cellules sont récupérées et lavées en DMEM au moins 3 fois. Les OT-I activés sont ensuite utilisés pour l'ACT et 5.10⁶ OT-I, repris dans un volume total de 100 μ L de PBS stérile, sont injectés en i.v 11 jours après la greffe des 5T33-OVA.

Marquages membranaires et intracellulaires

Tous les anticorps utilisés proviennent d'ebioscience (ebioscience, Paris, France).

Marquage membranaire

Les cellules sontensemencées en plaque 96 puits fond rond. Après centrifugation, les culots cellulaires sont repris dans 50 μ L par puits d'une solution contenant le ou les anticorps d'intérêt dilués dans du PBS 0,1% BSA pendant 45 minutes à 4°C et à l'obscurité. À l'issue du marquage, les cellules sont fixées par 50 μ L de PBS - paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) par puits pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont enfin lavées 2 fois en PBS 0,1% BSA avant d'être reprises dans du PBS pour pouvoir être analysées au cytomètre de flux (FACSCanto et FACSCalibur, BD Biosciences).

Marquage intracellulaire

Après le marquage membranaire et la fixation au PFA 4%, les culots cellulaires sont lavés dans du PBS 0,1% BSA - 0,1% saponine. Les cellules sont ensuite incubées avec 50 μ L

d'anticorps dilué dans du PBS 0,1% BSA - 0,1% saponine durant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Enfin les cellules sont lavées 2 fois avec la solution de PBS 0,1% BSA - 0,1% saponine et les culots cellulaires sont repris dans du PBS pour analyse au cytomètre de flux (FACSCanto et FACSCalibur, BD Biosciences).

Dans le but d'exclure les débris cellulaires, les cellules sont d'abord analysées en fonction de leur taille (FSC) et de leur granulosité relative (SSC). Les cellules sélectionnées sont ensuite étudiées en fluorescence en commençant par les témoins négatifs afin d'exclure le bruit de fond correspondant à de la fluorescence aspécifique.

Les résultats obtenus sont analysés avec le logiciel CellQuest Pro ou Diva (BD Biosciences)

Test d'activation lymphocytaire

La rate et les ganglions lymphatiques des souris traitées par les différentes stratégies sont extraits stérilement et les cellules sont récupérées par dissociation mécanique des organes sur un tamis cellulaire 70 μm (BD Falcon). Les LT CD8⁺ sont ensuite purifiés grâce au Kit CD8a⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Allemagne) selon le protocole du fournisseur.

Les LT CD8⁺ purifiés sont comptés et repris dans du milieu contenant de la Bréfeldine A (BFA) à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Puis dans les plaques 96 puits contenant les lignées tumorales 5T33, 5T33-OVA ou EL-4, 100.000 LT CD8⁺ sont distribués par puits. Les LT CD8⁺ sont incubés pendant 6 heures à 37°C avec les différentes lignées tumorales au ratio 1:2 (100.000 LT CD8⁺ pour 200.000 tumorales).

Afin de caractériser les LT CD8⁺ réactifs parmi les cellules tumorales, un marquage intracellulaire de l'IFN- γ couplé à un marquage membranaire CD8⁺ et CD45.1 est réalisé puis analysé en cytométrie de flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

Quantification des cytokines

Les cytokines sont dosées par la technique du flowcytomixTM (ebioscience, Paris, France) des sérums des souris. Ce test à base de billes reconnaissant différentes cytokines permet leur quantification par cytométrie de flux (FACSCanto, BD biosciences) suite à l'analyse par le logiciel fournisseur. La quantification des cytokines murines IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF et IL-1 β est réalisée selon le protocole du fournisseur.

Analyses statistiques

Les analyses de survie sont réalisées selon la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test du log-rank. La comparaison des variables quantitatives est effectuée par un test de Student non apparié bilatéral. Les valeurs de $p < 0.05$ sont considérées comme significatives.

Pour les OT-I, la sécrétion d'IFN- γ et les cytokines, les différences observées entre les conditions testées sont analysées en utilisant le test non paramétrique de Mann Whitney (comparaison de 2 moyennes de 2 conditions différentes avec un nombre d'échantillon inférieur à 30). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA).

Résultats

La RIT α combinée avec l'ACT de lymphocytes T spécifiques de tumeur (ACT) augmentent les réponses anti-tumorales contre le myélome multiple (MM)

Des travaux récents ont suggéré que les réponses immunitaires de l'hôte jouaient un rôle important dans l'effet anti-tumoral généré par les irradiations (Chakraborty et al., 2003; Reits et al., 2006; Demaria et al., 2004; Formenti and Demaria, 2013) et notamment les irradiations α (Gorin et al., 2014; Keisari et al., 2014). Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation de la RIT α en combinaison avec l'ACT pouvait induire une augmentation des effets anti-tumoraux. Nous étudions cette approche combinatoire contre la lignée de MM murine transduite avec l'ovalbumine, la 5T33-OVA injectée en i.v dans la souris C57BL6/KalwRij. Ce modèle nous permet de tester l'efficacité anti-tumorale du traitement pour cette maladie disséminée. Dans cette expérience, le ciblage de la 5T33-OVA s'effectue en RIT α par l'administration en i.v, 10 jours après la greffe d'une activité de 3,7 MBq d'anticorps anti-CD138 (environ 4 μ g) couplé au bismuth-213 (Chérel et al., 2013). De par la courte demi-vie du bismuth-213 (45,6 min), aucune trace de radioactivité n'est détectée chez la souris 24 heures après la RIT α . Ainsi un jour après la RIT α , l'ACT est réalisé par l'injection, toujours en i.v, de $5 \cdot 10^6$ LT CD8⁺ OT-I reconnaissant spécifiquement le complexe CMH-peptide, H₂K^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄, exprimé par la 5T33-OVA (Article II).

L'administration en systémique de l'anticorps anti-CD138 froid seul (3 μ g) n'a aucun effet thérapeutique sur la survie des souris myélomateuses avec une médiane de survie atteinte de 51 jours par rapport aux témoins non traités atteignant une médiane de survie de 52 jours (figure 36). De plus, l'administration des LT CD8⁺ OT-I seuls n'est pas capable d'améliorer significativement la survie des souris avec une médiane de survie de 60,5 jours (figure 36). En revanche le traitement par la RIT α seule induit une augmentation significative de la médiane de survie (70 jours) par rapport aux traitements précédents, associé à un taux de survie sans rechute de 21 % à 200 jours. Enfin, les souris traitées avec la thérapie combinée entraîne une augmentation de la médiane de survie (101,5 jours) par rapport à l'un ou l'autre des traitements seuls (figure 36) Cette combinaison thérapeutique permet également d'atteindre un taux de survie sans rechute de 43 % à 200 jours. Ces résultats suggèrent que le traitement combinant la RIT α et l'ACT de LT CD8⁺ OT-I est efficace dans le traitement du

MM mais également que la RIT α potentialise les effets anti-tumoraux des LT CD8⁺ OT-I qui ne sont pas suffisamment efficaces lorsqu'ils sont injectés seuls.

L'ensemble de ces données montre pour la première fois que l'association thérapeutique de la RIT α et de l'ACT de LT spécifiques de tumeur améliore significativement la survie et les effets anti-tumoraux contre une maladie disséminée comme le MM chez des souris syngéniques et immunocompétentes.

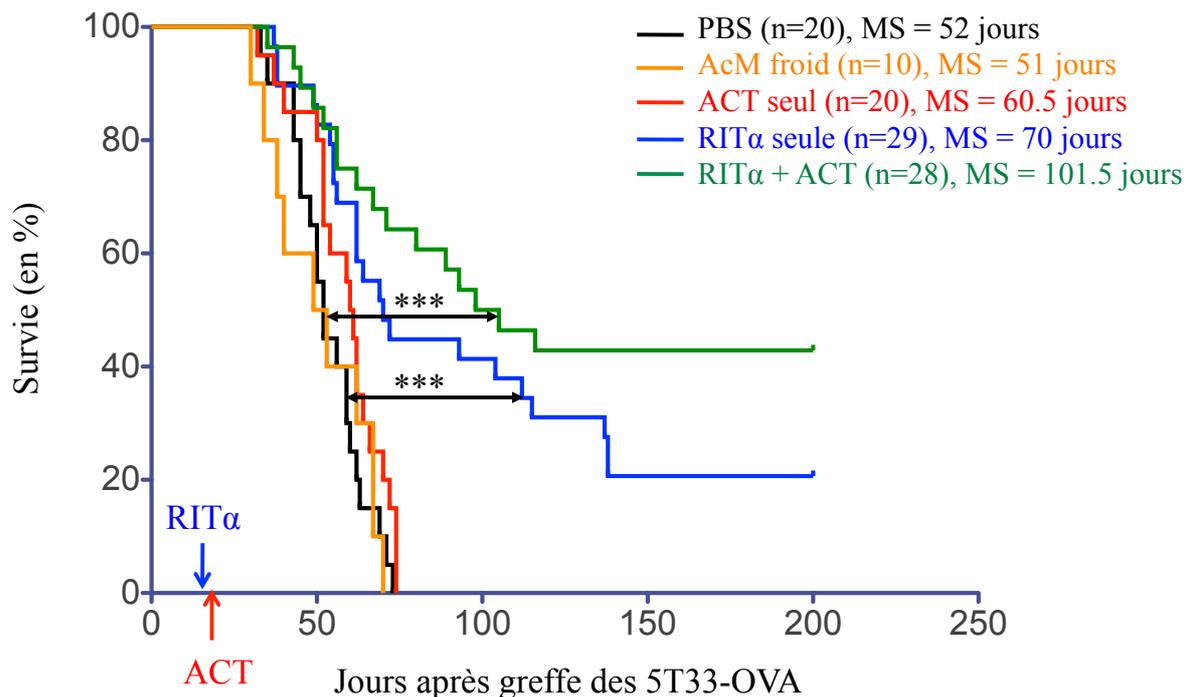


Figure 36 : L'association de la RIT α et de l'ACT d'OT-I augmente la survie des souris greffées avec la 5T33-OVA.

Les groupes de souris C57BL6/KalwRij (n = 10-29 souris par groupe) sont injectés en I.V avec 1.10^6 5T33-OVA syngéniques. Les souris sont traitées par l'injection en I.V soit de $100\mu\text{Ci}$ d'anticorps anti-CD138 couplé au bismuth-213 ou de $5\mu\text{g}$ d'anticorps anti-CD138 froid 10 jours après la greffe, soit de 5.10^6 OT-I 11 jours après la greffe ou par la combinaison de la de la RIT α et de l'ACT d'OT-I. Les résultats sont représentés en pourcentage de survie. Les données de 3 expériences combinées sont montrées (**, $p < 0,0001$). RIT α vs ACT : **, $p = 0,0024$; RIT α +ACT vs ACT : ***, $p < 0,0001$ et RIT α +ACT vs RIT α : $p = 0.0702$

Les effets anti-tumoraux sont corrélés avec une meilleure persistance, une migration plus importante et une meilleure capacité de reconnaissance des LT CD8⁺ OT-I suite à la combinaison thérapeutique

Pour mieux comprendre les mécanismes responsables de l'amélioration des effets anti-tumoraux observés chez les souris traitées avec l'association de la RIT α et de l'ACT de LT CD8⁺ OT-I, le sang des souris des groupes ACT seul et RIT α + ACT sont prélevés à différents temps après les traitements puis les cellules collectées sont analysées en cytométrie

de flux. Les LT CD8⁺ OT-I exprimant le marqueur congénique CD45.1, le double marquage CD8-CD45.1 nous permet de quantifier le pourcentage des LT CD8⁺ OT-I présent dans chaque groupe (figure 37). Nous pouvons constater une diminution de la proportion de ces LT au cours du temps pour les deux traitements. On remarque également que, suite à la combinaison thérapeutique, les LT CD8⁺ OT-I persistent de façon plus importante que lorsqu'ils sont injectés seuls. Cependant, cette augmentation du pourcentage d'OT-I observée jusqu'à 59 jours après la greffe des 5T33-OVA n'est pas significative. En effet, les LT CD8⁺ OT-I ne sont plus détectables lorsque les souris sont sacrifiées suite au développement tardif du MM ou pour celles qui survivent jusqu'à 200 jours sans signe de la maladie (données non montrées).

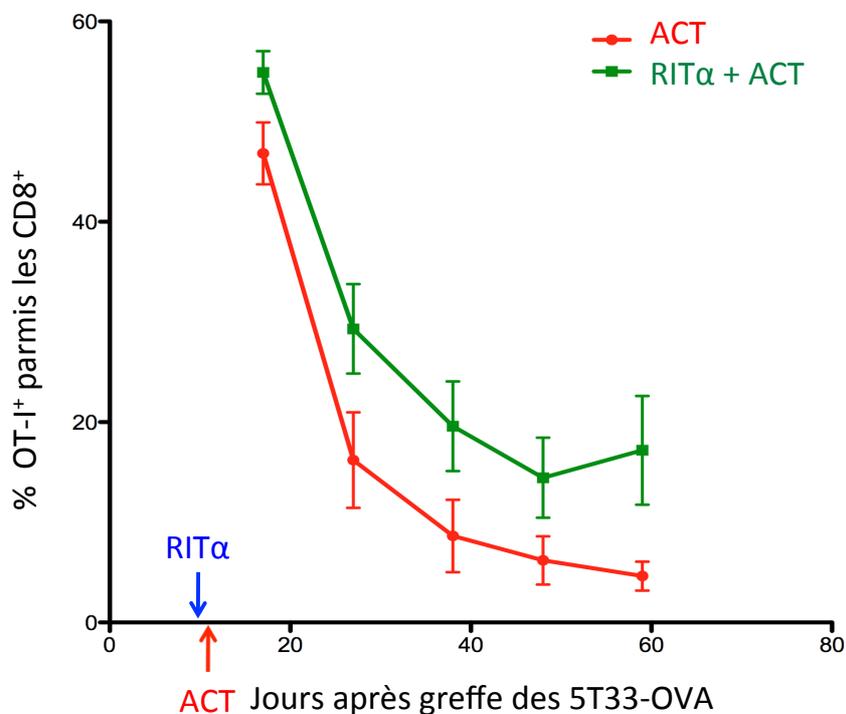


Figure 37 : La thérapie combinée induit une meilleure persistance des OT-I

Le sang des souris (n = 5-10 souris par groupe) des groupes recevant l'ACT seul ou la RITα + ACT est prélevé aux jours 17, 27, 38, 48, 59 après la greffe des 5T33-OVA et le pourcentage des OT-I est analysé par cytométrie de flux. Pour chaque jour, le graphique représente la moyenne des pourcentage détecté ± SEM

Dans un second temps, nous avons voulu évaluer la capacité de migration des LT CD8⁺ OT-I injectés dans les organes lymphoïdes, à savoir la rate et les ganglions lymphatiques, à un temps proche après l'administration des différents traitements. Entre 20 et 22 jours après la greffe tumorale, les souris des différents groupes sont sacrifiées, la rate et les ganglions lymphatiques sont prélevés et un tri des LT CD8⁺ est réalisé. Pour chaque souris, les LT CD8⁺ sont marqués et analysés en cytométrie de flux. Nous trouvons significativement

plus de LT CD8⁺ OT-I infiltrant les ganglions lymphatiques et la rate suite à la combinaison thérapeutique qu'après l'ACT seul (figure 38A). La 5T33 pouvant également coloniser ces organes, l'infiltration plus massive de ces LT CD8⁺ OT-I peut ainsi améliorer l'efficacité thérapeutique de la combinaison de la RIT α et de l'ACT. Cela suggère que ces cellules acquièrent des capacités de migration plus importantes suite au traitement combinant la RIT α et l'ACT. Cette migration plus importante peut également s'expliquer par la déplétion des cellules périphériques engendrées par la RIT α .

Enfin, nous avons voulu évaluer la capacité des LT CD8⁺ triés comprenant notamment les LT CD8⁺ OT-I, de la rate et des ganglions lymphatiques, à pouvoir reconnaître la 5T33-OVA, la 5T33 parentale et une lignée irrelevante de lymphome murin EL-4. Les LT CD8⁺ des différents groupes sont incubés avec les lignées décrites précédemment puis leur sécrétion en IFN- γ est évaluée en cytométrie de flux. Grâce au marqueur congénique CD45.1, nous pouvons analyser et distinguer les sécrétions d'IFN- γ des LT CD8⁺ OT-I et une réponse T CD8⁺ endogène CD45.1 négative. Aucune sécrétion d'IFN- γ par des LT CD8⁺ autre que les LT CD8⁺ OT-I n'a été détectée après leur co-culture avec les différentes lignées (données non montrées). Cela signifie que la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale endogène dépendante des LT endogènes (spreading) n'a pas eu lieu 20-22 jours après la greffe des 5T33-OVA. Ce résultat démontre également que l'expression de l'ovalbumine dans la 5T33 ne modifie pas son immunogénicité *in vivo*.

Toutefois, la figure 38B met en évidence qu'un pourcentage plus important de LT CD8⁺ OT-I des ganglions lymphatiques, prélevés après la thérapie combinée, étaient capables de sécréter de l'IFN- γ (79% des LT CD8⁺ OT-I) par rapport aux LT CD8⁺ OT-I prélevés après l'ACT seul (66% des OT-I). La même tendance est observée pour les LT CD8⁺ OT-I issus de la rate sans pour autant que celle-ci soit statistiquement différente, 77,5% des LT CD8⁺ OT-I après traitement RIT α + ACT sécrètent de l'IFN- γ contre 74% des LT CD8⁺ OT-I pour l'ACT seul.

Ces données suggèrent que la thérapie combinée permet aux LT CD8⁺ OT-I injectés de mieux survivre une fois injectés *in vivo* tout en ayant une migration et des capacités de reconnaissance augmentées par rapport aux LT CD8⁺ OT-I donnés en traitement seul. Il semble que la RIT α , en plus de pouvoir induire une destruction tumorale, crée un environnement favorable aux LT CD8⁺ OT-I injectés par la suite leur permettant d'effectuer leur action anti-tumorale contre la 5T33-OVA.

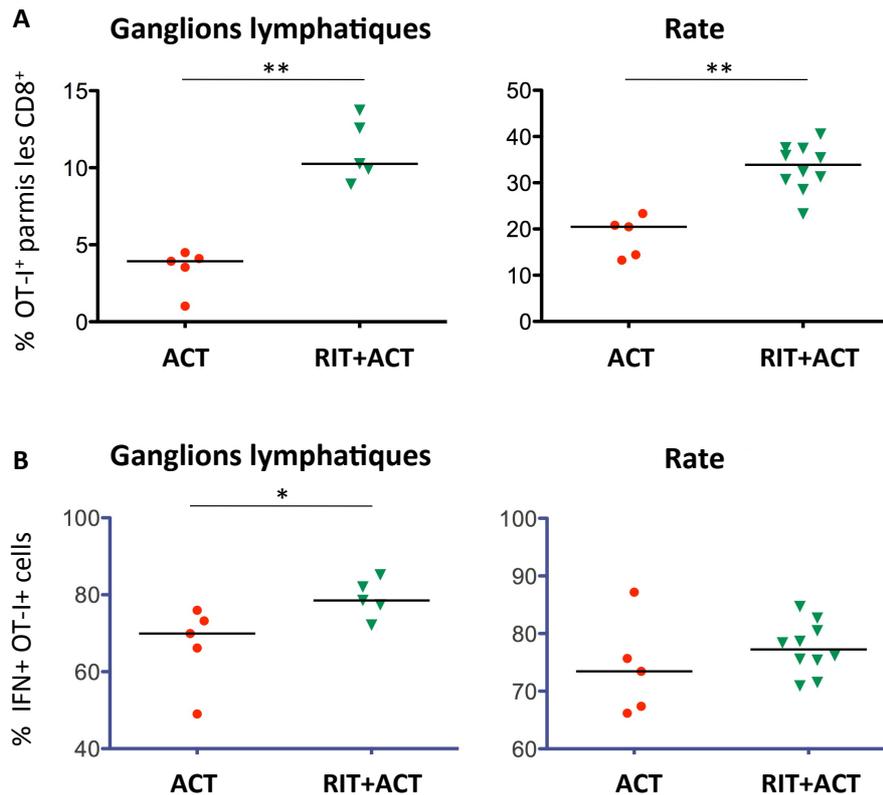


Figure 38 : La thérapie associant la RIT α et l'ACT augmente le pourcentage d'OT-I et leur reconnaissance des cellules tumorales dans la rate et les ganglions lymphatiques.

Les ganglions lymphatiques et la rate des souris ($n = 10$ souris par groupe) recevant l'ACT seul ou la thérapie combinée sont prélevés 20 à 22 jours après la greffe des 5T33-OVA. Puis les LT CD8⁺ sont triés. A, Rate et ganglions lymphatiques sont analysés par cytométrie de flux pour quantifier le pourcentage d'OT-I présent parmi les LT CD8⁺ totaux. B, La capacité de lyse de la 5T33-OVA par les OT-I provenant de la rate et des ganglions lymphatiques est analysée en cytométrie de flux via leur sécrétion d'IFN- γ . Le pourcentage d'OT-I sécrétant de l'IFN- γ est représenté. (*, $P < 0.05$ et **, $P < 0.01$ entre les groupes.)

La thérapie combinée induit la sécrétion d'IL-2 et d'IL-1 α contribuant à une efficacité anti-tumorale optimale.

Afin de comprendre pourquoi la thérapie combinée est plus efficace et pourquoi les LT CD8⁺ OT-I injectés sont plus efficacement recrutés et plus aptes à exercer leur action cytotoxique suite à la combinaison de la RIT α et de l'ACT, nous avons voulu quantifier les cytokines suite aux différents traitements. Pour cela, les sérums des souris des différents groupes sont prélevés à différents temps avant et après les traitements puis différentes cytokines sont analysées en cytométrie de flux afin de pouvoir les quantifier (figure 39).

Quinze cytokines différentes ont été analysées. Suite aux différents traitements, nous ne trouvons pas de différence concernant la production de la cytokine immunosuppressive IL-10. En revanche, 27 jours après la greffe des cellules 5T33-OVA soit 16 jours après

l'administration de la thérapie combinée, une augmentation significative de la quantité d'IL-1 α sécrétée est détectée dans le sérum de ces souris par rapport aux autres groupes (figure 39). L'IL-1 α est une cytokine dite « d'alarme » sécrétée par les macrophages pour initier l'inflammation (Dinarello, 1996). L'IL-1 α va induire l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion de haute affinité (e.g : les intégrines) à la surface des cellules endothéliales et des lymphocytes augmentant ainsi l'infiltrat lymphocytaire du sang vers les tissus (Apte et al., 2006). Cette cytokine est également caractérisée comme étant une molécule de co-stimulation pour la prolifération des LT, la sécrétion d'IL-2 et l'expression du récepteur à l'IL-2R par les LT activés (Apte et al., 2006; Dinarello, 1996).

Le même phénomène est observé pour l'IL-2 puisque de 17 à 38 jours après la greffe, les quantités d'IL-2 sécrétées sont plus importantes suite à la combinaison thérapeutique par rapport aux autres groupes (figure 39). On peut également observer cette augmentation, dans une moindre mesure, 38 jours après la greffe dans le groupe recevant l'ACT seul. L'IL-2 active le système immunitaire en favorisant la prolifération et la différenciation des LT, LB et les NK. En outre, l'IL-2 augmente l'activité cytolytique des lymphocytes et favorise l'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales. L'IL-2 stimule les cellules qui interviennent dans la destruction des cellules tumorales, en particulier les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) (Rosenberg et al., 1985; Beldegrun et al., 1988).

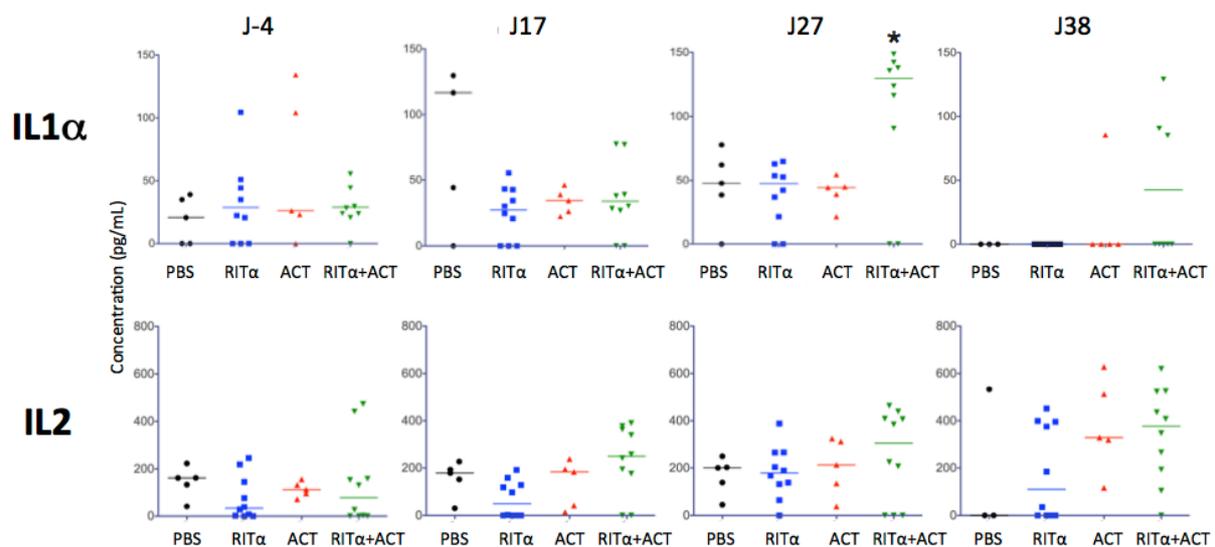


Figure 39 : Le rôle important de l'IL-1 α et de l'IL-2 dans l'efficacité thérapeutique suite à la thérapie combinée RIT α +ACT.

Le sérum des souris des différents groupes (n= 5-10 par groupe) est prélevé 4 jours avant et 17, 27, 38 jours après la greffe des 5T33-OVA. La concentration des différentes cytokines est réalisée en cytométrie de flux grâce au kit multiplex d'ebioscience. (*, P<0.05 en comparaison du groupe non traité PBS.)

L'ensemble de ces données montre que la thérapie associant RIT α et ACT avec des LT CD8⁺ OT-I peut potentiellement stimuler le système immunitaire de l'hôte par la sécrétion de l'IL-1 α et de l'IL-2 qui vont également contribuer à la potentialisation de l'action anti-tumorale des LT CD8⁺ OT-I.

Les effets anti-tumoraux sont associés à une augmentation de l'infiltrat par les cellules du système immunitaire dans les ganglions lymphatiques après le traitement combiné RIT α et ACT de LT CD8⁺ OT-I.

Suite à la mise en évidence de la sécrétion d'IL-1 α et d'IL-2, nous avons voulu examiner le système immunitaire des souris au moment de leur sacrifice suite au développement du MM ou ayant survécu jusqu'à la fin du suivi. Les ganglions lymphatiques de chaque groupe sont prélevés et analysés en cytométrie de flux pour quantifier les différentes populations de cellules immunes présentes (figure 40). La comparaison des souris traitées par la RIT α seule ou l'ACT seul avec le groupe témoin ne met en évidence aucune différence concernant les cellules de la réponse innée ou adaptative infiltrant les ganglions lymphatiques.

Néanmoins, nous trouvons une augmentation significative des LT totaux (CD3), aussi bien des LT CD8⁺ que des LT CD4⁺ suite à l'association thérapeutique RIT α + ACT. Cela suggère que ces cellules ont été stimulées induisant ainsi leur prolifération. Cette réponse n'est pas régulée négativement car nous n'observons pas d'augmentation du nombre de LTreg (CD3-CD4-foxp3) par rapport aux souris contrôles non traitées. Toujours dans ce groupe ayant reçu la RIT α et l'ACT de LT CD8⁺ OT-I, nous détectons une légère augmentation des DC CD11c⁺, des cellules NK et des LB (CD19) sans que celles-ci soient différentes statistiquement par rapport au groupe contrôle.

Ces données montrent que la thérapie combinée stimule une augmentation du nombre de LT résidant dans les ganglions lymphatiques. Ceux-ci ne peuvent être des LT CD8⁺ OT-I puisqu'ils ne sont pas détectables lorsque ces ganglions ont été analysés (données non montrées).

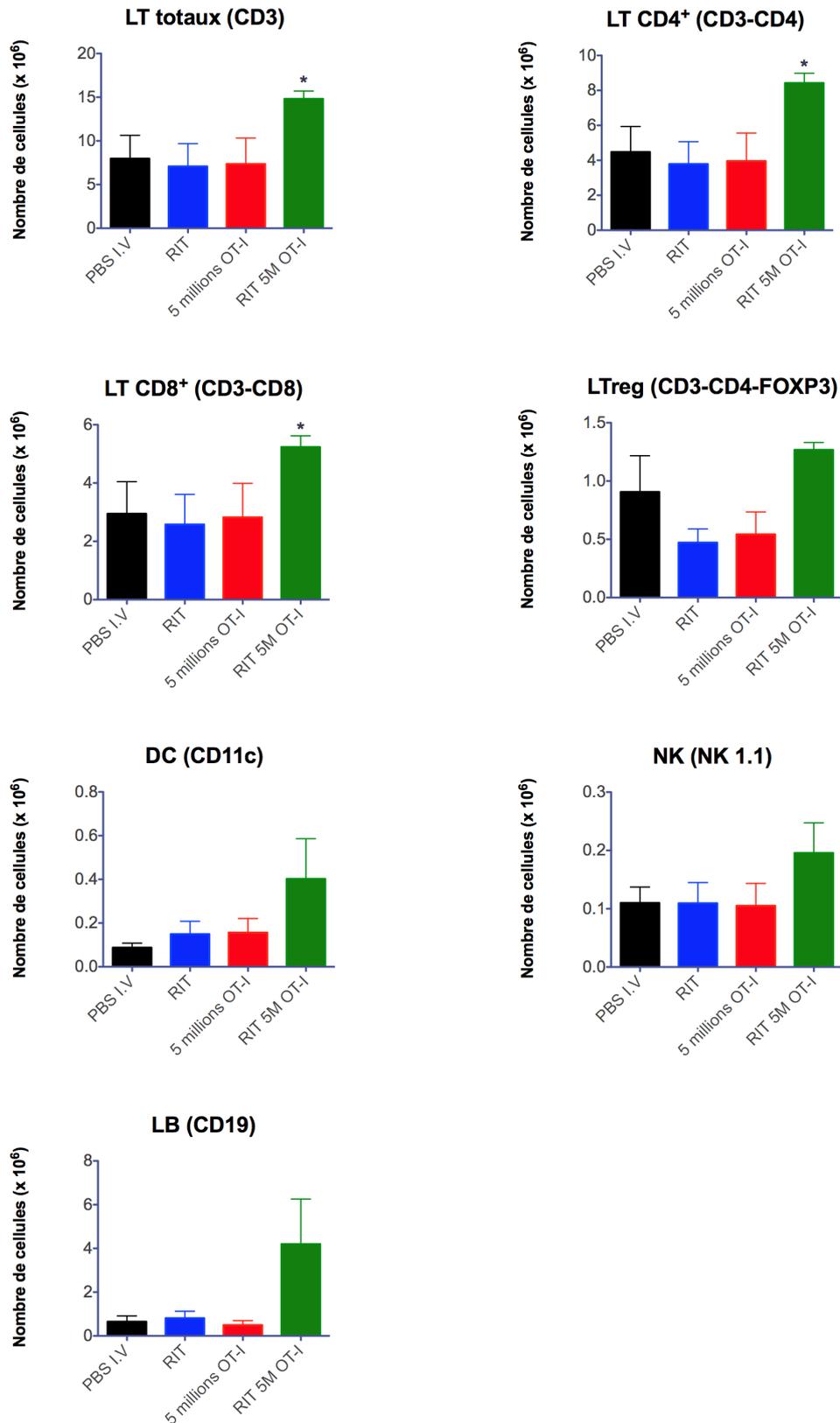


Figure 40 : Augmentation de l'infiltrat de cellules immunitaires dans les ganglions lymphatiques suite à la RIT α +ACT
 Les suspensions cellulaires sont préparées à partir des ganglions lymphatiques des souris pour les différents groupes (n = 10 souris par groupe). Les cellules sont marquées avec les anticorps anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4, anti-foxp3, anti-CD11c, anti-NK1.1 et anti-CD19. Les histogrammes représentent le nombre de cellules doubles ou triples-positives. (*, P<0.05 en comparaison du groupe non traité PBS.)

Discussion

Le développement de stratégies thérapeutiques efficaces utilisant la RIT dans le traitement des cancers disséminés et des maladies résiduelles dépend, en partie, de la nature du rayonnement émis par le radionucléide couplé à l'anticorps ciblant la cellule tumorale. Une fois l'anticorps monoclonal fixé spécifiquement sur sa cible tumorale, les radionucléides émetteurs de particules α présents sur l'anticorps offrent la possibilité d'irradier les cellules par un rayonnement de 50 à 100 μm correspondant au diamètre de quelques cellules (Sgouros et al., 2010). Par conséquent, le principal avantage de l'utilisation des émetteurs α réside dans le fait qu'ils détruisent peu les cellules saines au voisinage des cellules cancéreuses (Mulford et al., 2005). De plus, les particules α ont des avantages biologiques importants par rapport à la RT externe et l'irradiation par les particules β^- , notamment une efficacité biologique plus élevée qui est presque indépendante du degré d'hypoxie, du débit de dose et de la position dans le cycle cellulaire (Kitson et al., 2013; Baidoo et al., 2013). Ainsi, la RIT α se révèle particulièrement intéressante pour le traitement de cellules tumorales isolées telles que celles observées dans le MM (Chérel et al., 2013).

Les études s'intéressant aux mécanismes de la RIT α *in vivo* sont encore rares. La majeure partie de ces études a évalué l'efficacité de la RIT α à pouvoir atteindre et détruire la tumeur dans des modèles murins de xénogreffes, le plus souvent immunodéficients (Kim and Brechbiel, 2012). Cependant, il a été montré récemment que des interactions entre l'irradiation par les particules α , la tumeur et le système immunitaire de l'hôte pouvaient influencer favorablement l'efficacité thérapeutique de la RIT α (Keisari et al., 2014; Gorin et al., 2014).

Puisque de nombreux travaux mettent en évidence un rôle important du système immunitaire dans les effets anti-tumoraux générés par les rayonnements ionisants (Formenti and Demaria, 2013; Demaria and Formenti, 2012; Formenti and Demaria, 2009), nous avons émis l'hypothèse que les réponses thérapeutiques pouvaient être améliorées en associant la RIT α et l'ACT de LT spécifiques de tumeur. Des études ont montré l'induction d'effets anti-tumoraux puissants suite à l'injection de LT spécifiques de tumeurs après RT de la tumeur aussi bien au niveau préclinique (Reits et al., 2006; Chakraborty et al., 2003) que clinique (Rosenberg et al., 2011; Dudley et al., 2008).

Nos travaux montre que l'association thérapeutique de la RIT α avec l'ACT de LT spécifiques de tumeur améliore significativement la médiane de survie et la survie sans rechute de souris atteintes par le MM par rapport à chacun des deux traitements administrés seuls. Les deux stratégies combinées induisent également une potentialisation des effets anti-tumoraux des LT CD8⁺ OT-I injectés. Nous montrons que les effets anti-tumoraux induits par la combinaison thérapeutique semblent corrélés avec une meilleure persistance et une meilleure migration des LT CD8⁺ OT-I injectés. Nous mettons également en évidence une meilleure capacité de reconnaissance de la lignée tumorale 5T33-OVA par ces cellules et donc potentiellement, une activité cytotoxique augmentée. Ainsi, cette étude démontre pour la première fois que l'utilisation de la RIT α peut augmenter de manière significative l'activité anti-tumorale des LT CD8⁺ OT-I pour une destruction combinée du MM.

Suite à leur administration, la RIT α , comme tous les rayonnements ionisants a pour effet d'engendrer une déplétion des cellules du sang périphérique et principalement une lymphodéplétion (Chérel et al., 2013). Plusieurs études ont montré que cette lymphodéplétion permettait d'améliorer la repopulation de l'organisme par les LT injectés (Dudley et al., 2008; 2002; Rosenberg et al., 2011). Cela pourrait expliquer la meilleure persistance et la meilleure migration des LT CD8⁺ OT-I injectés suite à la RIT α . Afin de confirmer cela, il serait intéressant de refaire le suivi des LT CD8⁺ OT-I suite à la RIT α chez des souris sans tumeur.

L'irradiation par les rayonnements ionisants a la capacité de modifier le microenvironnement tumoral en créant un contexte pro-inflammatoire permettant le développement d'une réponse immunitaire (Formenti and Demaria, 2013). Nos résultats révèlent à l'issue de l'association thérapeutique, une augmentation de l'IL-1 α et de l'IL-2 dans le sérum des souris. Ces deux cytokines activent le système immunitaire. L'IL-1 α est une cytokine de l'inflammation, produites par les macrophages activés, favorisant la prolifération et la maturation des LB. Cette cytokine induit également le relargage d'IL-2 qui favorise la prolifération des LT et des NK. Parallèlement à cela, nous trouvons une augmentation significative des LT totaux, aussi bien des LT CD8⁺ que des LT CD4⁺ suite à l'association thérapeutique montrant leur impact sur le système immunitaire. Il semble que la RIT α seule ne puisse pas induire cet effet, signifiant qu'une synergie avec l'ACT est à l'origine de l'augmentation du nombre de LT.

Enfin, l'IL-2 stimule les cellules qui interviennent dans la destruction des cellules tumorales, en particulier les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) (Rosenberg et al., 1985; Belldegrun et al., 1988; Labarriere et al., 2002; Dreno et al., 2002). Cela pourrait expliquer

l'augmentation de la reconnaissance des LT CD8⁺ OT-I contre la 5T33-OVA observée dans nos travaux (Les LT CD8⁺ OT-I du traitement RIT α + OT-I sécrétant d'IFN- γ suite à la coculture avec les 5T33-OVA que les LT CD8⁺ OT-I injectés seuls).

Il est actuellement difficile de savoir si l'efficacité anti-tumorale obtenue dans cette étude résulte de l'induction d'une réponse immunitaire endogène contre les cellules de MM, en plus de la destruction des cellules tumorales engendrée par les deux stratégies thérapeutiques. Nous n'avons pas pu établir la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative dépendante des LT, 20 à 22 jours après la greffe tumorale. Néanmoins, cette période de temps se situe proche du nadir de la lymphodéplétion provoquée par la RIT α (Chérel et al., 2013). Nous avons donc prévu de répéter l'expérience à un temps plus tardif une fois que le système immunitaire de la souris est reconstitué. L'impact de la RIT α délivrée en systémique sur les cellules tumorales 5T33-OVA est également difficile à évaluer car ces cellules vont diffuser et proliférer majoritairement dans la moelle osseuse, plus différents organes où siège une hématopoïèse extramédullaire et potentiellement d'autres organes lymphoïdes secondaires. La localisation dans la moelle osseuse (vertèbres, sacrum, boîte crânienne et épiphyse des fémurs,...) de ces cellules rend difficile leur prélèvement et leur analyse suite à l'irradiation par les particules α . Des études *in vitro* sont toutefois envisageables afin d'évaluer leur comportement suite à la RIT α .

En conclusion, cette étude montre, pour la première fois, la possibilité d'associer la RIT α et l'ACT permettant d'augmenter l'efficacité thérapeutique des LT CD8⁺ OT-I injectés contre le MM. Nos données suggèrent la possibilité d'une implication du système immunitaire de l'hôte dans la réponse thérapeutique et montre la pertinence mais également la faisabilité d'utiliser ces deux stratégies au niveau clinique. La production de LT spécifiques de tumeur dans le MM peut s'avérer difficile compte tenu de l'absence d'antigène associé aux tumeurs clairement défini dans cette pathologie. Une solution envisageable serait l'utilisation de LT modifiés par les CAR (chimeric antigen receptor) permettant un ciblage du MM comme ceux générés contre l'antigène CD38 (Mihara et al., 2012) ou BCMA (CD269, (Carpenter et al., 2013)).

**CONCLUSION
GENERALE
PERSPECTIVES**

Les objectifs de ce travail de thèse ont été, dans un premier temps, d'étudier l'influence de l'irradiation α par le bismuth-213 sur le système immunitaire puis de réaliser une étude de l'association de 2 stratégies thérapeutiques, la RIT α au bismuth-213 et le transfert adoptif de LT spécifiques de tumeur. L'étude expérimentale a été divisée en trois parties distinctes :

- la réponse anti-tumorale suite à l'irradiation α ,
- la mise en place de la thérapie combinée RIT α et ACT pour traiter le MM,
- l'étude des mécanismes immunitaires impliqués dans la potentialisation de l'efficacité thérapeutique induite par cette stratégie combinatoire RIT α et ACT.

Chaque partie a donné lieu à une discussion essayant d'expliquer les résultats obtenus. La conclusion générale va permettre de reprendre les résultats essentiels de chaque partie et de dégager des perspectives. Nous traiterons d'une part, des conséquences immunologiques de l'irradiation des tumeurs par les particules α et d'autre part, l'étude de l'association de la RIT α et de l'ACT dans le traitement du MM.

I- Conséquences immunologiques de l'irradiation des tumeurs par les particules α

La RIT exploite la haute spécificité entre un antigène tumoral et un anticorps dirigé contre cet antigène pour vectoriser un radionucléide au niveau de la tumeur à détruire. Au cours de la dernière décennie, une augmentation progressive de l'intérêt pour les radionucléides hautement radiotoxiques émetteurs de particules α a été constatée. D'un point de vue thérapeutique, la RIT α s'adresse particulièrement aux pathologies cancéreuses intrinsèquement de petite taille comme les hémopathies malignes, les micro-métastases ou la maladie résiduelle.

Les caractéristiques physiques des particules α et leur impact sur l'ADN ont fait l'objet d'un certain nombre d'études bien décrites. Néanmoins, l'appréciation de leurs rôles sur le système immunitaire et l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale ne sont pas établies. Cette étude semble essentielle puisque la RT conventionnelle utilisant des rayonnements γ ou X a montré la potentialisation de l'immunogénicité des cellules tumorales associée à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à démontrer le potentiel activateur des particules α , émises par décroissance du bismuth-213, sur le système immunitaire. En effet, l'induction ou le rétablissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace peut s'avérer très importante dans le traitement du cancer. Il a été montré dans de multiples études précliniques et cliniques qu'une réponse immunitaire anti-tumorale était associée à un meilleur pronostic. Nous nous sommes donc intéressés à la libération de DAMP après l'irradiation par le bismuth-213, révélant la mort cellulaire immunogène des cellules ciblées (Kroemer et al., 2013). Nous avons observé la libération des protéines Hsp70 et HMGB1 par la lignée MC38 après irradiation par le bismuth-213. Afin de déterminer l'effet de la libération de ces DAMP par les cellules irradiées au bismuth-213 sur la réponse immunitaire, nous avons mis en contact des DC avec les surnageants conditionnés de cellules MC38 irradiées. Nous avons montré que ces surnageants induisaient l'augmentation de l'expression de différentes molécules de costimulation sur les DC ainsi que des changements morphologiques caractéristiques d'une activation de ces cellules. Des résultats similaires ont été obtenus après irradiation des lignées de MM 5T33 et LP-1 par le bismuth-213 (données non présentées). Ces résultats indiquent donc que l'irradiation par le bismuth-213 permet l'activation des DC *in vitro*. Le rôle des DC dans la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale est prépondérant puisqu'elles vont potentiellement pouvoir phagocyter des cellules tumorales puis présenter des antigènes tumoraux sous la forme de complexes CMH-peptide par la voie de présentation croisée permettant l'activation des LT spécifiques. De plus, nous avons pu montrer, *in vivo*, que la vaccination par des cellules tumorales MC38 traitées au bismuth-213 a effectivement conduit à la protection des souris contre un challenge tumoral avec des cellules MC38 vivantes. Ces résultats confirment que le bismuth-213 entraîne une mort cellulaire immunogène capable de mener à une réponse immunitaire anti-tumorale efficace *in vivo*. La protection induite par la vaccination est de longue durée puisqu'un challenge tumoral plus de 2 mois après la vaccination n'induit pas la pousse de tumeur. Ceci indique que la réponse anti-tumorale est dépendante de l'immunité adaptative et que la vaccination par les cellules irradiées permet la mise en place d'une mémoire immunitaire. La vaccination de souris déficientes en LT ne permet pas l'induction d'une protection anti-tumorale, les LT sont donc nécessaires à la réponse anti-tumorale observée.

La réponse anti-tumorale induite ici permet le rejet d'une greffe de cellules tumorales vivantes, cependant, ceci ne correspond pas à la réalité clinique dans laquelle on ne peut intervenir que sur des tumeurs déjà préexistantes, à l'aide d'un vecteur ciblant la tumeur et permettant de délivrer l'irradiation au niveau des cellules que l'on cherche à éradiquer. A ce titre, nous avons réalisé le traitement par RIT α au bismuth-213 d'un MM préalablement injecté en s.c dans des souris immunocompétentes. En plus d'induire une diminution de la prolifération tumorale et une augmentation de la médiane de survie, nous avons observé suite à l'analyse des tumeurs que la RIT α induisait une augmentation du pourcentage de LT CD4⁺, sans pour autant induire un environnement immunosuppresseur par le recrutement de LTreg. Ces données montre donc la capacité de l'irradiation α au bismuth-213 à stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale concordant avec une étude récente utilisant un autre émetteur α , le radium-224 (Keisari et al., 2014).

Ces résultats ouvrent des perspectives quant à la caractérisation plus approfondie de l'influence de l'irradiation α sur le système immunitaire. Des études complémentaires sur l'immunogénicité des cellules tumorales pourront révéler des changements phénotypiques leur permettant d'être mieux prises en charge par le système immunitaire. Cela peut passer par l'analyse de la présentation de TAA, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, d'autres mécanismes de mort cellulaire immunogène ou encore la surexpression de molécules impliquées dans une réponse anti-tumorale optimale (récepteurs de mort, molécules d'adhésion,...) aussi bien par les cellules tumorales que par les cellules du système immunitaire. Enfin ces mécanismes peuvent différer d'une lignée tumorale à l'autre en fonction de leur immunogénicité et de leur radiosensibilité propre. En ce sens, des études complémentaires sont en cours dans l'équipe visant à mieux caractériser les effets des particules α sur les cellules tumorales et leur relation au système immunitaire comme l'étude de l'autophagie, de l'expression des molécules de CMH ou encore des molécules de co-stimulation dans différents modèles tumoraux.

Le rôle prépondérant des DC dans cette immunité anti-tumorale permettrait de tester, *in vitro*, leur capacité de présentation croisée et d'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique suite à leur co-culture avec des cellules tumorales irradiées par des émetteurs α .

L'ensemble de ces données expérimentales ainsi que des évidences précliniques et cliniques (comme l'effet abscopal), indiquent que l'activité anti-tumorale des rayonnements ionisants et donc des α , est générée d'une part, par une destruction tumorale directe, d'autre part, par l'activation de réponses immunitaires cellulaires spécifiques de la tumeur (Formenti and Demaria, 2013; Gorin et al., 2014). Dans le but d'exploiter l'immunité induite par l'irradiation α , nous avons proposé de développer une thérapie combinée utilisant la RIT α et une stratégie d'immunothérapie passive, l'ACT de LT spécifiques de tumeur, dans le traitement d'une maladie disséminée, le MM.

II- Association de la RIT α et de l'ACT dans le traitement du MM

Les échecs relatifs dans le traitement du MM peuvent être attribués à la persistance des cellules tumorales. La RIT α au bismuth-213 ciblant le MM apparaît être une stratégie pertinente dans la prise en charge de cette maladie. Au laboratoire, l'équipe a pu mettre en avant l'efficacité thérapeutique de cette stratégie dans un modèle syngénique et immunocompétent, la 5T33 (Chérel et al., 2013). Des données récentes soulignent l'intérêt d'associer l'immunothérapie à la RT (Kroemer and Zitvogel, 2012; Vacchelli et al., 2013; Demaria and Formenti, 2012) et notamment l'ACT de LT spécifiques de tumeur (Reits et al., 2006; Chakraborty et al., 2003). Pour cela, nous avons développé un modèle tumoral 5T33-OVA exprimant le complexe CMH-peptide : H₂K^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄ permettant son ciblage et sa reconnaissance par des LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques, les LT CD8⁺ OT-I.

L'objectif de notre travail étant d'évaluer une éventuelle complémentarité de ces deux stratégies autant sur la potentialisation de la destruction tumorale que sur la potentialisation d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

Dans un premier temps, nous avons pu valider que le phénotype de la 5T33-OVA était stable, non immunogène et entraînait toujours le développement, chez la souris C57BL/6/KalwRij de la pathologie, conformément à la 5T33 parentale. Ainsi, dans un deuxième temps, nous avons pu mettre au point la combinaison thérapeutique. La RIT α s'effectuant 10 jours après la greffe tumorale et l'ACT de LT CD8⁺ OT-I, 1 jour après la RIT α . Dans la suite de l'étude, l'association de ces 2 stratégies, après l'injection des 5T33-OVA en s.c, a permis un meilleur contrôle de la prolifération tumorale et une meilleure survie que l'un ou l'autre des traitements réalisés seuls ce qui souligne la pertinence d'associer ces deux stratégies. Cela démontre également que la RIT α au bismuth-213 n'a pas d'effet délétère sur les OT-I injectés un jour après. En effet, de par sa demi-vie courte (45,6 min), aucune trace de radioactivité n'est détectée chez la souris le lendemain de la RIT α . Ainsi, les LT CD8⁺ OT-I injectés ne sont pas touchés par les radiations ionisantes.

L'analyse de la tumeur nous a permis de mettre en évidence une infiltration des LT CD8⁺ OT-I injectés et contrairement aux LT CD8⁺ OT-I injectés seuls, la thérapie combinée ne semble pas induire un environnement tumoral immunosuppresseur par la présence de LTreg. Le faible nombre de LT CD8⁺ OT-I retrouvés dans les différents compartiments

analysés des souris traitées par la thérapie combinée associée à l'induction d'une réponse LT CD4⁺ par la RIT α suggère induire une plus grande efficacité de ces effecteurs T (Matloubian et al., 1994).

Afin de confirmer cela, notre association thérapeutique est réalisée dans le modèle orthotopique par l'injection de la 5T33-OVA en i.v. Une fois encore, la combinaison de la RIT α et de l'ACT permet une augmentation de la survie des souris ainsi que de la survie sans rechute 200 jours après la greffe tumorale. Dans ce modèle, nous démontrons que les LT CD8⁺ OT-I injectés présentent une meilleure persistance, une meilleure migration mais aussi une meilleure capacité de reconnaissance des cellules tumorales suite à la RIT α soulignant la synergie de ces deux stratégies sur la potentialisation de la destruction tumorale. Cette synergie, est retrouvée dans la capacité de cette thérapie combinée à induire la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α et IL-2) ainsi qu'une augmentation de l'infiltrat par les cellules du système immunitaire dans les ganglions lymphatiques et en particulier les LT. Ces paramètres associés à la lymphodéplétion générée par la RIT α peuvent expliquer les gains de fonctions des LT CD8⁺ OT-I ainsi que la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale intrinsèque. L'ensemble de ces résultats, corrélé à une potentialisation des effets anti-tumoraux, suggère une implication du système immunitaire de l'hôte dans la réponse thérapeutique et montre pour la première fois, la pertinence mais également la faisabilité d'utiliser ces deux stratégies tout en soulignant l'apport de la RIT α aussi bien pour la destruction tumorale directe que pour son rôle positif sur le système immunitaire.

De la réussite de cette approche combinatoire se dégage la possibilité d'un ajustement thérapeutique. En effet, le changement de la date d'injection et/ou la multiplication des doses d'OT-I injectés peuvent améliorer l'efficacité de ce traitement (Kircher et al., 2003). Si tel est le cas, la dose de RIT α administrée pourra, dans le même temps, être diminuée afin d'être moins radiotoxique pour les souris sans changer l'efficacité de la thérapie combinée.

Cependant, nous n'avons pas pu établir la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative dépendante des LT endogènes, 20 à 22 jours après la greffe tumorale. Cela peut s'expliquer par le fait que nous nous situons proche de la lymphodéplétion, ainsi la réponse immunitaire n'a pas encore pu se mettre en place. Il serait donc intéressant de refaire cette expérience à un temps plus tardif afin de pouvoir mettre en évidence un élargissement (spreading) de la réponse immunitaire T anti-tumorale comme cela a été mis en évidence en

clinique suite à l'injection de clones T spécifiques de tumeur (Vignard et al., 2005). Une autre possibilité serait de « re-challenger » avec les 5T33-OVA, les souris survivantes, ce qui permettrait ou non, de mettre en évidence une réponse immunitaire mémoire.

Il est important de noter que la mise en place d'une immunité anti-tumorale efficace et durable est un phénomène rare et d'autant plus que la tumeur est disséminée comme en témoigne le faible nombre de cas où l'effet abscopal (rejet tumoral à distance du champ d'irradiation) est observé (Formenti and Demaria, 2013; Vacchelli et al., 2013). En effet, une série d'étapes sont nécessaires pour que les LT de l'hôte puissent efficacement rejeter une tumeur (Boissonnas et al., 2013; Breart et al., 2008). Cela suppose que les LT 1) atteignent efficacement la tumeur par extravasation des vaisseaux puis infiltration du microenvironnement tumoral, 2) qu'ils puissent toujours être capable de maintenir leurs fonctions effectrices et 3) qu'ils forment des synapses immunologiques stables avec leur cible tumorale. Dans la majorité des tumeurs, des obstacles sont présents à chacune de ces étapes (Gajewski et al., 2006). Bien que les rayonnements ionisants incluant les particules α , favorisent le tropisme et l'extravasation des LT au niveau tumoral tout en induisant l'expression de molécules qui améliorent la reconnaissance de la tumeur par ces LT (Lugade et al., 2008; Matsumura and Demaria, 2010; Garnett et al., 2004; Chakraborty et al., 2003; Newcomb et al., 2006; Gorin et al., 2014), ces étapes sont généralement insuffisantes, expliquant, en partie, la rareté des effets de type abscopal. Un seuil minimal de LT activés et fonctionnels contre la tumeur est requis pour permettre le rejet de la tumeur (Critchley-Thorne et al., 2009; Budhu et al., 2010). De la même manière, un nombre critique de LT CD8⁺ cytotoxiques doit vraisemblablement être requis pour inhiber efficacement la croissance tumorale en clinique. Dans notre modèle d'étude du MM, la multiplicité des sites tumoraux associée à une faible densité de cellules tumorales au moment du traitement peut expliquer que certaines, voir la majorité des zones tumorales soient détruites tout en générant une réponse immunitaire anti-tumorale, hélas trop faible pour que celle-ci soit efficace à l'ensemble de l'organisme.

L'imagerie pourrait permettre de mieux appréhender les effets de la RIT α et de l'ACT dans le MM, mais également de la réponse immunitaire anti-tumorale potentiellement induite. Le MM étant disséminé et localisé dans des sites difficilement accessibles, l'émission de rayonnements γ par le bismuth-213 pourrait permettre de révéler les différentes zones tumorales comme cela a été réalisé en clinique (Jurcic et al., 2002). L'ACT des LT CD8⁺ OT-

I marqués, visualisables en imagerie (Kircher et al., 2003), indiqueraient leur potentiel migratoire mais aussi les lieux tumoraux atteints ou non suite à la RIT α .

Depuis peu, une collaboration avec l'équipe du Pr. Bogen, nous a permis d'obtenir un nouveau modèle murin de MM, la MOPC, exprimant fortement le CD138 et se développant chez la souris immunocompétente Balb/c (Hofgaard et al., 2012). Des résultats préliminaires prometteurs indiquent que la RIT α dans ce second modèle de MM est aussi efficace. L'association de la RIT α et de l'ACT peut donc être envisageable. L'haplotype des souris Balb/c et des souris C57BL6/KalwRij étant différent, même si la MOPC est transduite pour l'ovalbumine, celle-ci ne pourra être reconnue par les LT CD8⁺ OT-I. En revanche, l'haplotype (H₂K^d) de ce modèle permettrait d'évaluer l'ACT de LT CD4⁺ activés, les LT CD4⁺ OT-II. Enfin, ce modèle semble également adapté pour l'utilisation thérapeutique de LT modifiés par les CAR, dirigés contre le CD138 ou d'autres antigènes spécifiques de ces cellules myélomateuses murines afin d'évaluer l'intérêt potentiel de cette association en clinique.

L'ensemble des résultats de cette étude permet un grand nombre de perspectives. Le rôle prépondérant des DC dans les réponses anti-tumorales après l'irradiation α et leur nombre augmenté suite à la thérapie combinée indiquent qu'elles peuvent jouer un rôle majeur. Au niveau préclinique, notre équipe a montré le bénéfice de l'association de la RIT α utilisant le bismuth-213 dans le MM (5T33) en combinaison avec l'injection de Flt3-L – une molécule stimulant la production de DC (données non publiées). D'autres stratégies peuvent potentialiser l'action des DC (cf. chapitre III) et il serait envisageable de les tester suite à la RIT α . Il peut s'agir de l'injection de DC ou bien de l'injection de longs peptides synthétiques codant pour des TAA qui peuvent uniquement être pris en charge par les CPA professionnelles pour la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

De façon plus générale, les conséquences bénéfiques sur le système immunitaire de l'irradiation par des émetteurs de particules α et de la RIT α , en l'occurrence le bismuth-213, permettent de nouvelles perspectives dans le traitement des cancers pour le développement de thérapies combinées utilisant la RIT α couplée à l'immunothérapie active ou passive comme cela est réalisé pour la RT conventionnelle (Formenti and Demaria, 2013).

Pour finir, il serait intéressant de tester l'efficacité de ces associations thérapeutiques avec d'autres émetteurs α comme l'astate-211. Ses propriétés physiques, sa demi-vie plus importante ($t_{1/2}$ vie : 7,2 h) que le bismuth-213 et ses caractéristiques d'émissions (émission thérapeutique de particules α mais aussi de rayonnements X pour une imagerie dosimétrique) font de ce radioisotope l'un des plus prometteurs en vue d'applications cliniques de la RIT α (Song et al., 2009).

ANNEXES

**A) Article IV : Measles Virus Vaccine–Infected Tumor
Cells Induce Tumor Antigen Cross-Presentation by
Human Plasmacytoid Dendritic Cells**

Jean-Baptiste Guillerme, Nicolas Boisgerault, David Roulois, Jérémie Ménager, Chantal Combredet, Frédéric Tangy, Jean-François Fonteneau, and Marc Gregoire

Clinical Cancer Research (2013) 19(5); 1147–58

Measles Virus Vaccine–Infected Tumor Cells Induce Tumor Antigen Cross-Presentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells

Jean-Baptiste Guilleme^{1,2,3}, Nicolas Boisgerault^{1,2,3}, David Roulois^{1,2,3}, Jérémie Ménager^{1,2,3}, Chantal Combredet⁴, Frédéric Tangy⁴, Jean-François Fonteneau^{1,2,3}, and Marc Gregoire^{1,2,3}

Abstract

Purpose: Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are antigen-presenting cells specialized in antiviral response. The measles virus vaccine is proposed as an antitumor agent to target and specifically kill tumor cells without infecting healthy cells.

Experimental Design: Here, we investigated, *in vitro*, the effects of measles virus vaccine–infected tumor cells on the phenotype and functions of human pDC. We studied maturation and tumor antigen cross-presentation by pDC, exposed either to the virus alone, or to measles virus vaccine–infected or UV-irradiated tumor cells.

Results: We found that only measles virus vaccine–infected cells induced pDC maturation with a strong production of IFN- α , whereas UV-irradiated tumor cells were unable to activate pDC. This IFN- α production was triggered by the interaction of measles virus vaccine single-stranded RNA (ssRNA) with TLR7. We observed that measles virus vaccine–infected tumor cells were phagocytosed by pDC. Interestingly, we showed cross-presentation of the tumor antigen NYESO-1 to a specific CD8⁺ T-cell clone when pDC were cocultured with measles virus vaccine–infected tumor cells, whereas pDC were unable to cross-present NYESO-1 after coculture with UV-irradiated tumor cells.

Conclusions: Altogether, our results suggest that the use of measles virus vaccine in antitumor virotherapy induces immunogenic tumor cell death, allowing pDC to mature, produce high amounts of IFN- α , and cross-present tumor antigen, thus representing a mode of recruiting these antigen-presenting cells in the immune response. *Clin Cancer Res*; 19(5); 1147–58. ©2012 AACR.

Introduction

Measles virus vaccine–based antitumor virotherapy is a new therapeutic approach to treat cancers (1, 2). It is based on the ability of a vaccine-attenuated live strain of measles virus, such as Edmonston or Schwarz strains, to preferentially infect and kill tumor cells. Measles virus vaccine uses mainly CD46 molecules to infect cells,

whereas wild-type measles virus preferentially uses SLAM (CD150; refs. 3, 4). During cancer development, tumor cells are often selected to express high levels of CD46 molecules, which inhibit the complement system (5, 6). This CD46 overexpression makes the tumor cells less sensitive to lysis by the complement but renders them sensitive to measles virus vaccine infection. We and others have reported that several types of cancer are sensitive to this approach *in vitro*, such as mesothelioma (7), ovarian cancer (8), multiple myeloma (9), breast cancer (10), hepatocellular carcinoma (11), and melanoma (12). *In vivo* efficacy of this approach has also been reported in models of human tumor xenografts in immunodeficient mice (8–11). Phase I clinical trials against different malignancies are now in progress. In a first phase I clinical trial, intratumoral injection of low doses of measles virus vaccine to 5 patients with cutaneous T-cell lymphoma allowed stabilization of the disease in 2 patients and the observation of a partial response in one other (13). Results from a further phase I trial were published recently, in which patients with chemotherapy-resistant ovarian cancer were treated with intraperitoneal measles virus vaccine (14). Twenty-one patients were treated and improvements in serum tumor markers were noted in 5.

Authors' Affiliations: ¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR892; ²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR6299; ³Université de Nantes, Nantes; and ⁴Unité de Génétique Virale et Vaccination, CNRS-URA 3015, Institut Pasteur, Paris, France

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

J.-F. Fonteneau and M. Gregoire participate equally in the last authorship position.

Corresponding Author: Jean-François Fonteneau, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR892, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, 8 quai Moncousu, BP70721, 44007 Nantes Cedex, France. Phone: 33-228-080-239; Fax: 33-228-080-204; E-mail: jean-francois.fonteneau@inserm.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

©2012 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Measles virus vaccine–based antitumor virotherapy is a new therapeutic approach to treat cancers. It is based on the spontaneous capacity of measles virus vaccine to infect and kill preferentially tumor cells. Phase I clinical trials against different malignancies are in progress with encouraging results. This promising efficacy of measles virus vaccine antitumor virotherapy is mainly due to the lysis of tumor cells following measles virus vaccine infection. However, it is likely that a part of this efficacy is due to the effect of measles virus vaccine–infected tumor cells on the antitumor immune response. In this study, we show that measles virus vaccine–infected tumor cells activate human plasmacytoid dendritic cells (pDC), a particular subset of dendritic cells specialized in the antiviral immune response. Human pDC are then able to cross-present a tumor antigen from measles virus vaccine–infected tumor cells to specific cytotoxic T cells. Our work thus suggests that measles virus vaccine–based antitumor virotherapy triggers an antitumor immune response, notably by the recruitment of pDC.

This promising efficacy of measles virus vaccine antitumor virotherapy is mainly a result of the lysis of tumor cells following measles virus vaccine infection, as shown by *in vivo* studies in immunodeficient mice (15, 16). In these immunodeficient mice, it has also been shown that measles virus vaccine infection triggers neutrophil infiltration of tumors, which probably participates in the efficiency of the antitumor virotherapy (17). Indeed, measles virus vaccine infection of tumor cells may also be able to trigger the immune system to induce an antitumor immune response. We previously showed, *in vitro*, that mesothelioma cells killed by measles virus vaccine were able to produce danger signals, trigger the maturation of myeloid dendritic cells, and cross-present tumor antigens to CD8⁺ T lymphocytes, whereas the same tumor cells killed by UV irradiation did not (7). Similar results were recently reported following lysis of melanoma tumor cells by measles virus vaccine (12).

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are a subset of dendritic cells involved in the antiviral immune response due to their expression of Toll-like receptors (TLR) specialized in the recognition of viral nucleic acids (TLR7 and TLR9; ref. 18). They respond to a wide range of viruses (*inter alia* influenza A virus, herpes simplex virus, HIV) in terms of activation and maturation by producing large amounts of type I IFN (IFN- α , - β , - ω). They are also able to present viral antigens to CD8⁺ and CD4⁺ T cells when they are infected by a virus (19) and to cross-present viral antigens from virus-infected cells to CD8⁺ T lymphocytes (20–23). It has also been shown that these pDC could play a beneficial role in the immune response against tumors (24, 25). As an example, in a mouse melanoma model, pDC activation and antitumor immune response were observed inside tumors by topical treatment with the TLR7 ligand, imiquimod (24).

As measles virus vaccine is single-stranded RNA (ssRNA), pDC should be able to detect the measles virus vaccine infection of tumor cells, because of their intravacuolar TLR7 expression, which recognizes ssRNA. In addition, although it has been well described that human pDC are able to cross-present viral antigens, there is as yet no evidence that these antigen-presenting cells are able to cross-present tumor antigens.

In our study, we addressed, *in vitro*, the effect of tumor cell infection by measles virus vaccine Schwarz on the activation status of human pDC and their ability to cross-present a tumor antigen to a specific CD8⁺ T-cell clone. We showed that, despite CD46 expression, pDC are not sensitive to measles virus vaccine infection. However, they are able to respond *in vitro* to measles virus vaccine by producing IFN- α with a greater sensitivity when interleukin (IL)-3 is added to the culture. We also showed that measles virus vaccine–infected tumor cells triggered pDC activation, notably IFN- α production, whereas UV-irradiated tumor cells did not. pDC activation was probably caused by the ssRNA of measles virus vaccine, which triggers TLR7 in the pDC endocytic compartment following phagocytosis of measles virus vaccine–infected tumor cells. Interestingly, we showed for the first time that human pDC cocultured with measles virus vaccine–infected tumor cells were able to cross-present the NYESO-1 tumor antigen to a specific CD8⁺ T-cell clone. Our results suggest that, in addition to a direct tumor lysis effect, measles virus vaccine–based antitumor virotherapy may trigger an antitumor immune response by activating pDC.

Materials and Methods

Cell culture

The mesothelioma Meso13 cell line was established and characterized in our laboratory (26), the melanoma M18 was a kind gift from Dr. Labarriere [Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U892, Nantes, France], and the pulmonary adenocarcinoma A549 cell line was purchased from ATCC (Manassas, VA). All cell lines were cultured at 37°C, 5% CO₂ atmosphere in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and 2 mmol/L L-glutamine (all reagents were purchased from Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cells were routinely checked for mycoplasma contamination, by PCR. A549 is HLA-A*2501+; -A*3001+ (27). M18 is HLA-A*2902 homozygous as determined by PCR (data not shown).

Measles virus vaccine infection and UV irradiation

Live-attenuated Schwarz-strain measles virus vaccine and recombinant measles virus vaccine–enhanced GFP (MV-eGFP) were produced as previously described (7). Measles virus vaccine infection of tumor cells was conducted for 2 hours at 37°C with a multiplicity of infection (MOI) of 1 unless otherwise indicated. Viral inoculum was then replaced by fresh cell medium for 72 hours. For pDC infection and maturation experiments, measles virus

vaccine was not washed and stayed in the medium throughout the culture. Measurement of infection rate was conducted by flow cytometry using MV-eGFP at 24, 48, and 72 hours postinfection. All other experiments were carried out using measles virus vaccine. Tumor cells were irradiated with UV-B (312 nm–100 kJ/m², Stratalinker, Stratagene). Medium was renewed every 72 hours.

Dendritic cell isolation and culture

pDC were obtained from healthy donor peripheral blood mononuclear cells (PBMC; Etablissement Français du Sang) as previously described (28). Briefly, pDC were first enriched by counterflow centrifugation and then purified by magnetic bead negative selection as recommended in the manufacturer's protocol (Stemcell Technologies). The purity of untouched pDC was always greater than 96%. pDC (3×10^5 per mL) were maintained in culture with 20 ng/mL rhIL-3 (Sigma) or activated *in vitro* with a TLR-7 agonist, R848 (InvivoGen; 5 µg/mL). pDC were also cocultured with measles virus vaccine alone, measles virus vaccine, and IL-3 (MOI = 1), or measles virus vaccine-infected or UV-irradiated tumor cells (pDC:tumor cell ratio, 1:1) without rhIL-3 or maturation agent. After 18 hours, culture supernatants and pDC were harvested for use. For the TLR-7 inhibition assay, we used immunoregulatory DNA sequences (IRS), which specifically inhibit signaling via TLR-7 (IRS661), at concentrations ranging from 0.1 to 1 µmol/L (Eurofins). As a control, we used CpG-A at 5 µg/mL to induce a TLR-9-dependent IFN- α secretion by pDC (InvivoGen).

Immunofluorescence and flow cytometry

The phenotypes of pDC were determined by immunofluorescence followed by flow cytometry. pDC were stained with monoclonal antibodies specific for CD40, CD86, HLA-DR (BD Biosciences), CD83 (BioLegend), and BDCA-4 (Miltenyi Biotec). pDC were gated as BDCA-4⁺/HLA-DR⁺ cells, to differentiate them from tumor cells. Tumor cell death was measured by TO-PRO3 (Invitrogen) staining as recommended by the manufacturer. TO-PRO3 is a cyanine monomer nucleic acid with far-red fluorescence that enters only in dead cells and stains the DNA. Fluorescence was analyzed on FACSCantoII (Becton Dickinson) using FlowJo software.

Phagocytosis assay

Measles virus vaccine-infected and UV-irradiated tumor cells were stained with PKH-67 according to the manufacturer's protocol (Sigma) and cocultured with pDC, for 18 hours at 4°C or 37°C (1 dendritic cell:1 tumor cell). Cocultures were washed with PBS-EDTA to dissociate the cell-conjugate. pDC were stained by an HorizonV450-conjugated, anti-HLA-DR-antibody (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry (FACSCantoII, BD Biosciences). pDC phagocytosis was observed by confocal microscopy (Nikon). Measles virus vaccine-infected and UV-irradiated tumor cells were stained with PKH-67 and then cocultured with pDC in 24-well plates containing poly-lysine glass slides, for 18 hours (pDC:tumor cell

ratio 1:1). pDC were stained with uncoupled anti-HLA-DR (BD Biosciences). HLA-DR staining was revealed with a secondary anti-mouse IgG antibody coupled to Alexa Fluor 568.

Cytokine detection

IFN- α (MabTech) production was measured by ELISA on pDC culture supernatants according to the manufacturer's instructions.

Cross-presentation assay

NYESO-1^{pos}/HLA-A*0201^{neg} melanoma (M18) and NYESO-1^{neg}/HLA-A*0201^{neg} pulmonary adenocarcinoma (A549) cell lines were measles virus vaccine-infected or UV-B-irradiated and cultured for 72 hours. They were then cocultured with HLA-A*0201^{pos} pDC (pDC:tumor cell ratio, 1:1). After 18 hours, pDC were cocultured with the HLA-A*0201/NYESO-1(156-165)-specific CD8⁺ T-cell clone, M117.167, for 6 hours in the presence of Brefeldin-A (Sigma). The M117.167 clone was obtained by cloning in a limiting dilution of tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. The clone was cultured as described (29). As control, we used pDC pulsed for 1 hour with 0.1 or 1 µmol/L NYESO-1(156-165) peptide and washed. Cells were then fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde, for 10 minutes at room temperature, and permeabilized and stained with IFN- γ and CD8-specific antibodies (BD Biosciences), as previously described (30). IFN- γ production was analyzed by flow cytometry with a gate on CD8⁺ T cells.

Real-time RT-PCR

One microgram of total RNA was reverse-transcribed using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were conducted using QuantiTect primers (Qiagen) and RT² Real-Time SYBR-Green/ROX PCR mastermix (Tebu-bio) according to the manufacturers' instructions.

Statistics

GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) software using a nonparametric Mann-Whitney comparison test was used. *P* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Sensitivity of tumor cells and pDC to measles virus vaccine infection

During infection, measles virus vaccine enters cells mainly via the CD46 and, to a lesser extent, CD150/SLAM (3, 4). In a first experiment, we studied the expression of these 2 major measles virus vaccine receptors, CD46 and CD150/SLAM, on pDC, melanoma (M18), mesothelioma (Meso13), and pulmonary adenocarcinoma (A549) cell lines (Fig. 1A). We observed CD46 expression on all cell types, with higher expression on Meso13 and A549. About CD150/SLAM expression, we found a positive expression on the melanoma cell line, M18. These results suggest that

Guillemme et al.

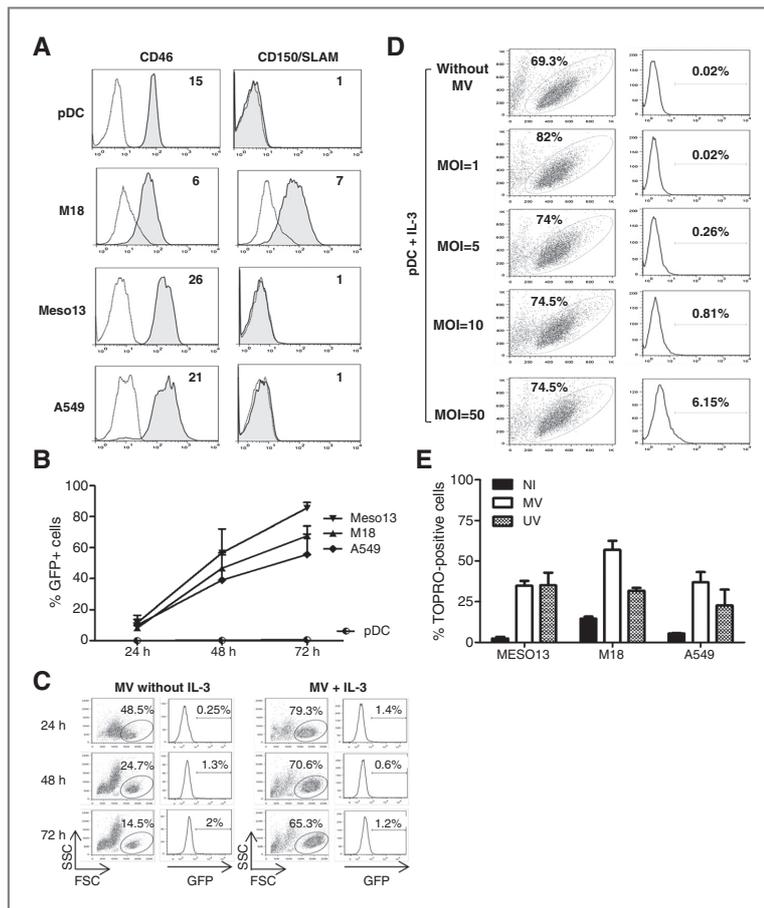


Figure 1. Measles virus vaccine receptor expression, measles virus vaccine infection sensitivity, and survival of tumor cells and pDC. **A**, expression of CD46 and CD150/SLAM on the surface of tumor cell lines (M18, Meso13, and A549) and pDC [monoclonal antibody (mAb) staining, gray histogram; isotype control, white histogram; the values on histograms are the R-FI, relative mean fluorescence intensity, defined as the mAb staining MFI divided by isotype control MFI]. **B**, infection of tumor cell lines (M18, Meso13, and A549) and pDC by MV-eGFP (MOI = 1). **C**, infection of pDC by MV-eGFP (MOI = 1), in the presence or absence of IL-3. **D**, infection of pDC by MV-eGFP with increasing MOI, in the presence or absence of IL-3. **E**, survival of tumor cell lines following measles virus vaccine infection or UV irradiation. Three days after infection or UV irradiation, cells were incubated with TO-PRO3, which stains dead cells. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. Results in **A**, **C**, and **E** are representative of 3 independent experiments. Results in **B** and **E** reflect the mean of 3 independent experiments. Error bars represent the SD. SSC, side scatter; FSC, forward scatter.

all these cell types may be sensitive to measles virus vaccine infection, as they all express CD46.

We then studied the sensitivity to measles virus vaccine infection of these 4 cell types using a recombinant measles virus vaccine encoding the GFP (MV-GFP). Seventy-two hours after exposure to measles virus vaccine with a MOI = 1, the 3 tumor cell lines were productively infected with measles virus vaccine, ranging from 50% of A549 cells positive for GFP to 90% of Meso13 cells (Fig. 1B). Furthermore, we observed syncytia formation for the 3 tumor cell lines (Supplementary Fig. Video S1). pDC were not permissive at MOI = 1 (Supplementary Fig. Video S2). Without a survival signal such as IL-3, the pDC died during the 72 hours of culture. Thus, we also carried out experiments in which we added IL-3 to the pDC exposed to measles virus vaccine (Fig. 1C). In the presence of IL-3, they survived during the 72 hours, but were not productively infected by measles virus vaccine. To confirm this result, we increased

the MOI up to 50 in the presence of IL-3, but we still failed to detect infected pDC (Fig. 1D). However, we observed a small shift of fluorescence at MOI = 50, which was probably due to uptake of soluble GFP during the 72-hour culture, which contaminates the MV-GFP preparation, as when we used UV-irradiated MV-GFP, which is not able to replicate, we still observed this slight fluorescence shift (Supplementary Fig. S3). Finally, when the MV-GFP was incubated for 2 hours at MOI = 50 with pDC and washed, we failed to detect the small shift of fluorescence 70 hours later (Supplementary Fig. S3).

We then measured tumor cell death 72 hours after infection. We found that nearly half of measles virus vaccine-infected tumor cells were TO-PRO⁺ after 72 hours (Fig. 1E). A similar level of cell death was observed by irradiating the tumor cells with UV-B. Thus, measles virus vaccine infection induces tumor cell death for approximately half of the tumor cells 72 hours after infection.

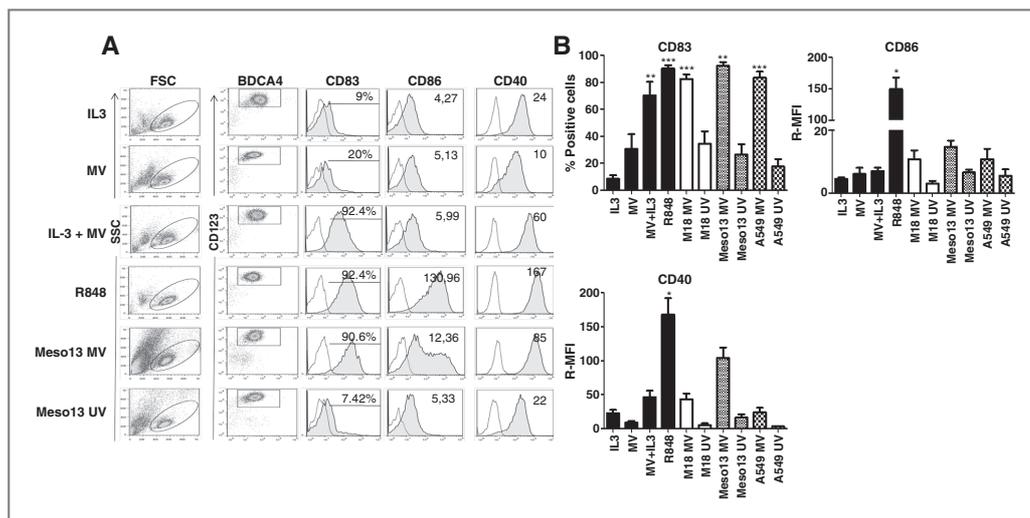


Figure 2. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce pDC maturation. pDC were cultured for 18 hours with either IL-3, measles virus vaccine (MOI = 1), measles virus vaccine and IL-3, R848, UV-irradiated- or measles virus vaccine-infected tumor cells. A, expression of CD83, CD86, and CD40 by pDC was measured by flow cytometry with a gate on CD123⁺/BDCA-4⁺ cells. B, histograms were obtained from 3 independent experiments. A nonparametric Mann-Whitney comparison test was used to determine the *P* value, which was obtained by comparison of the sample result with the IL-3 pDC result (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001).

Measles virus vaccine-infected tumor cells induce maturation of pDC

We next investigated the effects of measles virus vaccine alone and measles virus vaccine-infected cells on pDC maturation (Fig. 2). In these experiments, we evaluated how measles virus vaccine infection of tumor cells in comparison with UV irradiation, another inducer of tumor cell death, affects pDC maturation. As a control for maturation, we exposed pDC to the TLR7/8 agonist, R848 (Fig. 2A and B).

We have previously shown that the measles virus vaccine-infected MPM tumor cell line, Meso13, induced maturation of monocyte-derived dendritic cells without additional adjuvants, whereas the virus alone or UV-irradiated Meso13 did not (7). We presently carried out a set of experiments on pDC to determine the effects of measles virus vaccine alone, measles virus vaccine-infected, or UV-irradiated tumor cells on pDC maturation status. We compared the effect of measles virus vaccine-infected and UV-irradiated tumor cells on the maturation status of pDC (Fig. 2). We observed maturation of pDC cocultured with measles virus vaccine-infected tumor cells, whereas UV-irradiated tumor cells failed to activate pDC. Indeed, CD83 maturation marker expression was induced by measles virus vaccine-infected cells to a similar level as that observed when the pDC were exposed to R848. We also noted an induction of the expression of the costimulation molecules, CD40 and CD86, on pDC exposed to measles virus vaccine-infected tumor cells, although this induction was low compared with the levels triggered by R848 alone.

Two studies have been reported which describe conflicting results on the ability of measles virus vaccine alone to trigger pDC maturation (30, 31). However, the study from Duhon and colleagues, reporting that measles virus vaccine activates pDC, was conducted in the presence of IL-3, a pDC survival factor (31), whereas the other study, from Schlenker and colleagues, who observed that pDC cultured with measles virus vaccine does not induce pDC maturation, was carried out without IL-3. Thus, we conducted and compared the 2 conditions and found similar results to those described by these authors. Indeed, measles virus vaccine at MOI = 1 induced pDC maturation only in the presence of IL-3 (Fig. 2). As observed for R848 alone, measles virus vaccine in the presence of IL-3-induced pDC maturation, mainly characterized by a significant increase of CD83 and, to a lesser extent, CD40 and CD86 expression. We also observed survival and maturation of pDC in the absence of IL-3 only when we exposed them to a high quantity of measles virus vaccine (MOI = 50; data not shown). At a lower viral concentration in the absence of IL-3, the pDC died.

In the last set of experiments, we tested whether measles virus vaccine infection and replication in pDC were needed to induce their activation. We exposed pDC to UV-irradiated measles virus vaccine (MV^U), which is unable to replicate, and we observed a similar level of maturation (CD83, CD80, and CD86 expressions) and IFN- α production as with nonirradiated measles virus vaccine (Supplementary Fig. S4A and S4C). The presence of a blocking anti-CD46-specific antibody in the culture of pDC exposed to IL-3 and measles virus vaccine did not affect maturation of pDC

Guillerme et al.

(Supplementary Fig. S4A). The same experiment was carried out with pDC exposed to measles virus vaccine-infected tumor cells. We still observed maturation and IFN- α production when measles virus vaccine-infected tumor cells were UV-irradiated before exposure to pDC (Supplementary Fig. S4B and S4C). Finally, we tested whether a CD46-specific monoclonal antibody was able to inhibit pDC maturation in response to measles virus vaccine-infected tumor cells (Supplementary Fig. S4B and S4C). We did not observe inhibition, whereas the anti-CD46 antibody completely inhibited infection of Meso13 as a control (Supplementary Fig. S4D). Altogether, these results suggest that measles virus vaccine infection and replication in pDC are not necessary for pDC activation in response to measles virus vaccine.

pDC capture cellular components from measles virus vaccine-infected tumor cells

Because of endo/lysosomal expression of TLR-7 and TLR-9, pDC are specialized in viral nucleic acid detection (18). These 2 receptors are the major innate receptors that activate pDC (32). Because measles virus vaccine, in the presence of

IL-3 or measles virus vaccine-infected tumor cells, are able to induce pDC maturation, it is likely that the maturation stimulus is measles virus vaccine ssRNA, which activates TLR7 in the endo/lysosomal compartment. This hypothesis is strengthened by the fact that measles virus vaccine alone does not induce monocyte-derived dendritic cell maturation, as these cells do not express TLR7 in humans. This implies that some measles virus vaccine are endocytosed by pDC when they are cultured with measles virus vaccine and IL-3 or with measles virus vaccine-infected cancer cells. We then investigated whether pDC efficiently take up cellular material from measles virus vaccine-infected and UV-irradiated tumor cells (Fig. 3). Measles virus vaccine-infected and UV-irradiated M18 and A549 tumor cells were labeled with PKH67 and cocultured with pDC. We observed that pDCs efficiently take up measles virus vaccine-infected tumor cells at 37°C, whereas UV-irradiated tumor cells were less efficiently taken up (Fig 3A and B). In 2 additional experiments, we observed that the presence of the CD46 monoclonal antibody in the culture did not inhibit phagocytosis of measles virus vaccine-infected tumor cells (data not shown).

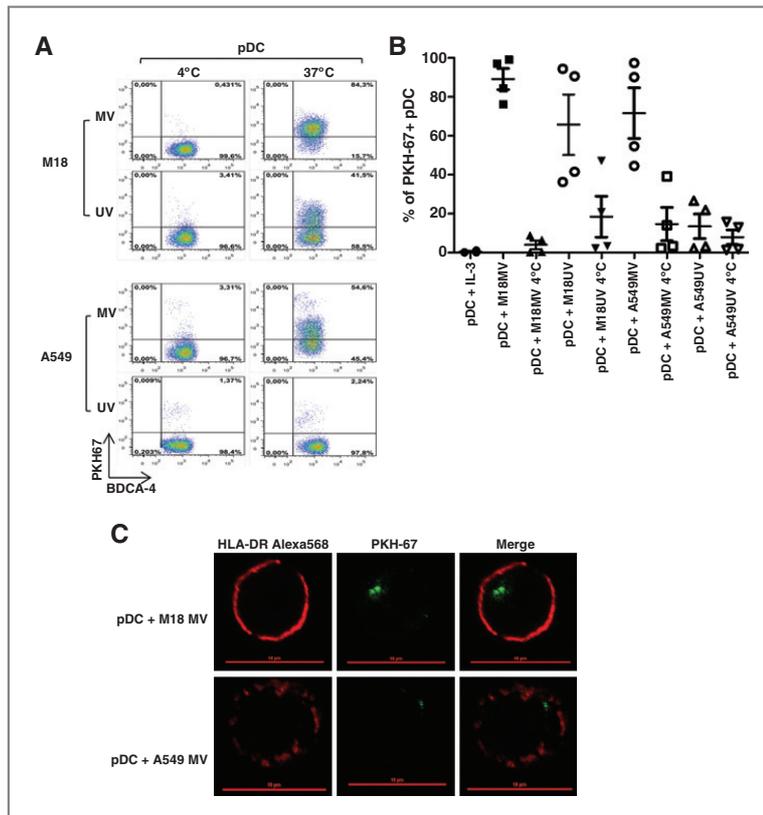


Figure 3. Phagocytosis of measles virus vaccine-infected or UV-irradiated tumor cells by pDC. A, measles virus vaccine-infected and UV-irradiated tumor cells were stained with PKH-67 and cocultured with pDC for 18 hours at 4°C or 37°C (1 dendritic cell:1 tumor cell). Cells were stained with HLA-DR-specific mAb. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. This experiment is representative of 4 experiments. B, scatter plot representation of the 4 phagocytosis experiments. Error bars represent the SD. C, measles virus vaccine-infected tumor cells were stained with PKH-67 (green) and cocultured with pDC for 18 hours. Cells were stained with HLA-DR-specific mAb (red). Fluorescence was analyzed by confocal microscopy.

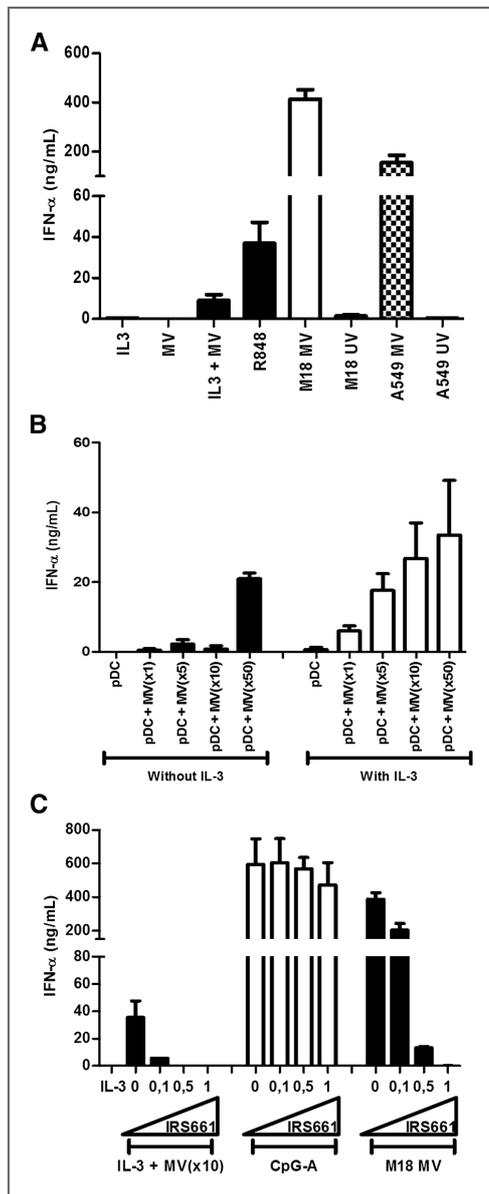


Figure 4. Production of IFN- α by pDC in response to measles virus vaccine is TLR7 dependent. A, pDC were cultured for 18 hours with IL-3, measles virus vaccine (MOI = 1), measles virus vaccine and IL-3, R848, UV-irradiated- or measles virus vaccine-infected M18 or A549 tumor cells. IFN- α production was measured by ELISA in the culture supernatants. B, pDC were cultured for 18 hours with or without IL-3 and increasing quantities of measles virus vaccine. IFN- α production was measured by ELISA in the culture supernatants. C, pDC were cultured for

These results were confirmed by confocal microscopy (Fig. 3C). pDC were cocultured for 18 hours with PKH-67-labeled, measles virus vaccine-infected tumor cells. The optical sections showed fluorescent fragments of measles virus vaccine-infected tumor cells inside the pDC, confirming the internalization of measles virus vaccine-infected tumor cell pieces by pDC. Interestingly, we never observed syncytia formation between pDC and tumor cells. Altogether, these results suggest that some measles virus vaccine contained in infected tumor cells could access compartments in which TLR is located.

Measles virus vaccine-infected tumor cells induce strong type I IFN secretion by triggering TLR7

pDCs are known to be the strongest producers of type I IFN, notably against virus, upon TLR-7 or TLR-9 activation (18). Thus, we measured IFN- α production by pDC following exposure to measles virus vaccine, measles virus vaccine-infected, or UV-irradiated tumor cells by ELISA (Fig. 4A). Direct exposure to measles virus vaccine induced IFN- α secretion by pDC only in the presence of IL-3, matching the cell maturation observed earlier in Fig. 2. The amount of IFN- α produced in response to measles virus vaccine in the presence of IL-3 was comparable with the amount induced by R848 alone, a potent TLR7/8 agonist. Strikingly, we found high amounts of IFN- α in coculture supernatants after exposure of pDC to measles virus vaccine-infected tumor cells (20–40 times more than observed in response to measles virus vaccine in the presence of IL-3 or R848 alone). These high quantities of IFN- α were produced by the pDC, as tumor cells did not produce IFN- α or a very low amount (pg/mL range) after measles virus vaccine infection (data not shown). UV-irradiated A549 or M18 tumor cells did not induce IFN- α production by pDC. These results show that measles virus vaccine-infected tumor cells are able to trigger the production of high levels of IFN- α by pDC, considerably higher than the levels produced by pDC exposed to measles virus vaccine in the presence of IL-3 or to R848 alone.

We have previously shown that, 3 days after infection of the Meso13 tumor cell line, a large amount of virus is produced, reaching 1×10^8 TCID₅₀/mL corresponding to an MOI greater than 100 from a starting dose of virus of 1×10^6 TCID₅₀/mL, corresponding to an MOI = 1 (7). It is thus likely that the huge quantity of IFN- α produced by pDC in response to measles virus vaccine-infected tumor cells is the result of the intense measles virus vaccine replication in these tumor cells. To test this hypothesis, we cultured pDC in the presence of increasing MOI ranging from 1 to 50, with or without IL-3 (Fig. 4B). In the presence of IL-3, we observed that IFN- α production by pDC increased with the MOI. On the contrary, pDC did not produce IFN- α in the absence of IL-3, except for the highest MOI (MOI = 50).

18 hours with IL-3 and measles virus vaccine (MOI = 10), CpG-A or measles virus vaccine-infected M18, in the absence or presence of different concentrations of IRS661 (TLR7 inhibitor). IFN- α production was measured by ELISA in the culture supernatants. Results were obtained from 3 independent experiments.

Guillerme et al.

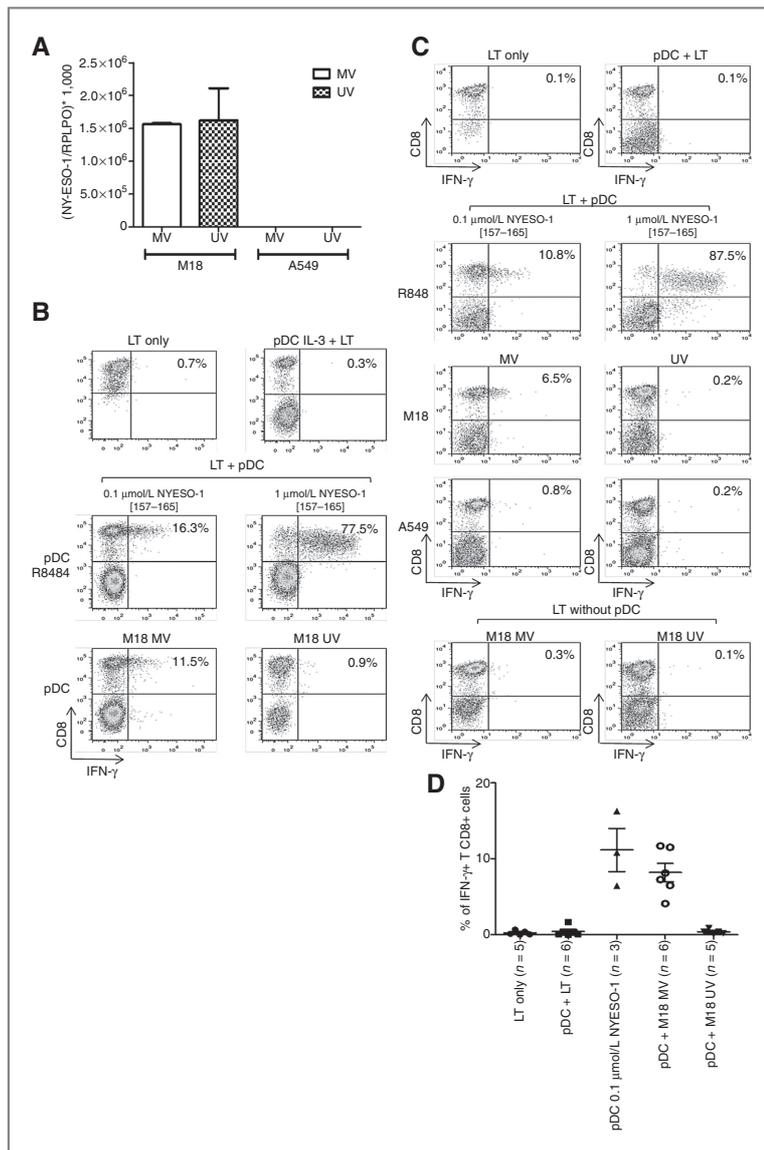


Figure 5. Cross-presentation of NYESO-1 by HLA-A*0201⁺ pDC after coculture with NYESO-1⁺/HLA-A*0201-M18 tumor cells infected with measles virus vaccine. A, expression of NYESO-1 by M18 and A549 tumor cell lines determined by real-time PCR (n = 3). B, pDC were cultured for 18 hours with IL-3, R848, or UV-irradiated- or measles virus vaccine-infected M18 tumor cells. Some pDC cultured with R848 were pulsed with NYESO-1 (157-165) peptide for 1 hour and washed. pDC were then cocultured for 6 hours with the M117.167 CD8⁺ T-cell clone specific for HLA-A*0201/NYESO-1(157-165; defined as LT) in the presence of brefeldin A. Production of IFN-γ by the M117.167 T-cell clone was analyzed by flow cytometry after staining with CD8 and IFN-γ-specific mAb. C, pDC were cultured for 18 hours with R848, or UV-irradiated- or measles virus vaccine-infected M18 (NYESO-1⁺/HLA-A*0201⁻) or A549 (NYESO-1⁻/HLA-A*0201⁻) tumor cells. Some pDC cultured with R848 were pulsed with NYESO-1 (157-165) peptide for 1 hour and washed. pDC were then cocultured for 6 hours with the M117.167 CD8⁺ T-cell clone specific for HLA-A*0201/NYESO-1(157-165) in the presence of brefeldin A. The production of IFN-γ by the M117.167 T-cell clone was analyzed by flow cytometry after staining with CD8- and IFN-γ-specific mAb. D, scatter plot representation of cross-presentation experiments. "n" represents the number of experiments carried out. "n" is different from one condition to another, as we were not able to carry out all controls in each experiment due to the limited quantity of available pDC.

These results suggest that the level of IFN-α production by pDC is dependent on the quantity of measles virus vaccine and the presence of either IL-3 or other survival signals, explaining the huge quantity of IFN-α produced in response to the high titer of virus after infection of tumor cells.

Because measles virus vaccine and measles virus vaccine-infected tumor cells contain viral ssRNA, it is likely that IFN-α production by pDC is mainly due to the triggering of TLR-

7. Thus, we carried out an inhibition of TLR7. We used specific IRS that inhibit IFN-α expression mediated by TLR-7 (IRS661; ref. 33). We showed that IFN-α production by pDC cultured in the presence of measles virus vaccine and IL-3 was inhibited when we added the IRS661 (Fig. 4C). We also observed a similar IFN-α inhibition when IRS661 was added to pDC exposed to measles virus vaccine-infected tumor cells. As a control, we showed that IRS661 did not

inhibit the CpG-A-induced IFN- α production by pDC, which is TLR9-dependent. Altogether, these results show that IFN- α production induced by measles virus vaccine or measles virus vaccine-infected cells is TLR7 dependent.

pDC are able to cross-present a tumor-associated antigen from measles virus vaccine-infected tumor cells

The capacity of human pDC to cross-present viral antigens has been reported (20–22), but cross-presentation of tumor-associated antigens (TAA) has not yet been described. We wondered whether human pDC exposed to measles virus vaccine-infected tumor cells would be able to cross-present a human TAA spontaneously expressed by tumor cells. We showed by real-time PCR that the HLA-A*0201^{neg} M18 melanoma cell line expresses the cancer testis antigen, NYESO-1, whereas the A549 lung adenocarcinoma cell line does not (Fig. 5A).

To determine whether HLA-A*0201^{pos} pDC are able to cross-present this TAA after exposure to an measles virus vaccine-infected or UV-irradiated HLA-A*0201^{neg}/NYESO-1^{pos} M18 tumor cell line, we used the CD8⁺ T-cell clone, M117.167, which is specific for HLA-A*0201/NYESO-1(157-165) complexes (Fig 5B–D). A schematic of this experiment is shown in Supplementary Fig. S5. The M117.167 T-cell clone did not produce IFN- γ , alone or in the presence of IL-3 pDC but was activated in the presence of pDC pulsed with NYESO-1(157–165) peptides (Fig. 5B). The clone was activated as soon as 0.1 μ mol/L peptide was loaded onto pDC (16.3% IFN- γ ⁺ cells) and was more intensely activated by pDC pulsed with 1 μ mol/L peptide (77.5%). In the presence of pDC cultured with measles virus vaccine-infected M18 tumor cells, 11.5% of the clone population was activated, whereas the clone did not produce IFN- γ in response to pDC cultured with UV-irradiated M18 tumor cells (Fig. 5B). In response to pDC cocultured with measles virus vaccine-infected M18, the clone had an IFN- γ production profile comparable with that observed in response to pDC pulsed with 0.1 μ mol/L NYESO-1(157–165) peptide.

As a control, we failed to detect activation of the M117.167 T-cell clone in response to measles virus vaccine-infected or UV-irradiated M18 tumor cells alone (Fig. 5C). This result was expected, as the M18 tumor cell line is HLA-A*0201^{neg}, thus unable to directly present NYESO-1(157–165) peptide to the clone. This shows that IFN- γ production by the clone in response to HLA-A*0201^{pos} pDC cocultured with measles virus vaccine-infected M18 tumor cells is due to cross-presentation. We also did not observe IFN- γ production in response to pDC cocultured with measles virus vaccine-infected NYESO-1^{neg} A549 tumor cells. In this representative experiment, the clone produced IFN- γ in response to pDC cocultured with measles virus vaccine-infected M18 (6.5% IFN- γ ⁺ cells), a production rate close to the one observed in response to pDC pulsed with 0.1 μ mol/L NYESO-1(157–165) peptide (10.8% IFN- γ ⁺ cells). In a final set of experiments, we compared NYESO-1 cross-presentation by pDC with

cross-presentation by Mo-DC (Supplementary Fig. S6). We found a similar level of cross-presentation between the 2 types of dendritic cells when they were cocultured with measles virus vaccine-infected M18 tumor cells, whereas no cross-presentation was observed in response to pDC or Mo-DC cocultured with UV-irradiated M18.

Altogether, our results show that pDC are able to cross-present tumor antigen such as NYESO-1 from measles virus vaccine-infected tumor cells, but not from UV-irradiated ones. Thus, measles virus vaccine-based antitumor virotherapy should be able to hire pDC in the antitumor immune response by activating their ability to produce high quantities of IFN- α and to cross-present TAA from measles virus vaccine-infected tumor cells to tumor-specific CD8⁺ T lymphocytes.

Discussion

In this study, we characterized, *in vitro*, the consequences of measles virus vaccine-based antitumor virotherapy on human pDC functions. First, we showed that pDC are not sensitive to measles virus vaccine infection despite expression of CD46. However, they are able to detect the virus by producing IFN- α in response to high virus quantity in the absence of a survival signal, and to low virus quantity when a survival signal, such as IL-3, is added to the culture. Second, when the pDC were cocultured with measles virus vaccine-infected tumor cells, they underwent a maturation characterized by the induction of CD83 expression and strong production of IFN- α , with a slightly increased expression of costimulatory molecules. Conversely, the pDC cocultured with UV-irradiated tumor cells retained an immature phenotype similar to that observed when they were cocultured with IL-3 alone. We then identified TLR7 as the pDC receptor responsible for their activation, probably due to the presence of single-stranded viral RNA in the endocytic compartment of pDC following internalization of measles virus vaccine-infected tumor cell fragments. Finally, using an HLA-A*0201/NYESO-1(157–165)-specific CD8⁺ T-cell clone, we showed that HLA-A*0201⁺ pDC were able to cross-present this TAA from NYESO-1⁺ HLA-A*0201^{neg} measles virus vaccine-infected tumor cells but not from UV-irradiated ones. This is the first time, to our knowledge, that the capacity of human pDC to cross-present a TAA from dead tumor cells to CD8⁺ T cells has been shown. Altogether, these results suggest that measles virus vaccine-based antitumor virotherapy, in addition to its direct lysis of infected tumor cells, is able to recruit pDC in the antitumor immune response, to activate their ability to produce high levels of type I IFN and to cross-present TAA.

In the first part of our work, we showed that human pDC exposed *in vitro* to measles virus vaccine at an MOI = 1 did not undergo maturation without IL-3. In this condition, with no survival signal, pDC undergo apoptosis and fail to acquire measles virus vaccine in the endosomal compartment to engage in a maturation process by the ligation of viral ssRNA to TLR7. When pDC were exposed to measles virus vaccine in the presence of IL-3, they survived and

maturation was observed (low IFN- α production and induction of CD83 expression). We observed the activation of pDC by measles virus vaccine in the absence of IL-3, only when we used a high quantity of measles virus vaccine (MOI = 50). At this high measles virus vaccine concentration, we think that enough measles virus vaccine reached the endocytic compartment of pDC to provide a survival/maturation signal, before their apoptosis program was engaged. Thus, when pDC are exposed to measles virus vaccine in the presence of IL-3, the pDC survive and measles virus vaccine is internalized and allows triggering of TLR7 by the viral ssRNA. When pDC are exposed to measles virus vaccine in the absence of IL-3, they undergo apoptosis unless enough measles virus vaccine reaches the endocytic compartment to activate and mature them. Our results explain the contradictory reports in the literature, due to differences in experimental settings. Indeed, we obtained similar results to Schlender and colleagues, who reported that a low quantity of measles virus vaccine Schwarz failed to induce IFN- α by pDC cultured in the absence of IL-3 (30), and to Duhon and colleagues who claimed that measles virus vaccine Schwarz induces high quantities of IFN- α production by pDC in the presence of IL-3 (31). However, our study does not support the claim that measles virus vaccine Schwarz inhibits IFN- α production by pDC (30), as pDC produce IFN- α in the presence of IL-3. Finally, both groups described staining of pDC by a monoclonal antibody to measles virus vaccine hemagglutinin (H), but interpreted the result differently. One group claimed that pDC were infected and amplified the virus (30), whereas the other group concluded that, despite the H protein staining on pDC, measles virus vaccine replication was low. Our results support this latter conclusion, as we did not observe productive infection using MV-eGFP, even at high MOI, in the absence nor presence of IL-3.

We also showed that, in the presence of measles virus vaccine or measles virus vaccine-infected tumor cells, pDC undergo maturation characterized by the upregulation of CD83 molecule expression at the cell surface. In the presence of measles virus vaccine or measles virus vaccine-infected tumor cells, the pDC produce higher quantities of IFN- α in response to high viral load than pDC stimulated with R848 alone. However, these cells do not express as much of the CD40 and CD86 costimulatory molecules. Thus, this maturation phenotype resembles the maturation phenotype induced by HIV infection (34, 35), which activates pDC by the TLR7, as does measles virus vaccine (36). Indeed, it is now clear that, depending on the nature of the TLR agonist used, 2 main pathways of activation can be triggered in human pDC. This dichotomy was first reported by Kerkmann and colleagues, who showed that 2 TLR9 agonists, CpG-A and CpG-B, activate pDC maturation using 2 different pathways (37). More recently, the same dichotomy has been observed for TLR7 agonists (35). Indeed, HIV behaves like CpG-A by triggering TLR7 and the IRF7 signaling pathway in the early endosome of pDC, and by inducing strong production of IFN- α . Our results show that the maturation induced by MV+IL-3 or measles virus

vaccine-infected cells is similar to the activation induced by HIV, suggesting an early endosomal triggering of TLR7 by measles virus vaccine ssRNA. This early endosome activation pathway is compatible with antigen cross-presentation expressed by virus-infected cells, as cross-presentation of viral antigens from infected cells has been shown (21) and cross-presentation of the TAA from measles virus vaccine-infected cells, in our present study. Conversely, Schnurr and colleagues reported that, *in vitro*, pDC, contrary to myeloid dendritic cells, were not able to cross-present a TAA from a full-length protein alone or as an immune complex form (38). However, these authors used a soluble protein and did not use NYESO-1-expressing tumor cells as the antigen source. *In vivo*, antigen cross-presentation by pDC is also controversial. Salio and colleagues reported that murine pDC stimulated by CpG are not able to cross-present antigens, whereas they can mount a T-cell response against endogenous antigens (39). Mouries and colleagues showed, *in vivo* and *in vitro*, also in a murine model, that soluble OVA protein and TLR agonists (CpG or R848) activate pDC to cross-prime OVA to specific CD8⁺ T cells (23). Similarly, presentation and cross-presentation of soluble OVA peptide or whole protein, following TLR9 stimulation by CpG or by infection with influenza virus containing OVA epitopes, was confirmed recently, *in vitro*, by Kool and colleagues (40). Finally, Liu and colleagues reported that intratumoral injection of CpG-A-stimulated pDC to mice bearing B16 melanoma induced a tumor antigen cross-priming, but this cross-priming was conducted by CD11c⁺ dendritic cells, not by pDC (25). We have shown here that, *in vitro*, human pDC exposed to measles virus vaccine-infected tumor cells are able to cross-present NYESO-1 to a CD8⁺ T-cell clone specific for this TAA. We showed that measles virus vaccine-infected tumor cells undergo cell death and are then phagocytosed by pDC. These measles virus vaccine-infected cells are capable of activating pDC without the addition of adjuvants or TLR agonists. It remains to be determined whether this cross-presentation would result in cross-priming *in vivo* as measles virus vaccine activates pDC by the early endosomal pathway, which is thought to be more implicated in IFN- α production than in T-cell stimulatory capacity (41).

The efficiency of measles virus vaccine-based antitumor virotherapy has been shown *in vivo* in different models of human tumor xenografts in immunodeficient mice (8–11). The first clinical trials of measles virus vaccine-based virotherapy have shown encouraging results (13, 14). The efficiency of measles virus vaccine-based virotherapy is likely due to the lysis of tumor cells by the virus. However, a part of its efficiency may also be due to the capacity of measles virus vaccine-infected tumor cells to activate cells of the immune system, notably pDC. Indeed, activation of pDC by TLR agonist in tumor-bearing mice has been shown to induce an antitumor immune response and tumor regression (24, 25, 42). Liu and colleagues showed that murine pDC stimulated by a TLR9 agonist induced natural killer (NK) cell activation and recruitment to the tumor, triggering tumor antigen cross-presentation by CD11c⁺

dendritic cells (25). Drobits and colleagues showed that topical treatment of melanoma tumors in mice with the TLR7 agonist, imiquimod, induced activation and recruitment of pDC into the tumor and caused tumor regression (24). They showed that pDC acquire a cytotoxic activity against tumor cells by secreting TRAIL and granzyme B, in an IFNAR1-dependent mechanism. IFN- α secretion by pDC not only induces an antitumor cytotoxic activity on pDC by an autocrine loop but can also act directly on tumor cells to induce apoptosis (43). Type I IFN also plays a role in the NK activation and is required in a mouse model of NK-cell-dependent tumor rejection (44). Finally, these NK cells probably also participate in the initiation of the antitumor response by stimulating myeloid dendritic cell, as in IFNAR1- and STAT1-deficient mice the antitumor T-cell response failed to develop (45, 46). Thus, our study shows that measles virus vaccine-infected tumor cells induce a high quantity of IFN- α by pDC, which may be favorable for the development of multicell subsets involved in an antitumor immune response. Furthermore, other oncolytic viruses known to activate pDC are being used in clinical trials of antitumor virotherapy, such as vaccinia (47), herpes simplex virus (48) and adenovirus (49). Tumor cells infected by these viruses may also be able to induce IFN- α production and tumor antigen cross-presentation by pDC.

Measles virus vaccine-based antitumor virotherapy is a promising approach for treating cancer through the oncolytic activity of the virus. Furthermore, we show here that measles virus vaccine-infected tumor cells activate the maturation and tumor antigen cross-presentation capacities of human pDC. Thus, measles virus vaccine-based antitumor virotherapy may represent an interesting approach to the recruitment of pDC in the antitumor immune response.

References

- Blechacz B, Russell SJ. Measles virus as an oncolytic vector platform. *Curr Gene Ther* 2008;8:162-75.
- Boisgerault N, Tangy F, Gregoire M. New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play. *Immunotherapy* 2010;2:185-99.
- Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng KW. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res* 2004;64:4919-26.
- Schneider U, von Messling V, Devaux P, Cattaneo R. Efficiency of measles virus entry and dissemination through different receptors. *J Virol* 2002;76:7460-7.
- Adams EM, Brown MC, Nunge M, Krych M, Atkinson JP. Contribution of the repeating domains of membrane cofactor protein (CD46) of the complement system to ligand binding and cofactor activity. *J Immunol* 1991;147:3005-11.
- Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol* 2003;40:109-23.
- Gauvrit A, Brandler S, Sapède-Pérez C, Boisgerault N, Tangy F, Gregoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res* 2008;68:4882-92.
- Peng KW, TenEyck CJ, Galanis E, Kalli KR, Hartmann LC, Russell SJ. Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res* 2002;62:4656-62.
- Peng KW, Ahmann GJ, Pham L, Greipp PR, Cattaneo R, Russell SJ. Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. *Blood* 2001;98:2002-7.
- McDonald CJ, Erlichman C, Ingle JN, Rosales GA, Allen C, Greiner SM, et al. A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006;99:177-84.
- Blechacz B, Splinter PL, Greiner S, Myers R, Peng KW, Federspiel MJ, et al. Engineered measles virus as a novel oncolytic viral therapy system for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2006;44:1465-77.
- Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, Hadac E, Jennings V, Scott K, et al. Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther* 2013;20:7-15.
- Heinzerling L, Kunzi V, Oberholzer PA, Kundig T, Naim H, Dummer R. Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses *in vivo* and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood* 2005;106:2287-94.
- Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, Barrette BA, et al. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res* 2010;70:875-82.
- Msaouel P, Iankov ID, Dispenzieri A, Galanis E. Attenuated oncolytic measles virus strains as cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13:1732-41.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: N. Boisgerault, F. Tangy, J.-F. Fonteneau, M. Gregoire

Development of methodology: J.-B. Guillaume, N. Boisgerault, J. Ménager, C. Combredet, J.-F. Fonteneau, M. Gregoire

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): J.-B. Guillaume, N. Boisgerault, D. Roulois, C. Combredet, F. Tangy, J.-F. Fonteneau

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): J.-B. Guillaume, J. Ménager, J.-F. Fonteneau, M. Gregoire

Writing, review, and/or revision of the manuscript: J.-B. Guillaume, J.-F. Fonteneau, M. Gregoire

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): J. Ménager, M. Gregoire

Study supervision: J.-F. Fonteneau, M. Gregoire

Acknowledgments

The authors thank Delphine Coulais and Clarisse Panterne for their technical assistance and the Platform of Clinical Transfer and Development for the PBMC and pDC facilities. The authors also thank Philippe Hulin and the cellular and tissular core facility of Nantes University (MicroPiCell) for their expertise in confocal microscopy; Juliette Desfrancois and the core facilities of flow cytometry; and Dr. Yves Delneste and Pascale Jeannin for their critical discussion of the article.

Grant Support

This study was financed by INSERM, La ligue régionale grand ouest contre le Cancer (CSIRGO), the Association pour la recherche contre le cancer (ARC), the Nantes Hospital, and the ARSMESO44 association.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received August 20, 2012; revised November 30, 2012; accepted December 21, 2012; published OnlineFirst January 21, 2013.

16. Kunzi V, Oberholzer PA, Heinzerling L, Dummer R, Naim HY. Recombinant measles virus induces cytolysis of cutaneous T-cell lymphoma *in vitro* and *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2006;126:2525–32.
17. Grote D, Cattaneo R, Fielding AK. Neutrophils contribute to the measles virus-induced antitumor effect: enhancement by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression. *Cancer Res* 2003;63:6463–8.
18. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;8:594–606.
19. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, et al. Activation of influenza virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003;101:3520–6.
20. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sorensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M, et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol* 2008;9:551–7.
21. Hoeffel G, Ripoche AC, Matheoud D, Nascimbeni M, Escriou N, Lebon P, et al. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2007;27:481–92.
22. Lui G, Manches O, Angel J, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS ONE* 2009;4:e7111.
23. Mouries J, Moron G, Schlecht G, Escriou N, Dadaglio G, Leclerc C. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells *in vivo* after TLR activation. *Blood* 2008;112:3713–22.
24. Drobits B, Holcman M, Amberg N, Swiecki M, Grundtner R, Hammer M, et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest* 2012;122:575–85.
25. Liu C, Lou Y, Lizee G, Qin H, Liu S, Rabinovich B, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1165–75.
26. Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, Sagan C, Cellerin L, Padieu M, et al. Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol* 2011;178:1033–42.
27. Adams S, Robbins FM, Chen D, Wagage D, Holbeck SL, Morse HC III, et al. HLA class I and II genotype of the NCI-60 cell lines. *J Transl Med* 2005;3:11.
28. Coulais D, Pantere C, Fonteneau JF, Gregoire M. Purification of circulating plasmacytoid dendritic cells using counterflow centrifugal elutriation and immunomagnetic beads. *Cytotherapy* 2012;14:887–96.
29. Fonteneau JF, Larsson M, Somersan S, Sanders C, Munz C, Kwok WW, et al. 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* 2001;258:111–26.
30. Schlender J, Hornung V, Finke S, Gunthner-Biller M, Marozin S, Brzozka K, et al. Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol* 2005;79:5507–15.
31. Duhon T, Herschke F, Azocar O, Druelle J, Plumet S, Delprat C, et al. Cellular receptors, differentiation and endocytosis requirements are key factors for type I IFN response by human epithelial, conventional and plasmacytoid dendritic infected cells by measles virus. *Virus Res* 2010;152:115–25.
32. Reizis B, Colonna M, Trinchieri G, Barrat F, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? *Nat Rev Immunol* 2011;11:558–65.
33. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005;202:1131–9.
34. Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, McKenna K, Dasilva I, Amara A, et al. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 2004;78:5223–32.
35. O'Brien M, Manches O, Sabado RL, Baranda SJ, Wang Y, Marie I, et al. Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN-alpha-producing and partially matured phenotype. *J Clin Invest* 2011;121:1088–101.
36. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 2005;115:3265–75.
37. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2003;170:4465–74.
38. Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, Jenderek C, et al. Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 2005;105:2465–72.
39. Salio M, Palmowski MJ, Atzberger A, Hermans IF, Cerundolo V. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of *in vivo* priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp Med* 2004;199:567–79.
40. Kool M, Geurtsvankessel C, Muskens F, Madeira FB, van Nimwegen M, Kuipers H, et al. Facilitated antigen uptake and timed exposure to TLR ligands dictate the antigen-presenting potential of plasmacytoid DCs. *J Leukoc Biol* 2011;90:1177–90.
41. Jaehn PS, Zaenker KS, Schmitz J, Dzionek A. Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon. *Eur J Immunol* 2008;38:1822–32.
42. Palamara F, Meindl S, Holcman M, Luhrs P, Stingl G, Sillia M. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol* 2004;173:3051–61.
43. Thyrell L, Erickson S, Zhivotovskiy B, Pokrovskaja K, Sangfelt O, Castro J, et al. Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* 2002;21:1251–62.
44. Swann JB, Hayakawa Y, Zerafa N, Sheehan KC, Scott B, Schreiber RD, et al. Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J Immunol* 2007;178:7540–9.
45. Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, et al. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* 2011;208:1989–2003.
46. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, et al. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8[alpha]⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 2011;208:2005–16.
47. Kim JH, Oh JY, Park BH, Lee DE, Kim JS, Park HE, et al. Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol Ther* 2006;14:361–70.
48. Kaufman HL, Bines SD. OPTIM trial: a phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol* 2010;6:941–9.
49. Ramesh N, Ge Y, Ennist DL, Zhu M, Mina M, Ganesh S, et al. CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:305–13.

B) Article V : Cross-Presentation of Synthetic Long Peptides by Human Dendritic Cells: A Process Dependent on ERAD Component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1

Jérémie Ménager, Frédéric Ebstein, Romain Oger, Philippe Hulin, Steven Nedellec, Eric Duverger, Andrea Lehmann, Peter-Michael Kloetzel, Francine Jotereau, Yannick Guilloux

PLOS ONE (2014) Volume 9, Issue 2

Cross-Presentation of Synthetic Long Peptides by Human Dendritic Cells: A Process Dependent on ERAD Component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1

J er mie M nager^{1,2,3}, Frédéric Ebstein⁴, Romain Oger^{1,2,3}, Philippe Hulin^{1,3}, Steven Nedellec^{1,3}, Eric Duverger⁵, Andrea Lehmann⁴, Peter-Michael Kloetzel⁴, Francine Jotereau^{1,2,3}, Yannick Guilloux^{1,2,3*}

1 INSERM U892, Nantes, France, **2** Université de Nantes, Nantes, France, **3** CNRS, UMR 6299, Nantes, France, **4** Institut de Biochimie, Charit  University Hospital, Humboldt University, Berlin, Germany, **5** Glycobiologie, ICOA, Université d'Orléans, Orléans, France

Abstract

Antitumor vaccination using synthetic long peptides (SLP) is an additional therapeutic strategy currently under development. It aims to activate tumor-specific CD8⁺ CTL by professional APCs such as DCs. DCs can activate T lymphocytes by MHC class I presentation of exogenous antigens - a process referred to as "cross-presentation". Until recently, the intracellular mechanisms involved in cross-presentation of soluble antigens have been unclear. Here, we characterize the cross-presentation pathway of SLP Melan-A₁₆₋₄₀ containing the HLA-A2-restricted epitope₂₆₋₃₅ (A27L) in human DCs. Using confocal microscopy and specific inhibitors, we show that SLP₁₆₋₄₀ is rapidly taken up by DC and follows a classical TAP- and proteasome-dependent cross-presentation pathway. Our data support a role for the ER-associated degradation machinery (ERAD)-related protein p97/VCP in the transport of SLP₁₆₋₄₀ from early endosomes to the cytoplasm but formally exclude both sec61 and Derlin-1 as possible retro-translocation channels for cross-presentation. In addition, we show that generation of the Melan-A₂₆₋₃₅ peptide from the SLP₁₆₋₄₀ was absolutely not influenced by the proteasome subunit composition in DC. Altogether, our findings propose a model for cross-presentation of SLP which tends to enlarge the repertoire of potential candidates for retro-translocation of exogenous antigens to the cytosol.

Citation: Ménager J, Ebstein F, Oger R, Hulin P, Nedellec S, et al. (2014) Cross-Presentation of Synthetic Long Peptides by Human Dendritic Cells: A Process Dependent on ERAD Component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1. PLoS ONE 9(2): e89897. doi:10.1371/journal.pone.0089897

Editor: Jean Kanellopoulos, University Paris Sud, France

Received: October 21, 2013; **Accepted:** January 25, 2014; **Published:** February 27, 2014

Copyright:   2014 Ménager et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer and Comit  44, Institut National de la Santé et de la Recherche M dical, Institut National du Cancer (PL074), and the European Network for the Identification and Validation of Antigens and Biomarkers in Cancer and their Application in Clinical Tumor Immunology Network (503306). JM was supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Yannick.guilloux@univ-nantes.fr

Introduction

The notion that the immune system can recognize and mount a response against tumors was initially postulated by Coley [1]. The development of immune responses against tumors *in vivo* involves the presentation of target structures on the cell surface of cancer cells, namely, tumor-associated antigens (TAA). These molecules must be presented effectively to effector cells of the immune system (NK, LT CD8⁺, CD4⁺,...) for the establishment of a lasting and beneficial immune response. Although anti-tumor immunity requires both innate and adaptive immune responses, it is generally accepted that CD8⁺ CTL are the most effective antitumor effector cells [2,3].

The adaptive immune response depending on CTL involves TAA expression by tumor cells and requires TAA presentation by professional APCs. Among professional APC, DCs possess the unique ability, via co-stimulatory signals, to activate naive T lymphocytes in secondary lymphoid organs [4,5]. Indeed, DCs take up extracellular TAA, process them intracellularly into antigenic peptides and load them onto major histocompatibility class I and class II molecules (MHC). The process whereby an exogenous antigen is acquired, processed and presented as peptide bound on MHC class I is known as "cross-presentation" [6,7,8].

Many compartments are involved in cross-presentation of soluble antigens [9] that critically depend on the nature of the antigen. Early endosomes internalize soluble antigens [10], the ER and Golgi apparatus are involved in presentation of endogenous antigens but can participate in the processing of antigens internalized by DCs [7,11]. Furthermore, lysosomes have been recently reported to participate in cross-presentation of some antigens [12].

Current immunotherapy strategies are designed to provide either passive or active immunity against malignancies by harnessing the immune system to target tumors [13]. Among the various therapies, one common approach is therapeutic vaccination consisting in the injection of antigen from cancer cells in order to stimulate specific anti-tumor immunity. Many immunotherapy strategies, in particular those involving DCs, are under development [4,14]. However, all of these strategies of therapeutic vaccination have so far exhibited low clinical benefit for patients [15].

A new immunotherapy strategy has emerged based on synthetic long peptides (SLP). SLP are usually 25–50 amino acids long and contain antigenic epitopes that require endocytosis and processing by professional APC such as DCs [15,16]. Indeed, SLPs cannot be

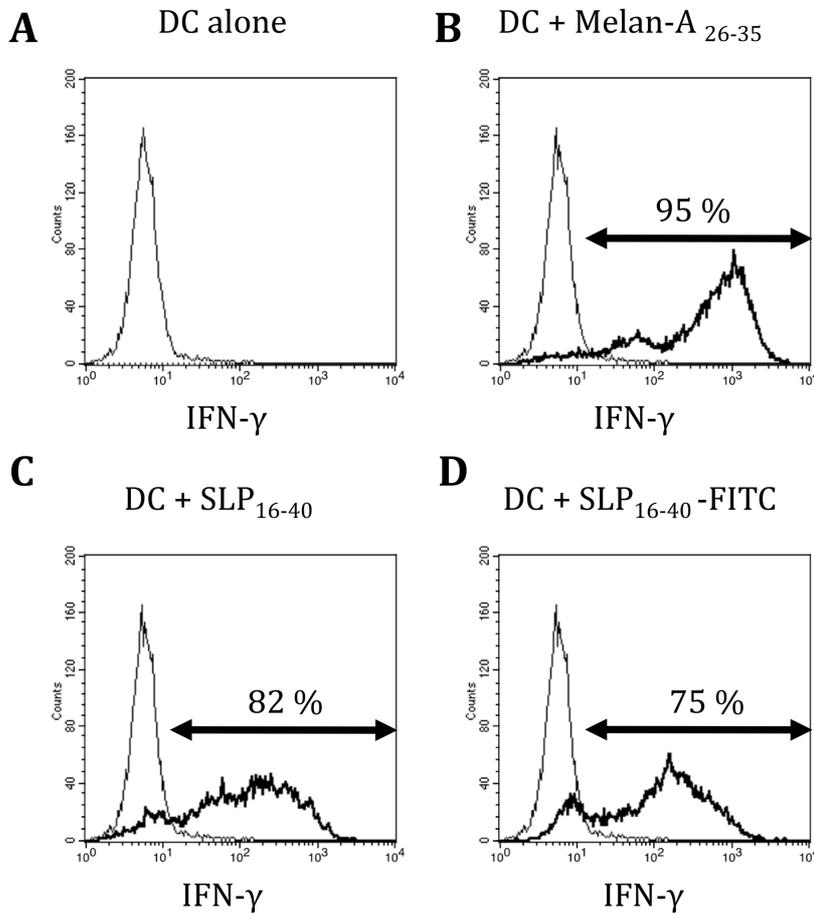


Figure 1. SLP_{16–40}-FITC is cross-presented efficiently by the DC. Flow cytometry of DC activation of the 10C10 CD8⁺ T-cell clone 10C10. DC were pulsed for 3 h in the presence of short peptide MelanA_{26–35}, SLP_{16–40}, or SLP_{16–40}-FITC before co-culture with the 10C10 clone at a 1:1 cell ratio. The histogram represents the fluorescence emitted by the 10C10 clone stained with anti-IFN- γ . doi:10.1371/journal.pone.0089897.g001

loaded exogenously on MHC-I and their processing requires a cross-presentation mechanism restricted to DCs for induction of a CTL response, thereby inducing anti-tumor immunity rather than tolerance [4,17]. Several studies and clinical trials have been performed using SLP as vaccines with promising results against vulvar intraepithelial neoplasia lesions, cervical cancer and ovarian cancer [18,19,20,21].

In this study, we designed a SLP from the Melan-A/MART-1 TAA. This SLP of 25 amino acids covers positions 16 to 40 of Melan-A/MART-1 (SLP_{16–40}) and includes the A27L modification which allows a better anchoring of the immunodominant Melan-A/MART-1 26–35 epitope to the HLA-A*0201 molecule [22]. This SLP_{16–40} includes epitopes recognized by HLA class I restricted T-cell clones [23,24]. A previous study, published by our group had shown that this SLP_{16–40} and its natural homologue are efficiently and durably cross-presented by DCs [25]. In addition our group has shown that cross-presentation of modified SLP_{16–40} results in efficient priming of a CD8 tumor reactive T cell repertoire. Nonetheless, to the best of our knowledge, the cellular

mechanism involved in this cross-presentation by human DCs remains to be elucidated. Here, we characterize the cross-presentation pathway of SLP_{16–40}. We show that it is dependent on early endosomes, followed by the ERAD pathway: retro-translocation into the cytosol and poly-ubiquitinylation of the SLP for proteasome degradation. Altogether, our results define the processing mechanism of SLP_{16–40} by DCs.

Materials and Methods

Culture Medium

Culture medium RPMI 1640 (Gibco BLR, Gaithersburg, MD) was supplemented with penicillin-streptomycin (100 U/ml and 100 μ g/ml respectively; Life Technologies) and L-Glutamine (2 mM) (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) and either with 1% human plasma, 8% pooled human serum (pHS) or 10% fetal calf serum (FCS, Eurobio, Les Ulis, France).

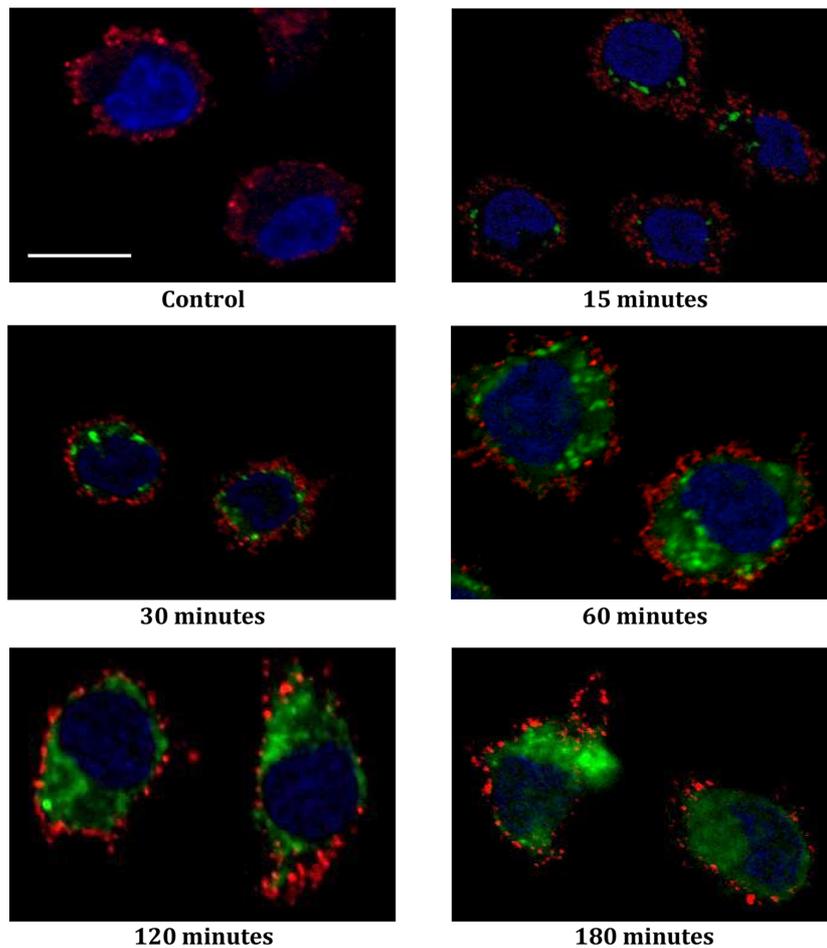


Figure 2. SLP₁₆₋₄₀-FITC fluorescence monitored by confocal microscopy. Immunofluorescence microscopy. Kinetics of internalization of SLP₁₆₋₄₀-FITC (green) by DCs. DCs were stained at the cell membrane with antibody w6-32 (red) and nuclei were counterstained with DRAQ 5 (blue). All images represent one single optical section. Step size of 0,5 μm thick. Original magnification, X60. Data are representative of two independent experiments. Scale bar represent a distance of 5 μm .
doi:10.1371/journal.pone.0089897.g002

Cell Culture

HLA-A2 Monocytes were purified using centrifugal counter-flow elutriation (Clinical Transfer Facility CICBT0503, Dr. M. Grégoire, Nantes) and cultured for 4.5 days in RPMI 1640 2% human albumin in the presence of 1000 U/mL GM-CSF (Cellgenix) and 200 U/mL IL-4 (Cellgenix); MoDCs medium [26].

Maturation of Mo-DCs was induced by addition of 1000 U/mL TNF α (Cellgenix) and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ poly I:C (Sigma) to the culture (Maturation MoDCs medium). Each preparation of DC was checked for purity and differentiation by flow cytometry using the markers indicated below.

Human DC phenotype was determined by the expression of CD14, CD40, CD80, CD83 and HLA-DR (data not shown).

In cross presentation assays 10^6 DCs were plated per well in 24-well plates- pretreated with 3% polyHema (Sigma) for 16 hr to facilitate the harvest of DCs after the antigenic pulse.

The 10C10 clone was amplified as previously described [27].

Synthetic Peptides

Synthetic long peptide Melan-A/MART-1₁₆₋₄₀ (GHGHSYTTAEELAGIGILTVILGVV) (SLP₁₆₋₄₀) and synthetic short peptide Melan-A/MART-1₂₆₋₃₅ with the A27L modification (ELAGIGILTV), were synthesized with purity greater than 95% and purchased from Millegen (Labège, France). Synthetic fluorescent long peptides Melan-A/MART-1₁₆₋₄₀-FITC (GHGHSYTTAEELAGIGILTVILGVV-FITC) (SLP₁₆₋₄₀-FITC) and FITC-Melan-A/MART-1₁₆₋₄₀ (FITC-GHGHSYTTAEELAGIGILTVILGVV) (FITC-SLP₁₆₋₄₀), were produced with purity greater than 95%. All the peptides were reconstituted at 10 mM in DMSO.

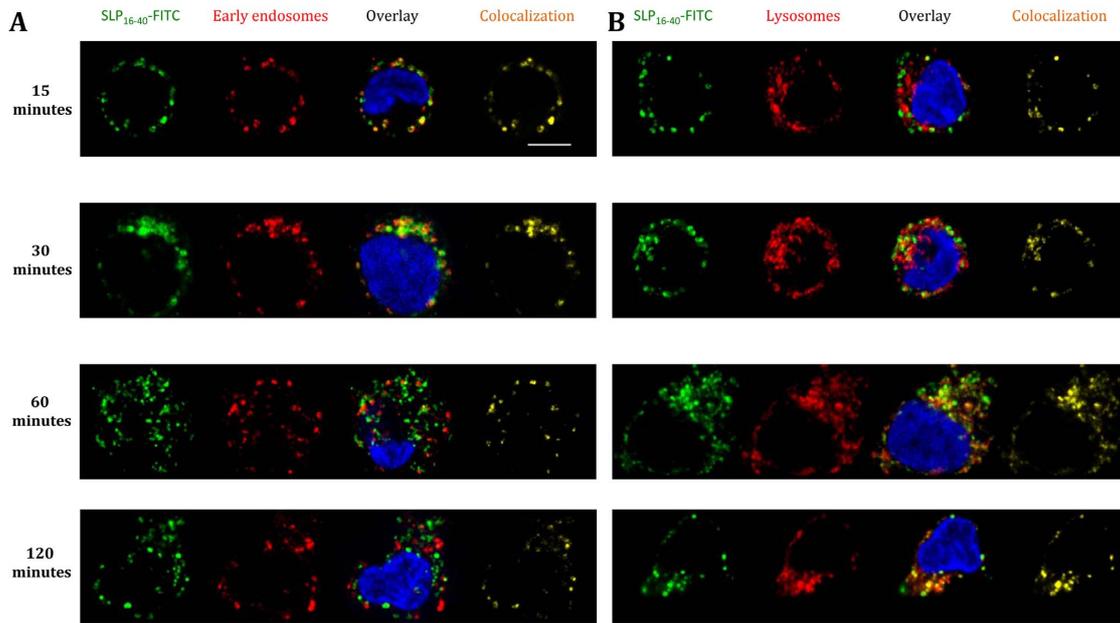


Figure 3. Study of SLP₁₆₋₄₀-FITC colocalization in DCs : colocalization in early endosomes and lysosomes. (A) Immunofluorescence microscopy. Kinetics of internalization of DCs incubated with SLP₁₆₋₄₀-FITC (green), 15, 30, 60 or 120 minutes after pulse. DCs are stained at the early endosomes with antibody anti-EEA-1 (red) and the nuclei are counterstained with DRAQ 5 (blue). All image represent one single optical section. Step size of 0,5 μm thick. Original magnification, X60. Single scans are representative for multiple cells analysed in at least 2 experiments. (B) Immunofluorescence microscopy. Kinetics of internalization of DCs incubated with SLP₁₆₋₄₀-FITC (green), 15, 30, 60 or 120 minutes after pulse. DCs are stained at the lysosomes with antibody LAMP-1 (red) and the nuclei are counterstained with DRAQ 5 (blue). All image represent one single optical section. Step size of 0,5 μm thick. Original magnification, X60. Single scans are representative for multiple cells analysed in at least 2 experiments. Scale bar represent a distance of 5 μm . doi:10.1371/journal.pone.0089897.g003

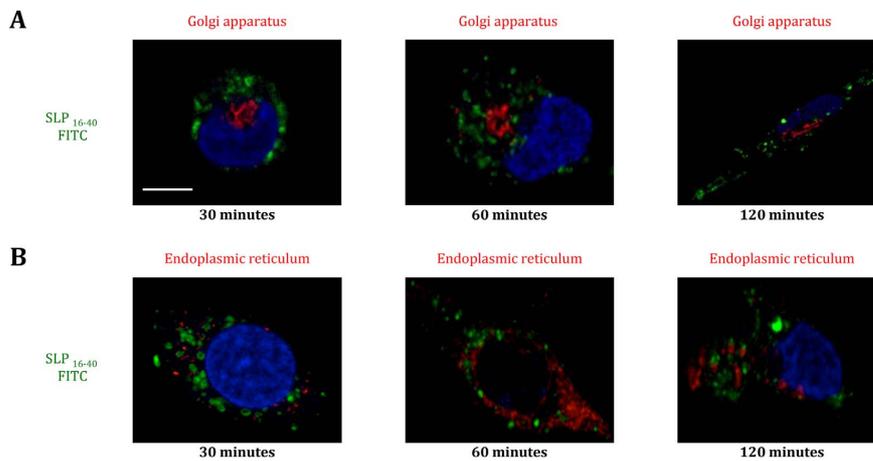


Figure 4. Study of SLP₁₆₋₄₀-FITC colocalization in DCs: no colocalization in Golgi and ER. (A) Immunofluorescence microscopy. Kinetics of internalization of DCs incubated with SLP₁₆₋₄₀-FITC (green), 30, 60 or 120 minutes after pulse. DCs are stained at the Golgi with antibody anti-GM130 (red) and the nuclei are counterstained with DRAQ 5 (blue). All image represent one single optical section. Step size of 0,5 μm thick. Original magnification, X60. Data are representative of two independent experiments. (B) Immunofluorescence microscopy. Kinetics of internalization of DCs incubated with SLP₁₆₋₄₀-FITC (green), 30, 60 or 120 minutes after pulse. DCs are stained at the ER with antibody anti-calreticulin (red) and the nuclei are counterstained with DRAQ 5 (blue). All image represent one single optical section. Step size of 0,5 μm thick. Original magnification, X60. Data are representative of two independent experiments. Scale bar represent a distance of 5 μm . doi:10.1371/journal.pone.0089897.g004

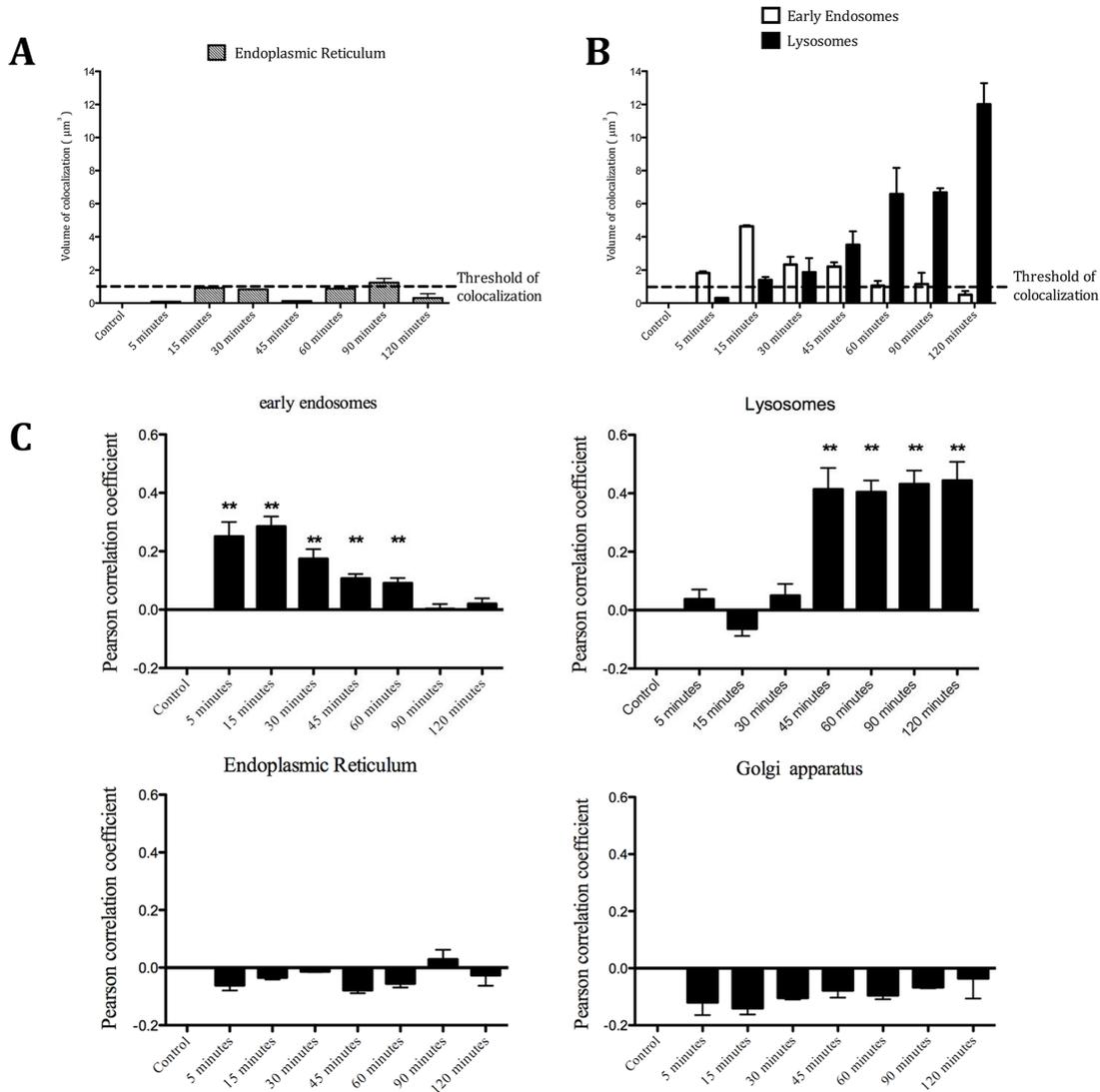


Figure 5. Kinetics of internalization of SLP₁₆₋₄₀ in DCs. (A) Volume measurement of green fluorescence (SLP₁₆₋₄₀-FITC) with red fluorescence (ER) colocalization at each time point. For each point, average volume was determined on five different cells of two independent experiments. (B) Volume measurement of green fluorescence (SLP₁₆₋₄₀-FITC) with red fluorescence colocalization (early endosomes or lysosomes) at each time point. Representations of colocalization in early endosomes are in white bars and colocalization in lysosomes are in black bars. For each point and each compartment, average volume was determined in five different cells from two independent experiments. (C) The colocalization of SLP₁₆₋₄₀-FITC immunofluorescence with intracellular compartments (early endosomes, lysosomes, ER and Golgi apparatus) was quantified by measuring the Pearson correlation coefficient (Rr) with Velocity software. A Pearson correlation of 1 indicates complete colocalization, a value of 0 indicates no specific colocalization and a value of -1 indicates a perfect but inverse correlation (exclusion). Measurements of the Pearson correlation coefficient indicate a reasonable degree of partial colocalization of SLP₁₆₋₄₀ with early endosomes between 5 and 60 minutes and with lysosomes between 45 and 120 minutes. The Pearson correlation coefficient of SLP₁₆₋₄₀ with ER and Golgi apparatus lysosomes indicates no specific colocalization. The Pearson correlation coefficient was measured with n = 5 cells. Statistical significance of colocalization was compared to the null hypothesis of no specific colocalization (Pearson correlation coefficient value of 0). doi:10.1371/journal.pone.0089897.g005

Immunofluorescent Staining, Flow Cytometry Analysis and Elisa Assay

CD8 T cell activation by DCs loaded in vitro with SLP₁₆₋₄₀ or SP₂₆₋₃₅ peptides was determined by using APC-labeled anti-

CD8⁺mAb and PE-labeled anti-IFN γ . Mo-DCs were stained by PKH-67 according to the manufacturer's recommendations (Sigma) in order to exclude them from the T cell gate.

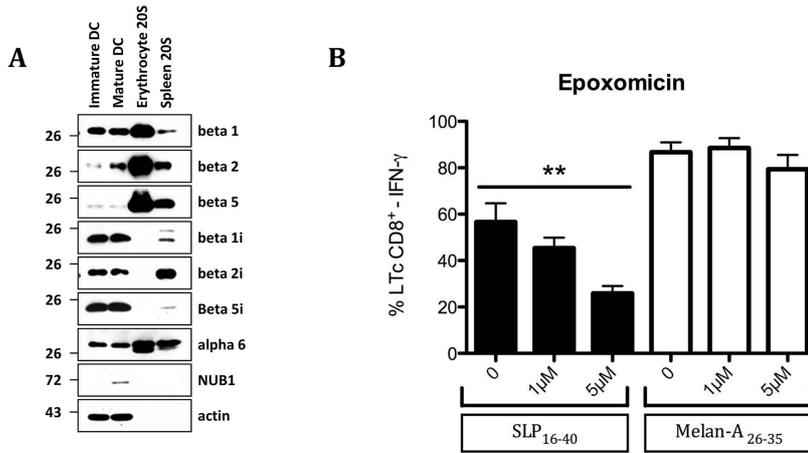


Figure 6. Immature and mature DC express mixed-type proteasomes. (A) Untreated day 5-immature DC and DC treated with LPS (1 μg/ml) for 24 hours were analysed for their proteasome content by western-blotting using antibodies against β1, β2, β5, β1i, β2i, β5i, as indicated. Purified 26 proteasomes (250 ng) from erythrocytes (standard proteasome) and spleen (mixture of standard and immunoproteasome) were used as sources to ensure antibody specificity. To control for equal loading, proteins were subjected to western blotting using the anti-β-actin antibody. (B) Flow cytometry of DC recognition by CD8⁺ T-cell clone 10C10. DCs were treated with Epoxomicin (1 and 5 μM) for 30 min, then DCs were pulsed for 3 h in the presence of short peptide MelanA_{26–35}, or SLP_{16–40}, and inhibitor before co-culture with the 10C10 clone at a 1:1 cell ratio. Data are representative of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney test and values in the presence of inhibitor were significantly different (p<0,04). doi:10.1371/journal.pone.0089897.g006

For intracytoplasmic IFN γ staining, cells were stained at 4°C for 20 minutes, with anti-CD8⁺ Ab. Then cells were fixed 10 minutes at room temperature in PBS 4% paraformaldehyde (Sigma). Anti-IFN γ was added to fixed cells and incubated for 30 minutes at room temperature. Reagent dilutions and washes were done with PBS containing 0.1% BSA and 0.1% saponin (Sigma). After

staining, immunofluorescence was analyzed on a FACS calibur (BD Biosciences).

Alternatively, activation of the 10C10 CTL clone was evaluated by determining the IFN γ content in the supernatant in duplicates in a 16-hr CTL assay using a commercially available ELISA kit (BD Biosciences).

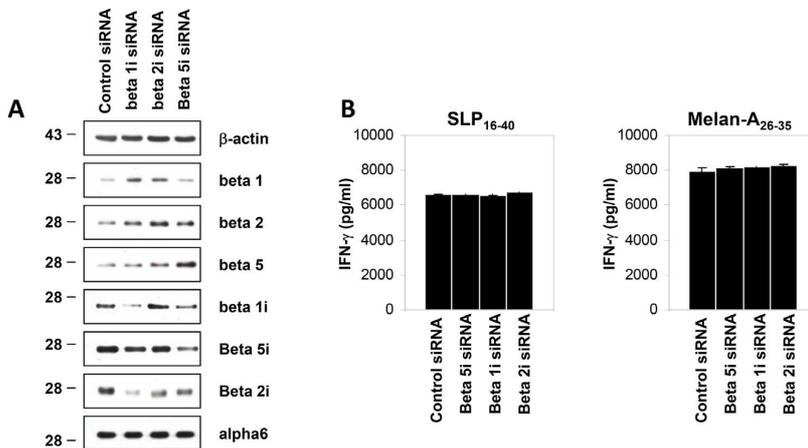


Figure 7. Effect of siRNA depletion of each of the inducible proteasome subunit β1i, β2i, β5i on the DC-mediated cross-presentation of the SLP 16–40. (A) DC were transfected with 1 μM of control siRNA or β1i, β2i, β5i -targeting siRNA for 72 hours. The knockdown of the above-stated inducible subunits as well as its impact on the steady-state level of each of the standard proteasome subunits (β1, β2, β5) was analysed by western-blotting using specific antibodies, as indicated. Antibody against b-actin was used to ensure an equal protein loading. (B) IFN-g production of the LT CD8+10C10 responded to β1i, β2i, β5i -depleted DC pulsed with either SLP16–40 or Melan- A26–35. All data are shown as means +/– SD and are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0089897.g007

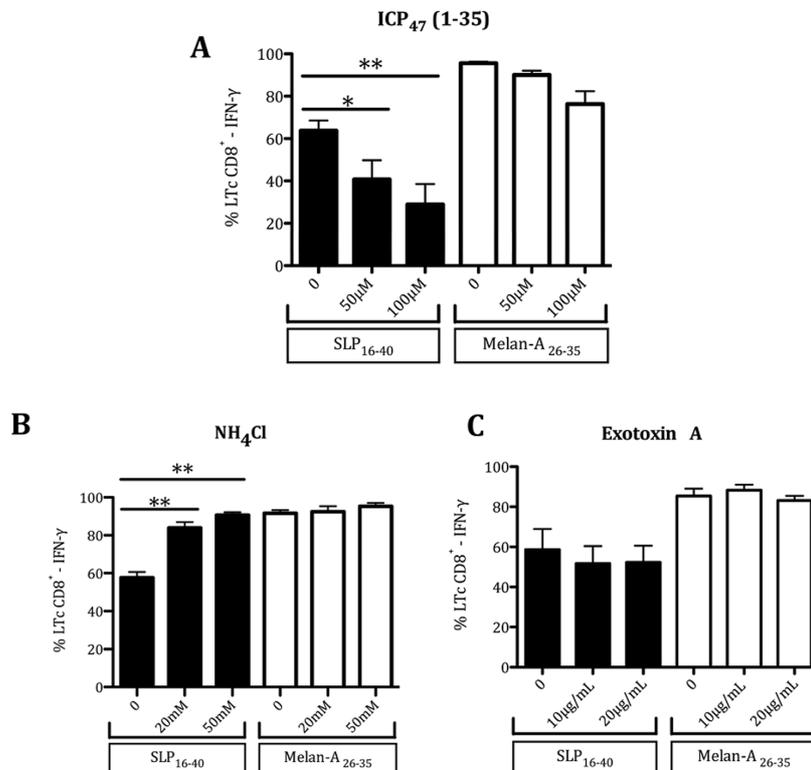


Figure 8. Effects of different inhibitors on SLP₁₆₋₄₀ cross-presentation. (A) TAP transport: Flow cytometry of DC recognition by LT CD8⁺10C10. DCs were treated with inhibitor, ICP₄₇ (50 and 100 μM) for 30 min, then DCs were pulsed for 3 h with the short peptide Melan-A₂₆₋₃₅, or SLP₁₆₋₄₀, and in the presence of the inhibitor before co-culture with the LT CD8⁺10C10 at a 1:1 cell ratio. Data are representative of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney's test and values in the presence of inhibitor were significantly different ($p < 0.04$). The molecular mechanisms involved in cross-presentation of SLP₁₆₋₄₀. Flow cytometry of DC recognition by LT CD8⁺10C10. DCs were treated with inhibitor, (B) NH₄Cl (20 mM and 50 mM) or (C) ExoA (10 and 20 μg/ml) for 30 min, then DCs were pulsed for 3 h in the presence of short peptide Melan-A₂₆₋₃₅, or SLP₁₆₋₄₀, and inhibitor before co-culture with the LT CD8⁺10C10 at a 1:1 cell ratio. Data are representative of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney's test and values in the presence of inhibitor were significantly different ($p < 0.04$). doi:10.1371/journal.pone.0089897.g008

SDS-PAGE and Western Blotting

For the preparation of whole cell lysates, cells were lysed in a buffer containing 50 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% glycerol and 0.1% NP40. Protein concentrations in lysates were determined using a bicinchoninic acid assay (BCA). Five to twenty μg of whole-cell lysates were separated on a 15% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF membrane. In some experiments 200 ng of purified 20S proteasome from erythrocytes (Standard Proteasome) or spleen (Standard Proteasome and ImmunoProteasome) were loaded as internal controls. The blots were probed with antibodies to β1i, β5i, Beta1, Beta2, Beta5, Alpha6 (all purchased from Enzo life sciences), β2i (K65/4, laboratory stock), p97/VCP (MA3-004, Dianova), Derlin-1, sec61-a and to β-actin (Santa Cruz Biotechnology) to confirm that equal amounts were present in every lane. Bound antibodies were visualized with ECL chemiluminescence (Roche).

Antigenic Pulse and Chase, Drug Treatment of DC or SLP₁₆₋₄₀ Cross-presentation Assays

SLP₁₆₋₄₀ was pulsed at 10 μM, 37°C for 3 h on DCs in RPMI supplemented with 2% human albumin, 1000 U/mL GM-CSF, 200 U/mL recombinant human IL-4, 1000 U/mL TNFα and 50 μg/mL poly I:C. Following the pulse, 1.10⁵ DC were plated per well in 96-well round-bottom plates, fixed with 0.01% glutaraldehyde containing PBS for 1 min then washed three times in RPMI. DCs were co-cultured with T-cells in the presence of 10 μg/mL Brefeldin A (BFA).

In some assays, DCs were incubated for 30 minutes before and throughout the antigen pulse period with Cytochalasin D (Sigma), ICP₄₇ (1-35) (Millegen (Labege, France), *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (Sigma), NH₄Cl (Sigma), or Epoxomicin (Sigma).

1.10⁵ pulsed-DCs were co-cultured for 6 h with the 10C10 clone using 1.10⁵ T-cells per well, in a final volume of 100 μL of RPMI containing 8% human serum and 10 μg/ml brefeldin A (Sigma, St Louis MO, USA). The DC/T cell ratio was 1:1.

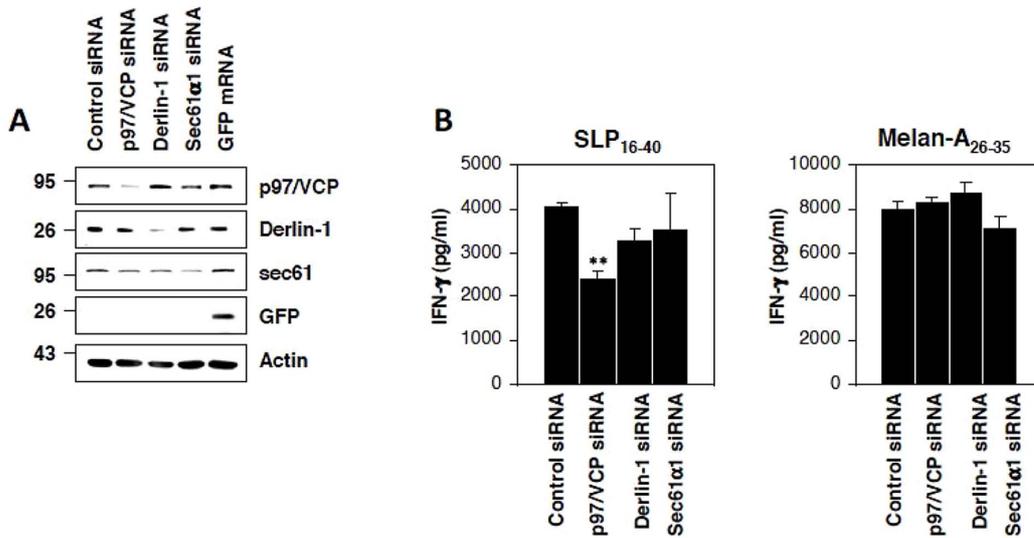


Figure 9. Gene silencing of the ERAD-related component p97/VCP substantially impairs cross-presentation of the SLP16–40. (A) Day5-immature HLA-A2+ DC were electroporated with 1 μ M of either control siRNA or siRNA against p97/VCP, Derlin-1 or Sec61a1, as indicated. The steady-state protein level of each of the targeted gene was determined by western-blot analysis 72 hours later. To control for equal loading, samples were subjected to western blotting using the anti-b-actin antibody. (B) The Melan-A26–35 CTL response against siRNAtreated DC loaded with either 10 μ M of SLP16–40 or 1 μ M of Melan-A26–35 (as a positive control) was examined using an IFN- γ ELISA. All data are shown as means \pm SD and are representative of three independent experiments. **p<0.01 (t-Test). doi:10.1371/journal.pone.0089897.g009

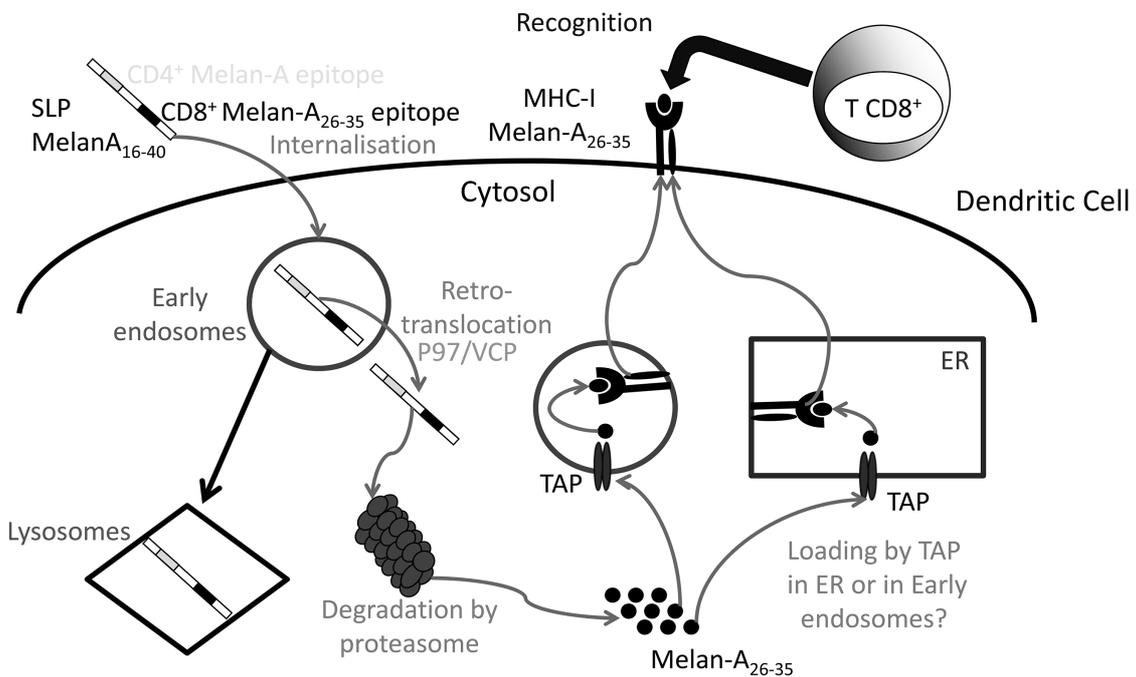


Figure 10. Putative cross-presentation mechanisms of SLP Melan-A₁₆₋₄₀. doi:10.1371/journal.pone.0089897.g010

siRNA Transfection of DC

ON-TARGET plus SMART pool of interfering RNA (Dharmacon) were used to knock down p97/VCP (L-008727-00), sec61A1 (L-021503-00), Derlin-1 (E-010733-00), β 1i (L-006023-00), β 2i (L-006019-00) and β 5i (L-006022-00). ON-TARGET plus nontargeting pool of siRNA with random nucleotides (D-001810-10) was used in each experiment as a negative control. For siRNA transfection, 4×10^7 cells were resuspended in 100 μ l Opti-MEM without phenol red (Invitrogen) and transferred into a 4-mm electroporation cuvette (Biorad) with 1000 nmol siRNA duplex. The electroporator (Genepulser, Biorad) used a square-wave pulse of 500 V for 1 ms. Cells were then immediately transferred into 4 ml of MoDCs medium.

Confocal Microscopy

The mouse IgG1-mAb used in confocal microscopy were anti-HLA class-I (W6–32, produced in our laboratory), anti-GM130, anti-EEA-1, anti-LAMP-1 and anti-calreticulin (Becton Dickinson), that target respectively HLA-A,B,C and the following subcellular compartments - Golgi apparatus, early endosomes, lysosomes and ER.

DCs were pulsed for 0–48 h with SLP Melan-A_{16–40} FITC (10 μ M) in MoDCs maturation medium. Following the pulse, DCs were fixed in a solution of 2% formaldehyde (Sigma) and stained at room temperature for 2 h either by anti-HLA or, after permeabilization in a solution of PBS containing 0.05% triton X100 and 0.05% Tween, by the mouse IgG1-mAb, anti-GM130, anti-EEA-1, anti-LAMP-1 or anti-calreticulin. Cells were washed 3 times in PBS and secondary Alexa-568 anti-mouse IgG1 (Invitrogen) was used as detection reagent. Cells were washed and nuclei were visualized with DRAQ 5 (AXXORA). Isotype control antibodies were used in all confocal microscopy experiments to confirm specificity of antibody staining. Coverslips were mount in prolong gold antifade reagent (Invitrogen) and examined with confocal microscopy. Z-series of multiple images were acquired from DCs representative of most cells in each culture.

Cell fluorescence was visualized by confocal microscopy using a NIKON A1, R, SI instrument with APO VC, X60 NA: 1.4 oil immersion objective. An argon laser at 488 nm and diode laser at 561 nm excited the fluorescence of FITC and Alexa 568 respectively; fluorescence emission was collected respectively at 525/15 for FITC and 590/15 for Alexa-568. All images were acquired at a size of 1024 pixel by 1024 pixel and had a lateral resolution of 0.21 μ m by pixel. Z-step numbers and rank were chosen according to Nyquist theorem where $Z = 1/3$ FWHM (Full Width at Half Maximum): typically 0.25 μ m for Z-range.

For analysis, Image J software was used. Colocalization volumes were calculated with the 3D object counter plugin [28].

Quantitation of the colocalization of SLP_{16–40} with the different subcellular compartments (Golgi apparatus, early endosomes, lysosomes or ER) was performed by calculating the Pearson correlation coefficient, Rr, using Volocity software (Version 6.1.1 from PerkinElmer Life Sciences). An Rr value of 1 indicates complete colocalization, an Rr value of 0 indicates no specific colocalization, and an Rr value of –1 indicates a perfect but inverse correlation (exclusion). The green and red fluorescence have been determined by performing thresholding using the 3D object counter plugin default threshold method.

Statistical Analysis

For the analysis of experimental data, quantitative data was compared by the Mann-Whitney U test (Graph Pad Prism 5).

Results

Efficient Cross-presentation of SLP Melan-A_{16–40} FITC Peptides by DC

In previous studies, others and we showed that the SLP_{15–40} or SLP_{16–40} are cross-presented by DC [25,29]. To study the cellular mechanisms involved in cross-presentation of the analog long peptide Melan-A_{16–40} A27L, a SLP, which includes the 10-mer Melan-A/Mart-1_{26–35} epitope, was synthesized and coupled with FITC either to the N-terminus (FITC-SLP_{16–40}) or to the C-terminus (SLP_{16–40}-FITC). Previous results showed that fixed DC pulsed with SLP_{16–40} were unable to stimulate a CTL clone specific for Melan-A/MART-1_{26–35}. In order to investigate the impact of FITC addition on cross-presentation, HLA-A2 DCs were incubated with different SLP (SLP_{16–40}, FITC-SLP_{16–40}, SLP_{16–40}-FITC) for 3 hours. Then the 10C10 CTL clone was added for 5 hours. Cross-presentation by DC of SLP_{16–40} was evaluated by the IFN γ response of the T-cell clone. As shown in Figure 1, SLP_{16–40}-FITC was cross-presented by DCs as efficiently as its non-labeled analogue. In contrast, FITC-SLP_{16–40} did not induce a response in the 10C10 clone and therefore was not cross-presented (data not shown). We thus used SLP_{16–40}-FITC to study the intracellular pathway involved in SLP cross-presentation.

Visualization of SLP_{16–40}-FITC Internalization by DCs

In order to visualize the routing of SLP_{16–40}, DCs were pulsed with SLP_{16–40}-FITC for different times, then fixed and stained with mAbs specific for MHC class-I molecules (W6–32) and a DNA dye specific for the nucleus (Draq5). As shown in Figure 2, SLP_{16–40}-FITC internalization was detectable in DC as early as 15 minutes after the pulse by monitoring the FITC tag. Using Immunofluorescence confocal microscopy, we observed that DCs exhibit morphology typical of intermediate-stage DCs, with most cells having a rounded shape (Fig. 2). Thereafter, we visualized a progressive internalization and accumulation of SLP_{16–40}-FITC in DCs between 15 min and 180 min of pulse-chase. These results demonstrate that SLP_{16–40} labeled with FITC is efficiently detectable in DCs by confocal microscopy and the signal persists during its intracellular routing.

Specific Routing of SLP_{16–40} toward Early Endosomes and Lysosomes

To define the intracellular routing, we incubated DCs for different periods of times (0 to 120 minutes) with SLP_{16–40}-FITC and then stained DCs intracellularly with antibody to early endosomes (anti-EEA-1, Fig. 3A) or lysosomes (anti-LAMP-1, Fig. 3B). Between 15 and 60 minutes after SLP_{16–40}-FITC incubation, DCs showed strong colocalization between SLP_{16–40} and early endosomes (Fig. 3A). After this period, no colocalization could be observed with this compartment (Fig. 3A). Concerning lysosomes, colocalization started at 30 minutes until 120 minutes (Fig. 3B), thus, we propose that SLP_{16–40} could be redirected from endosomes to lysosomes. No colocalization was detectable between SLP_{16–40}-FITC and the Golgi apparatus (anti-GM130) or the ER (anti-calreticulin) (Fig. 4). Altogether, our results indicate that SLP_{16–40} was internalized by DCs in early endosomes and later reached the lysosomes.

Kinetics of Internalization of SLP_{16–40} in DCs

To address more precisely the localization of SLP_{16–40} in DCs, we analyzed confocal microscopy images of each cell with the Image J 3D cell counter plugin. This application allows the measurement of the colocalization volume defined by the overlap

of the green fluorescent object (SLP_{16–40}) with the red fluorescent object (intracellular compartment) in the whole cell. To this end, we defined a threshold of no colocalization with the endoplasmic reticulum staining (Fig. 5A).

We evaluated the colocalization volume for early endosome and lysosome (Fig. 5B). Between 5 and 30 minutes, SLP-FITC_{16–40} colocalization was high in early endosomes and weak in lysosomes. Between 30 and 120 minutes, the trend reversed and the colocalization seemed to increase in lysosomes. Moreover, we observed that SLP_{16–40}-FITC accumulated in lysosomes from 30 to 120 minutes post-pulse.

Quantitation of SLP_{16–40}-FITC colocalized with early endosomes, lysosomes, ER and Golgi apparatus was measured by the Pearson correlation coefficient (Rr value). Rr values indicate specific partial colocalization of SLP_{16–40} with early endosomes between 5 and 60 minutes and with lysosomes between 45 and 120 minutes (Figure 5C). This demonstrates that the volumes of detected colocalization represent the specific colocalization between the SLP_{16–40} and this two subcellular compartments rather than a juxtaposition of fluorescence. On the other hand, Rr values indicate no specific colocalization of SLP_{16–40} with the ER or Golgi apparatus, in accordance with microscopy images displayed.

Overall, these data suggest that SLP_{16–40} is rapidly internalized by DCs in early endosomes, and then redirected to the lysosomes where it accumulates.

Proteasomal Processing of SLP_{16–40}

Various proteases may be involved in the processing of SLP_{16–40}. In DCs, the proteasome is involved in generation of many MHC-I epitopes from endogenous proteins (endogenous pathway) but also from exogenous proteins during cross-presentation [30]. The standard proteasome and the immunoproteasome are multimeric complexes characterized by the catalytic subunits (β 1, β 2, β 5) and (β 1i, β 2i, β 5i) respectively. Apart from the standard proteasome, there are at least three subtypes of immunoproteasome: two intermediate proteasomes (β 5i and β 1i, β 5i) and the classical immunoproteasome [31]. We found that DCs used in the present study essentially expressed the immunoproteasome or intermediate proteasomes because few subunits of standard proteasome were detectable (Fig. 6A).

To assess whether early cross presentation of SLP_{16–40} by DCs requires proteasome degradation for presentation, we used epoxomicin. This drug is a highly specific, and irreversible inhibitor of the chymotrypsin-like (CT-L), trypsin-like (T-L), and peptidyl-glutamyl peptide hydrolyzing (PGPH) activities of the proteasome which modifies the proteasomal catalytic subunits β 5i, β 2i, β 5 and β 2 [32]. DCs were preincubated with different doses of epoxomicin (1 and 5 μ M) then incubated with SLP_{16–40}. Epoxomicin strongly inhibits the DC cross-presentation capacity in a dose dependent manner (Fig. 6B) but had no effect on the exogenous presentation of synthetic 10-mer epitope Melan-A/Mart-1_{26–35}.

To better understand the role of immunoproteasomes in this process, DC with a knockdown of any one of the three inducible subunits β 1i, β 2i or β 5i were fed with SLP_{16–40} for 3 h prior to a 16-hour CTL assay in the presence of the 10C10 clone. As shown in Fig. 7A, gene silencing via specific siRNA was efficiently achieved at the protein level for each of the inducible subunits within 72 h of transfection. Of note, β 1i depletion was accompanied by a slight but significant decreased expression of both β 1i and β 2i. This result is in agreement with previous studies showing that β 5i incorporation is a prerequisite for β 1i incorporation which, itself, is required for maintaining normal levels of β 2i [33].

In addition, knockdown of β 5i resulted in increased expression of its standard subunit counterpart β 5 but also, albeit to a smaller extent, of β 2. Similarly, targeted disruption of either β 1i or β 2i caused an up-regulation of both of the standard subunits β 1 and β 2.

However, and in spite of the up-regulation of at least any of two out of three standard subunits in DC treated with a knockdown of anyone of the three inducible subunits, no major change in SLP_{16–40} cross-presentation could be observed (Fig. 7B). These results indicate that the generation of the Melan-A_{26–35} peptide from SLP_{16–40} in DC for cross-presentation occurs independently of the proteasomal subunit composition.

Cross-presentation of SLP_{16–40} is Dependent on Functional TAP Transport

In the cytosol, the antigens degraded into peptides are transported into the ER or ER phagosome-like compartments via the transporter associated with antigen processing (TAP) for loading onto MHC class I molecules. To investigate whether TAP was involved in the cross-presentation of SLP_{16–40}, we used a synthetic peptide corresponding to the N-terminal 35 amino acid residues (ICP₄₇ (1–35)), that can reach the cytosol and block TAP only in cells of DC lineage [34]. DCs were preincubated with ICP₄₇ (1–35) and cocultured for 3 hours with SLP_{16–40}. We showed that ICP₄₇ (1–35) decreased cross-presentation of SLP_{16–40} by DCs (Fig. 8A) with a slight but no statistically significant, inhibitory effect on the exogenous presentation of synthetic 9-mer epitope Melan-A/Mart-1_{26–35}. These findings suggest that TAP play a role in cross-presentation of peptide from SLP_{16–40} in cytosol.

SLP_{16–40} Cross-presentation Depends on Early Endosomes and Retrotranslocation Machinery

To define more precisely the compartments involved in SLP_{16–40} cross-presentation by DCs, we incubated DCs for 3 hours with SLP_{16–40} in the presence or absence of various inhibitors. First, to elucidate the potential lysosomal involvement in cross-presentation, we used NH₄Cl, an inhibitor of lysosome acidification and maturation of early endosomes into lysosomes [35]. As shown in Fig. 8B, NH₄Cl treatment increased antigen cross-presentation of SLP_{16–40} without modifying the exogenous presentation of synthetic 10-mer epitope Melan-A/Mart-1_{26–35}. The increased cross-presentation is likely due to an accumulation of SLP_{16–40} in early endosomes due to the inhibition by NH₄Cl. These results suggest that lysosomes do not participate in SLP_{16–40} cross presentation and points out a role for early endosomes in cross-presentation.

Following its internalization in early endosomes, translocation of SLP_{16–40} to the cytosol is required for subsequent degradation by cytosolic proteases and/or the proteasome [8]. It has been shown that such transport across the endosomal membrane can be achieved via the ER-associated degradation pathway (ERAD) [34,36]. Indeed, the ERAD machinery normally and usually allows the retro-translocation of misfolded proteins from the ER back to the cytosol, a process that is thought to be mediated by the channels sec61 and/or Derlin-1 as well as the AAA-ATPase p97/VCP [37,38]. Because sec61 is expressed on early endosomes [39] and might play a role in antigen translocation [40,41], we next sought to determine the contribution of this protein to SLP_{16–40} cross-presentation using the sec61 inhibitor Exotoxin A (Exo A). As shown in Fig. 8C, the use of this inhibitor tended to decrease slightly the cross-presentation of SLP_{16–40} but this decrease was not significant.

In an attempt to generate a more specific and reliable blockade of the ERAD pathway in DC, we generated knockdown DC for each of the three above-mentioned ERAD factors (i.e., p97/VCP, Derlin-1 and sec61a1). To this end, DC were treated with siRNA targeting p97/VCP, Derlin-1 or sec61a1 for three days followed by a 3-hour pulse of either SLP_{16–40} or Melan-A_{26–35} prior to a 16-hour CTL recognition assay in the presence of the 10C10 clone. As shown in Fig. 9A, treatment of DC with any of the above-mentioned siRNA resulted in significant diminished expression of the corresponding protein within 72 h of transfection. Interestingly, from the three ERAD components tested, only p97/VCP was found to significantly impair SLP_{16–40} cross-presentation (Fig. 9B). Taken together, these data show that the SLP_{16–40} is internalized in early endosomes where it is translocated into the cytoplasm by a retro-translocation complex involving p97/VCP.

Discussion

The aim of this study was to characterize the SLP cross-presentation pathway in DCs. We selected for the present *in vitro* study a 25-mer sequence of the Melan-A/MART-1 melanoma associated antigen bearing an anchor optimized analog of the immunodominant CD8⁺ epitope (epitope of Melan-A: Melan-A_{26–35} A27L on HLA-A2) [22].

Our principal results concerning SLP_{16–40} cross-presentation are summarized in Figure 10: SLP_{16–40} is internalized by DCs into early endosomes. Part of it is directed into the lysosomal compartment. The remainder is exported into the cytoplasm by a retrotranslocation complex involving p97/VCP. In the cytoplasm, SLP_{16–40} is processed by the proteasome and the resulting Melan-A peptide fragment is reimported by TAP into the endosomal or ER compartment for loading onto MHC class I molecules. Inhibition of lysosome acidification increased Melan-A_{26–35} epitope generation, in contrast to the effect previously documented by Fonteneau et al., for a different antigen: influenza matrix protein [42]. This pathway is a mix between the “endocytic” and “cytosolic” tracks proposed by Segura and Villadongos [30] and confirm the processing of SLP-OVA_{24aa} recently published for murine DCs [43].

Here, we demonstrated, by using inhibitors and confocal microscopy that SLP_{16–40} is endocytosed by DCs and routed to early endosomes. The results showed that SLP_{16–40} was internalized very quickly after DC contact (15 to 30 minutes). Later on, specific colocalization of peptide with endosomes decreased and then disappeared from 60 minutes onwards, together with the appearance of SLP_{16–40} colocalization with lysosomes. The decreasing colocalization between early endosomes and SLP_{16–40} over time suggests an arrest of the endocytic process. One hypothesis is that DCs rapidly internalized a large quantity of SLP reaching a maximum and perhaps preventing supplemental endocytosis during the 3 h incubation with this 25-mer.

We observed a temporal correlation of colocalization between early endosomes and lysosomes (Fig. 4). This suggests that, after internalization, SLP is routed into early endosomes then redirected to and accumulated in lysosomes. This routing could be explained by maturation of DCs: early endosomes becomes late endosomes then lysosomes [44]. The colocalization and accumulation of SLP_{16–40} in lysosomes after 60 minutes may represent an antigen storage compartment that could facilitate long-lasting cross-presentation of SLP_{16–40} by DCs – the “lysosome-like organelles” proposed by other groups. [12]. Indeed, Amigorena’s group has showed that DCs pulsed for 3 hours with the SLP Melan-A_{15–40} allows efficient, long-lasting, cross-presentation of Melan-A/MART-1 tumor antigen on MHC class I molecules from an

intracellular antigen storage compartment [29]. Furthermore, similar long-lasting cross-presentation by DCs was also observed for IgG-OVA complexes. In this case, lysosome like organelles were shown to be the intracellular storage compartment allowing long-term presentation of MHC class I/peptide complexes [12]. Otherwise, lysosomes are involved in generation of CD4⁺ T-cell epitopes to produce the MHC-II/peptide complex at the cell surface for activation of CD4⁺ T lymphocytes. Activated CD4⁺ T cells can promote inflammation, cooperate in the induction of CD8⁺ T effectors and memory cells, and provide help for B cells to produce anti-tumor antibodies. As the SLP_{16–40} contains potential CD4⁺ T-cell epitopes, SLP storage in lysosomes could also permit the activation of CD4⁺ T cell responses.

By using cytochalasin D that inhibits actin polymerization, we prevented cross-presentation, suggesting that internalization and possibly processing of SLP_{16–40} require cytoskeletal actin rearrangement (data not shown). Receptor mediated endocytosis and macropinocytosis are efficient mechanisms that can guide exogenous antigens into the MHC class I and II presentation pathway in DCs [9] but this remains to be elucidated. As proposed by Quakkelaar and Melief, it could be interesting to experiment the coupling of SLP to adjuvants like TLR ligands or receptor specific ligands in order to reinforce internalization, cross-presentation and the induction of specific T cell responses by SLP [45].

Although various mechanisms have been proposed to explain cross-presentation, the route used by internalized antigens to gain access to the cytosol for proteasomal degradation remains elusive. Over the past few years, an increasing number of studies point to a critical role of the ER-associated degradation pathway (ERAD) in this process [34,41,46]. The ERAD pathway is a conserved multistep process that normally ensures the transfer of misfolded proteins from the ER back to the cytoplasm for subsequent destruction by the 26S proteasome (an event also termed “retro-translocation”). To date, there is disagreement in the field with respect to identity and/or nature of the retro-translocation channel with two different protein complexes being put forward as possible candidates to fulfill this task, namely sec61 and Derlin-1 [47]. Irrespective of this concern, it is now well established that all ERAD pathways converge downstream of the retro-translocation channel at p97/VCP, an AAA-ATPase responsible for “pulling” the proteins that have successfully crossed the ER membrane. Our data fully support a role for ERAD in the transport of the SLP_{16–40} into the cytosol, as shown by the decreased SLP_{16–40} cross-presentation observed in p97/VCP-depleted DCs (Fig. 6E).

However, in our hands, neither sec61 nor Derlin-1 gene silencing could significantly alter the SLP_{16–40} cross-presentation by DC. These findings are interesting and raise the possibility of the existence of another yet unidentified channel implicated in this process. Yet, we cannot rule out a participation of Derlin-1 and/or sec61 in other DC-based cross-presentation systems when other antigen sources are applied such as full-length proteins or cell-associated antigens including apoptotic or necrotic cells. Of note, the extraction of proteins from the ER by p97/VCP requires substrate poly-ubiquitylation. Since our SLP_{16–40} is a lysine-free peptide, it is conceivable that the exclusive acceptor site for poly-ubiquitylation may be represented by its N-terminus. Importantly, this implies that any blockade of the N-terminus of the SLP_{16–40} would prevent its cross-presentation by DC. This assumption is supported by the observation that the N-terminally FITC-modified SLP_{16–40} does not lead to the generation of the Melan-A_{26–35} peptide in DC (data not shown).

In DCs, two proteasomes exist: the standard proteasome that contains the active subunits β 1, β 2 and β 5; and the immunoproteasome, which differs only in three active subunits (the

immunoproteasomes $\beta 1i$, $\beta 2i$ and $\beta 5i$). Recently, the existence of additional forms of proteasomes, bearing a mixed assortment of standard and inducible catalytic subunits has been identified, which contains only one ($\beta 5i$) or two ($\beta 1i$ and $\beta 5i$) of the three inducible catalytic subunits of the immunoproteasome [31]. We were able to confirm the role of proteasomes in SLP_{16–40} cross-presentation by DCs, as shown by the reduced CTL recognition observed with DC treated with epoxomicin (Fig. 5B). This mechanism is likely to involve the participation of the immunoproteasome or intermediate proteasomes, since the standard proteasome is thought to represent less than 8% of total proteasome content in mature or immature DCs [31]. This notion is further reinforced by the fact that siRNA-mediated depletion of anyone of the three inducible subunits in DC failed to influence the SLP_{16–40} cross-presentation (Fig. 5D). Indeed, because the down-regulation of any of the three inducible subunits is accompanied by the reciprocal up-regulation of at least two standard subunits (Fig. 5C), our data tend to imply that standard, mixed-type and immunoproteasomes are equivalent in the generation of the Melan-A_{26–35} peptide from the SLP_{16–40}.

This result seems to contradict previous results in which the antigenic peptide Melan-A_{26–35} was generated by the standard proteasome but not by the immunoproteasome [48,49]. This discrepancy could be explained by the fact that we used a cellular model with DCs, which could represent a more complex system than purified proteasome or immunoproteasome. Many cytosolic proteases are present in DCs and using a cellular model, Melief's group has recently described the role of a cytosolic peptidase (thimet oligopeptidase) in the generation of the Melan-A/MART-1 epitope [50]. Also we could not exclude the role of cytokines in the modulation of proteasome activity in DCs [51]. Finally in the present work we evaluated the processing of Melan-A epitope via

the cross-presentation pathway. Others and we have already described the cross-presentation of Melan-A peptide by DCs [25,29,51]. This result may reflect that cross-presentation process could have some differences in the generation of the Melan-A peptide in comparison with the endogenous pathway.

We have demonstrated the necessity of TAP for the cross-presentation of SLP_{16–40}. The TAP transporter is expressed both in early endosomes and the ER. The use of US6 or US6 chemically linked to transferrin [10] could help to discriminate between these two potential locations.

Altogether, many vaccination strategies have been used to enhance antitumor responses by exploiting the cross-presentation capacities of DCs. Recently a very encouraging clinical trial for patients with SLP vaccination was published [18]. This work underlines the therapeutic potential of SLP vaccination, which is characterized by the following advantages: easy manufacturing and easy immune monitoring as SLP contain few T cell epitope. Understanding SLP cross-presentation by DCs should contribute to the development and optimization of this immunotherapy technology.

Acknowledgments

The authors thank D. McIlroy, Dr E. Segura, and Dr. J-F. Fonteneau for carefully reading the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JM FE PH YG. Performed the experiments: JM FE RO AL YG. Analyzed the data: JM FE PH SN FJ YG. Contributed reagents/materials/analysis tools: PH ED PMK. Wrote the paper: JM FE PH PMK FJ YG.

References

- Coley WB (1928) End Results in Hodgkin's Disease and Lymphosarcoma Treated by the Mixed Toxins of Erysipel and Bacillus Prodigiosus, Alone or Combined with Radiation. *Ann Surg* 88: 641–667.
- Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12: 269–281.
- Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A (1994) Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12: 337–365.
- Melief CJ (2008) Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* 29: 372–383.
- Steinman RM, Banchereau J (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449: 419–426.
- Bevan MJ (2006) Cross-priming. *Nat Immunol* 7: 363–365.
- Ackerman AL, Cresswell P (2004) Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 5: 678–684.
- Joffe OP, Segura E, Savina A, Amigorena S (2012) Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews Immunology* 12: 557–569.
- Burgdorf S, Kurts C (2008) Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 20: 89–95.
- Burgdorf S, Scholz C, Kautz A, Tampe R, Kurts C (2008) Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol* 9: 558–566.
- Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, et al. (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425: 397–402.
- van Montfoort N, Camps MG, Khan S, Filippov DV, Weterings JJ, et al. (2009) Antigen storage compartments in mature dendritic cells facilitate prolonged cytotoxic T lymphocyte cross-priming capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6730–6735.
- Baxevasis CN, Perez SA, Papamichail M (2009) Cancer immunotherapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46: 167–189.
- Steinman RM, Pope M (2002) Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest* 109: 1519–1526.
- Melief CJ, van der Burg SH (2008) Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 8: 351–360.
- Bijker MS, van den Eeden SJ, Franken KL, Melief CJ, van der Burg SH, et al. (2008) Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur J Immunol* 38: 1033–1042.
- Bijker MS, van den Eeden SJ, Franken KL, Melief CJ, Offringa R, et al. (2007) CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. *J Immunol* 179: 5033–5040.
- Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, et al. (2009) Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 361: 1838–1847.
- Leffers N, Lambeck AJ, Gooden MJ, Hoogbeem BN, Wolf R, et al. (2009) Immunization with a P53 synthetic long peptide vaccine induces P53-specific immune responses in ovarian cancer patients, a phase II trial. *Int J Cancer* 125: 2104–2113.
- Speetjens FM, Kuppen PJ, Welters MJ, Essahsah F, Voet van den Brink AM, et al. (2009) Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 15: 1086–1095.
- Welters MJ, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon AP, Lowik MJ, et al. (2008) Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin Cancer Res* 14: 178–187.
- Valmori D, Fonteneau JF, Lizana CM, Gervois N, Lienard D, et al. (1998) Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160: 1750–1758.
- Kawakami Y, Elyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, et al. (1994) Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180: 347–352.
- Castelli C, Storkus WJ, Maeurer MJ, Martin DM, Huang EC, et al. (1995) Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 181: 363–368.
- Chauvin JM, Larrieu P, Sarraयरouse G, Prevost-Blondel A, Lengagne R, et al. (2012) HLA anchor optimization of the melan-A-HLA-A2 epitope within a long peptide is required for efficient cross-priming of human tumor-reactive T cells. *J Immunol* 188: 2102–2110.
- Coulais D, Panterne C, Fonteneau JF, Gregoire M (2012) Purification of circulating plasmacytoid dendritic cells using counterflow centrifugal elutriation and immunomagnetic beads. *Cytotherapy* 14: 887–896.
- Vignard V, Lemerrier B, Lim A, Paudolino MC, Guilloux Y, 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.
28. Bolte S, Cordeliers FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213–232.
 29. Faure F, Mantegazza A, Sadaka C, Sedlik G, Jotereau F, et al. (2009) Long-lasting cross-presentation of tumor antigen in human DC. *Eur J Immunol* 39: 380–390.
 30. Segura E, Villadangos JA (2011) A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic* 12: 1677–1685.
 31. Guillaume B, Chapiro J, Stroobant V, Colau D, Van Holle B, et al. (2010) Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18599–18604.
 32. Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, et al. (1999) Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 10403–10408.
 33. Grottrup M, Ständera S, Stohwasser R, Kloetzel PM (1997) The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 8970–8975.
 34. Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P (2006) A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25: 607–617.
 35. Hotta C, Fujimaki H, Yoshinari M, Nakazawa M, Minami M (2006) The delivery of an antigen from the endocytic compartment into the cytosol for cross-presentation is restricted to early immature dendritic cells. *Immunology* 117: 97–107.
 36. Zehner M, Chasan AI, Schuette V, Embgenbroich M, Quast T, et al. (2011) Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9933–9938.
 37. Claessen JH, Kundrat L, Ploegh HL (2012) Protein quality control in the ER: balancing the ubiquitin checkbook. *Trends in cell biology* 22: 22–32.
 38. Liu Y, Ye Y (2011) Proteostasis regulation at the endoplasmic reticulum: a new perturbation site for targeted cancer therapy. *Cell research* 21: 867–883.
 39. Ramanathan HN, Ye Y (2012) The p97 ATPase associates with EEA1 to regulate the size of early endosomes. *Cell Res* 22: 346–359.
 40. Crespo MI, Zacca ER, Nunez NG, Ranocchia RP, Maccioni M, et al. (2013) TLR7 triggering with polyuridylic acid promotes cross-presentation in CD8alpha+ conventional dendritic cells by enhancing antigen preservation and MHC class I antigen permanence on the dendritic cell surface. *Journal of immunology* 190: 948–960.
 41. Imai J, Hasegawa H, Maruya M, Koyasu S, Yahara I (2005) Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *International immunology* 17: 45–53.
 42. Fonteneau JF, Kavanagh DG, Lirvall M, Sanders C, Cover TL, et al. (2003) Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 102: 4448–4455.
 43. Rosalia RA, Quakkelaar ED, Redeker A, Khan S, Camps M, et al. (2013) Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *European journal of immunology* 43: 2554–2565.
 44. Pillay CS, Elliott E, Dennison C (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 363: 417–429.
 45. Quakkelaar ED, Melief CJ (2012) Experience with synthetic vaccines for cancer and persistent virus infections in nonhuman primates and patients. *Adv Immunol* 114: 77–106.
 46. Giodini A, Rahner C, Cresswell P (2009) Receptor-mediated phagocytosis elicits cross-presentation in nonprofessional antigen-presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 3324–3329.
 47. Needham PG, Brodsky JL (2013) How early studies on secreted and membrane protein quality control gave rise to the ER associated degradation (ERAD) pathway: The early history of ERAD. *Biochimica et biophysica acta*.
 48. Morel S, Levy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, et al. (2000) Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12: 107–117.
 49. Chapatte L, Ayyoub M, Morel S, Peitrequin AL, Levy N, et al. (2006) Processing of tumor-associated antigen by the proteasomes of dendritic cells controls in vivo T-cell responses. *Cancer Res* 66: 5461–5468.
 50. Kessler JH, Khan S, Seifert U, Le Gall S, Chow KM, et al. (2011) Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nat Immunol* 12: 45–53.
 51. Lattanzi L, Rozera C, Marescotti D, D'Agostino G, Santodonato L, et al. (2011) IFN-alpha boosts epitope cross-presentation by dendritic cells via modulation of proteasome activity. *Immunobiology* 216: 537–547.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Bibliographie

A

- Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787–793. doi:10.1038/383787a0.
- Alatrash, G., and J.J. Molldrem. 2011. Vaccines as consolidation therapy for myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 4:37–50. doi:10.1586/ehm.10.80.
- Alatrash, G., H. Jakher, P.D. Stafford, and E.A. Mittendorf. 2013. Cancer immunotherapies, their safety and toxicity. *Expert Opin Drug Saf*. 12:631–645. doi:10.1517/14740338.2013.795944.
- Algarra, I., A. García-Lora, T. Cabrera, F. Ruiz-Cabello, and F. Garrido. 2004. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol. Immunother*. 53:904–910. doi:10.1007/s00262-004-0517-9.
- Alici, E., K.V. Konstantinidis, A. Aints, M.S. Dilber, and M. Abedi-Valugerdi. 2004. Visualization of 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse: establishment of a new syngeneic murine model of multiple myeloma. *Exp Hematol*. 32:1064–1072. doi:10.1016/j.exphem.2004.07.019.
- Allen, B.J. 2008. Clinical trials of targeted alpha therapy for cancer. *Reviews on recent clinical trials*. 3:185–191.
- Alsayed, Y., H. Ngo, J. Runnels, X. Leleu, U.K. Singha, C.M. Pitsillides, J.A. Spencer, T. Kimlinger, J.M. Ghobrial, X. Jia, G. Lu, M. Timm, A. Kumar, D. Côté, I. Veilleux, K.E. Hedin, G.D. Roodman, T.E. Witzig, A.L. Kung, T. Hideshima, K.C. Anderson, C.P. Lin, and I.M. Ghobrial. 2007. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood*. 109:2708–2717. doi:10.1182/blood-2006-07-035857.
- Altekruse, S.F., C.L. Kosary, M. Krapcho, N. Neyman, R. Aminou, W. Waldron, J. Ruhl, N. Howlader, Z. Tatalovich, and H. Cho. 2010. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. National Cancer Institute, Bethesda, MD 2010.
- Alvarez, R.D., W.K. Huh, M.B. Khazaeli, R.F. Meredith, E.E. Partridge, L.C. Kilgore, W.E. Grizzle, S. Shen, J.M. Austin, M.N. Barnes, D. Carey, J. Schlom, and A.F. LoBuglio. 2002. A Phase I study of combined modality (90)Yttrium-CC49 intraperitoneal radioimmunotherapy for ovarian cancer. *Clin. Cancer Res*. 8:2806–2811.
- Anderson, K.C. 2012. The 39th David A. Karnofsky Lecture: bench-to-bedside translation of targeted therapies in multiple myeloma. *J. Clin. Oncol*. 30:445–452. doi:10.1200/JCO.2011.37.8919.

- Andersson, H., E. Cederkrantz, T. Bäck, C. Divgi, J. Elgqvist, J. Himmelman, G. Horvath, L. Jacobsson, H. Jensen, S. Lindegren, S. Palm, and R. Hultborn. 2009. Intraperitoneal alpha-particle radioimmunotherapy of ovarian cancer patients: pharmacokinetics and dosimetry of (211)At-MX35 F(ab')₂--a phase I study. *J. Nucl. Med.* 50:1153–1160. doi:10.2967/jnumed.109.062604.
- Antoniades, J., L.W. Brady, and D.A. Lightfoot. 1977. Lymphangiographic demonstration of the abscopal effect in patients with malignant lymphomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2:141–147.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M.C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F.J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.-P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. André, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2007. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 13:1050–1059. doi:10.1038/nm1622.
- Apte, R.N., S. Dotan, M. Elkabets, M.R. White, E. Reich, Y. Carmi, X. Song, T. Dvozkin, Y. Krelin, and E. Voronov. 2006. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.* 25:387–408. doi:10.1007/s10555-006-9004-4.
- Ashkenazi, A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer.* 2:420–430. doi:10.1038/nrc821.
- Attal, M., J.L. Harousseau, A.M. Stoppa, J.J. Sotto, J.G. Fuzibet, J.F. Rossi, P. Casassus, H. Maisonneuve, T. Facon, N. Ifrah, C. Payen, and R. Bataille. 1996. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *N. Engl. J. Med.* 335:91–97. doi:10.1056/NEJM199607113350204.
- Aymeric, L., L. Apetoh, F. Ghiringhelli, A. Tesniere, I. Martins, G. Kroemer, M.J. Smyth, and L. Zitvogel. 2010. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res.* 70:855–858. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3566.
- Azinovic, I., G.L. DeNardo, K.R. Lamborn, G. Mirick, D. Goldstein, B.M. Bradt, and S.J. DeNardo. 2006. Survival benefit associated with human anti-mouse antibody (HAMA) in patients with B-cell malignancies. *Cancer Immunol. Immunother.* 55:1451–1458. doi:10.1007/s00262-006-0148-4.
- Azzam, E.I., S.M. de Toledo, and J.B. Little. 2003. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene.* 22:7050–7057. doi:10.1038/sj.onc.1206961.

B

- Baidoo, K.E., K. Yong, and M.W. Brechbiel. 2013. Molecular pathways: targeted α -particle radiation therapy. *Clin. Cancer Res.* 19:530–537. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0298.
- Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity : Article : Nature. *Nature.* 392:245–252. doi:10.1038/32588.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767–811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
- Banchereau, J., V. Pascual, and A. O'Garra. 2012. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* 13:925–931. doi:10.1038/ni.2406.
- Banz, A., A. Peixoto, C. Pontoux, C. Cordier, B. Rocha, and M. Papiernik. 2003. A unique subpopulation of CD4+ regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *Eur. J. Immunol.* 33:2419–2428. doi:10.1002/eji.200324205.
- Barcellos-Hoff, M.H., R. Derynck, M.L. Tsang, and J.A. Weatherbee. 1994. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *Journal of Clinical Investigation.* 93:892.
- Barchet, W., M. Cella, and M. Colonna. 2005. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin. Immunol.* 17:253–261. doi:10.1016/j.smim.2005.05.008.
- Barker, C.A., and M.A. Postow. 2014. Combinations of radiation therapy and immunotherapy for melanoma: a review of clinical outcomes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 88:986–997. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.08.035.
- Behr, T.M., M. Béhé, M.G. Stabin, E. Wehrmann, C. Apostolidis, R. Molinet, F. Strutz, A. Fayyazi, E. Wieland, S. Gratz, L. Koch, D.M. Goldenberg, and W. Becker. 1999. High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of ²¹³Bi- versus ⁹⁰Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Res.* 59:2635–2643.
- Belldegrun, A., L.M. Muul, and S.A. Rosenberg. 1988. Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and antitumor activity. *Cancer Res.* 48:206–214.
- Berd, D., T. Sato, H. Cohn, H.C. Maguire, and M.J. Mastrangelo. 2001. Treatment of metastatic melanoma with autologous, hapten-modified melanoma vaccine: regression of pulmonary metastases. *Int. J. Cancer.* 94:531–539.
- Bernfield, M., M. Götte, P.W. Park, O. Reizes, M.L. Fitzgerald, J. Lincecum, and M. Zako. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 68:729–777. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.729.

- Bernier, J., E.J. Hall, and A. Giaccia. 2004. Timeline: Radiation oncology: a century of achievements. *Nat. Rev. Cancer*. 4:737–747. doi:10.1038/nrc1451.
- Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:5138–5143. doi:10.1073/pnas.0501675102.
- Beyer, M.M., M.M. Kochanek, T.T. Giese, E.E. Endl, M.R.M. Weihrauch, P.A.P. Knolle, S.S. Classen, and J.L.J. Schultze. 2006. In vivo peripheral expansion of naive CD4+CD25high FoxP3+ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood*. 107:3940–3949. doi:10.1182/blood-2005-09-3671.
- Billiard, F., V. Buard, M. Benderitter, and C. Linard. 2011. Abdominal γ -radiation induces an accumulation of function-impaired regulatory T cells in the small intestine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 80:869–876. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.12.041.
- Biragyn, A., and C. Lee-Chang. 2012. A new paradigm for an old story: the role of regulatory B cells in cancer. *Front Immunol.* 3:206. doi:10.3389/fimmu.2012.00206.
- Blackburn, S.D., H. Shin, W.N. Haining, T. Zou, C.J. Workman, A. Polley, M.R. Betts, G.J. Freeman, D.A.A. Vignali, and E.J. Wherry. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 10:29–37. doi:10.1038/ni.1679.
- Blank, C., T.F. Gajewski, and A. Mackensen. 2005. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307–314. doi:10.1007/s00262-004-0593-x.
- Boissonnas, A., F. Licata, L. Poupel, S. Jacquelin, L. Fetler, S. Krumeich, C. Théry, S. Amigorena, and C. Combadière. 2013. CD8+ tumor-infiltrating T cells are trapped in the tumor-dendritic cell network. *Neoplasia*. 15:85–94.
- Boswell, C.A., and M.W. Brechbiel. 2007. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nucl. Med. Biol.* 34:757–778. doi:10.1016/j.nucmedbio.2007.04.001.
- Boudousq, V., S. Ricaud, V. Garambois, C. Bascoul-Mollevi, S. Boutaleb, M. Busson, F. Quenet, P.-E. Colombo, M. Bardiès, P.-O. Kotzki, I. Navarro-Teulon, A. Pèlerin, and J.-P. Pouget. 2010. Brief intraperitoneal radioimmunotherapy of small peritoneal carcinomatosis using high activities of noninternalizing 125I-labeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.* 51:1748–1755. doi:10.2967/jnumed.110.080226.
- Brahmer, J.R., S.S. Tykodi, L.Q.M. Chow, W.-J. Hwu, S.L. Topalian, P. Hwu, C.G. Drake, L.H. Camacho, J. Kauh, K. Odunsi, H.C. Pitot, O. Hamid, S. Bhatia, R. Martins, K. Eaton, S. Chen, T.M. Salay, S. Alaparthi, J.F. Grosso, A.J. Korman, S.M. Parker, S. Agrawal, S.M. Goldberg, D.M. Pardoll, A. Gupta, and J.M. Wigginton. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 366:2455–2465. doi:10.1056/NEJMoa1200694.

- Brans, B., O. Lindén, F. Giammarile, J. Tennvall, and C. Punt. 2006. Clinical applications of newer radionuclide therapies. *Eur. J. Cancer*. 42:994–1003. doi:10.1016/j.ejca.2005.12.020.
- Breart, B., F. Lemaître, S. Celli, and P. Bousso. 2008. Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice. *J. Clin. Invest.* 118:1390–1397. doi:10.1172/JCI34388.
- Brechbiel, M.W. 2007. Targeted alpha-therapy: past, present, future? *Dalton Trans.* 4918–4928. doi:10.1039/b704726f.
- Brenner, D., P.H. Krammer, and R. Arnold. 2008. Concepts of activated T cell death. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 66:52–64. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.01.002.
- Brimnes, M.K., A.J. Vangsted, L.M. Knudsen, P. Gimsing, A.O. Gang, H.E. Johnsen, and I.M. Svane. 2010. Increased Level of both CD4+ FOXP3+ Regulatory T Cells and CD14+ HLA-DR-/low Myeloid-Derived Suppressor Cells and Decreased Level of Dendritic Cells in Patients with Multiple Myeloma. *Scand. J. Immunol.* 72:540–547. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02463.x.
- Brody, J.D., W.Z. Ai, D.K. Czerwinski, J.A. Torchia, M. Levy, R.H. Advani, Y.H. Kim, R.T. Hoppe, S.J. Knox, L.K. Shin, I. Wapnir, R.J. Tibshirani, and R. Levy. 2010. In situ vaccination with a TLR9 agonist induces systemic lymphoma regression: a phase I/II study. *J. Clin. Oncol.* 28:4324–4332. doi:10.1200/JCO.2010.28.9793.
- Brown, J.M., and A.J. Giaccia. 1998. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 58:1408–1416.
- Brown, R.D., B. Pope, A. Murray, W. Esdale, D.M. Sze, J. Gibson, P.J. Ho, D. Hart, and D. Joshua. 2001. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood.* 98:2992–2998.
- Budhu, S., J.D. Loike, A. Pandolfi, S. Han, G. Catalano, A. Constantinescu, R. Clynes, and S.C. Silverstein. 2010. CD8+ T cell concentration determines their efficiency in killing cognate antigen-expressing syngeneic mammalian cells in vitro and in mouse tissues. *J. Exp. Med.* 207:223–235. doi:10.1084/jem.20091279.
- Burger, J.A., P. Ghia, A. Rosenwald, and F. Caligaris-Cappio. 2009. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood.* 114:3367–3375. doi:10.1182/blood-2009-06-225326.
- Burnet, F.M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 13:1–27.
- Burnette, B.C., H. Liang, Y. Lee, L. Chlewicki, N.N. Khodarev, R.R. Weichselbaum, Y.-X. Fu, and S.L. Auh. 2011. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res.* 71:2488–2496. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2820.

C

- Cameron, R.B., P.J. Spiess, and S.A. Rosenberg. 1990. Synergistic antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes, interleukin 2, and local tumor irradiation. Studies on the mechanism of action. *J. Exp. Med.* 171:249–263.
- Caraux, A., B. Klein, B. Paiva, C. Bret, A. Schmitz, G.M. Fuhler, N.A. Bos, H.E. Johnsen, A. Orfao, M. Perez-Andres, Myeloma Stem Cell Network. 2010. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica.* 95:1016–1020. doi:10.3324/haematol.2009.018689.
- Carbone, E., G. Terrazzano, G. Ruggiero, D. Zanzi, A. Ottaiano, C. Manzo, K. Kärre, and S. Zappacosta. 1999. Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 29:4022–4029. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<4022::AID-IMMU4022>3.0.CO;2-O.
- Carpenter, R.O., M.O. Evbuomwan, S. Pittaluga, J.J. Rose, M. Raffeld, S. Yang, R.E. Gress, F.T. Hakim, and J.N. Kochenderfer. 2013. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 19:2048–2060. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2422.
- Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen, and A. Lanzavecchia. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189:821–829. doi:10.1006/cyto.1997.0270.
- Chakraborty, M., A. Gelbard, J.A. Carrasquillo, S. Yu, M. Mamede, C.H. Paik, K. Camphausen, J. Schlom, and J.W. Hodge. 2008a. Use of radiolabeled monoclonal antibody to enhance vaccine-mediated antitumor effects. *Cancer Immunol. Immunother.* 57:1173–1183. doi:10.1007/s00262-008-0449-x.
- Chakraborty, M., E.K. Wansley, J.A. Carrasquillo, S. Yu, C.H. Paik, K. Camphausen, M.D. Becker, W.F. Goeckeler, J. Schlom, and J.W. Hodge. 2008b. The use of chelated radionuclide (samarium-153-ethylenediaminetetramethylenephosphonate) to modulate phenotype of tumor cells and enhance T cell-mediated killing. *Clin. Cancer Res.* 14:4241–4249. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0335.
- Chakraborty, M., S.I. Abrams, C.N. Coleman, K. Camphausen, J. Schlom, and J.W. Hodge. 2004. External beam radiation of tumors alters phenotype of tumor cells to render them susceptible to vaccine-mediated T-cell killing. *Cancer Res.* 64:4328–4337. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0073.
- Chakraborty, M., S.I. Abrams, K. Camphausen, K. Liu, T. Scott, C.N. Coleman, and J.W. Hodge. 2003. Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. *J. Immunol.* 170:6338–6347.
- Chakravarty, P.K., A. Alfieri, E.K. Thomas, V. Beri, K.E. Tanaka, B. Vikram, and C. Guha. 1999. Flt3-ligand administration after radiation therapy prolongs survival in a murine model of metastatic lung cancer. *Cancer Res.* 59:6028–6032.

- Chatal, J.-F., L. Champion, F. Kraeber-Bodéré, S. Bardet, J.-P. Vuillez, B. Charbonnel, V. Rohmer, C.-H. Chang, R.M. Sharkey, D.M. Goldenberg, J. Barbet, French Endocrine Tumor Group. 2006. Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the French Endocrine Tumor Group. *J. Clin. Oncol.* 24:1705–1711. doi:10.1200/JCO.2005.04.4917.
- Chekeni, F.B., M.R. Elliott, J.K. Sandilos, S.F. Walk, J.M. Kinchen, E.R. Lazarowski, A.J. Armstrong, S. Penuela, D.W. Laird, G.S. Salvesen, B.E. Isakson, D.A. Bayliss, and K.S. Ravichandran. 2010. Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature.* 467:863–867. doi:10.1038/nature09413.
- Chen, J., H. Wu, D. Han, and C. Xie. 2006. Using anti-VEGF McAb and magnetic nanoparticles as double-targeting vector for the radioimmunotherapy of liver cancer. *Cancer Lett.* 231:169–175. doi:10.1016/j.canlet.2005.01.024.
- Chen, J.-G., J.-C. Xia, X.-T. Liang, K. Pan, W. Wang, L. Lv, J.-J. Zhao, Q.-J. Wang, Y.-Q. Li, S.-P. Chen, J. He, L.-X. Huang, M.-L. Ke, Y.-B. Chen, H.-Q. Ma, Z.-W. Zeng, Z.-W. Zhou, A.E. Chang, and Q. Li. 2011. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. *Int. J. Biol. Sci.* 7:53–60. doi:10.7150/ijbs.7.53.
- Chen, W., M.E. Frank, W. Jin, and S.M. Wahl. 2001a. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity.* 14:715–725.
- Chen, X., J. Wan, J. Liu, W. Xie, X. Diao, J. Xu, B. Zhu, and Z. Chen. 2010. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer.* 69:348–354. doi:10.1016/j.lungcan.2009.11.013.
- Chen, Z., T. Moyana, A. Saxena, R. Warrington, Z. Jia, and J. Xiang. 2001b. Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *Int. J. Cancer.* 93:539–548.
- Chérel, M., S. Gouard, J. Gaschet, C. Saï-Maurel, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, M. Bourgeois, J.-F. Gustin, F.K. Bodéré, J. Barbet, P. Moreau, and F. Davodeau. 2013. ²¹³Bi Radioimmunotherapy with an Anti-mCD138 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Multiple Myeloma. *J. Nucl. Med.* 54:1597–1604. doi:10.2967/jnumed.112.111997.
- Chiang, C.-S., S.Y. Fu, S.-C. Wang, C.-F. Yu, F.-H. Chen, C.-M. Lin, and J.-H. Hong. 2012. Irradiation promotes an m2 macrophage phenotype in tumor hypoxia. *Front Oncol.* 2:89. doi:10.3389/fonc.2012.00089.
- Child, J.A., G.J. Morgan, F.E. Davies, R.G. Owen, S.E. Bell, K. Hawkins, J. Brown, M.T. Drayson, P.J. Selby, Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. 2003. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 348:1875–1883. doi:10.1056/NEJMoa022340.
- Chouin, N., K. Bernardeau, M. Bardiès, A. Faivre-Chauvet, M. Bourgeois, C. Apostolidis, A. Morgenstern, A. Lisbona, M. Chérel, and F. Davodeau. 2009. Evidence of extranuclear cell sensitivity to alpha-particle radiation using a microdosimetric model. II. Application of the microdosimetric model to experimental results. *Radiat. Res.* 171:664–673. doi:10.1667/RR1536.1.

- Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.-J. Liu. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5:1219–1226. doi:10.1038/ni1141.
- Cordier, D., F. Forrer, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, C. Apostolidis, S. Good, J. Müller-Brand, H. Mäcke, J.C. Reubi, and A. Merlo. 2010. Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with ²¹³Bi-DOTA-[Thi8, Met(O2)11]-substance P: a pilot trial. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 37:1335–1344. doi:10.1007/s00259-010-1385-5.
- Cotter, S.E., G.P. Dunn, K.M. Collins, D. Sahni, K.A. Zukotynski, J.L. Hansen, D.A.O. Farrell, A.K. Ng, P.M. Devlin, and L.C. Wang. 2011. Abscopal Effect in a Patient With Metastatic Merkel Cell Carcinoma Following Radiation Therapy: Potential Role of Induced Antitumor Immunity. *Arch Dermatol.* 147:870–872. doi:10.1001/archdermatol.2011.176.
- Couturier, O., A. Faivre-Chauvet, I.V. Filippovich, P. Thédrez, C. Sai-Maurel, M. Bardiès, A.K. Mishra, M. Gauthier, G. Blain, C. Apostolidis, R. Molinet, J.C. Abbe, R. Bataille, J. Wijdenes, J.F. Chatal, and M. Chérel. 1999. Validation of ²¹³Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 5:3165s–3170s.
- Critchley-Thorne, R.J., D.L. Simons, N. Yan, A.K. Miyahira, F.M. Dirbas, D.L. Johnson, S.M. Swetter, R.W. Carlson, G.A. Fisher, A. Koong, S. Holmes, and P.P. Lee. 2009. Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:9010–9015. doi:10.1073/pnas.0901329106.
- Croft, M., C.A. Benedict, and C.F. Ware. 2013. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov.* 12:147–168. doi:10.1038/nrd3930.

D

- Daud, A.I., N. Mirza, B. Lenox, S. Andrews, P. Urbas, G.X. Gao, J.-H. Lee, V.K. Sondak, A.I. Riker, R.C. DeConti, and D. Gabrilovich. 2008. Phenotypic and functional analysis of dendritic cells and clinical outcome in patients with high-risk melanoma treated with adjuvant granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Oncol.* 26:3235–3241. doi:10.1200/JCO.2007.13.9048.
- Davies, C. de L., D.A. Berk, A. Pluen, and R.K. Jain. 2002. Comparison of IgG diffusion and extracellular matrix composition in rhabdomyosarcomas grown in mice versus in vitro as spheroids reveals the role of host stromal cells. *Br. J. Cancer.* 86:1639–1644. doi:10.1038/sj.bjc.6600270.
- Davis, I.A., K.A. Glowienka, R.A. Boll, K.A. Deal, M.W. Brechbiel, M. Stabin, P.N. Bochsler, S. Mirzadeh, and S.J. Kennel. 1999. Comparison of ²²⁵actinium chelates: tissue distribution and radiotoxicity. *Nucl. Med. Biol.* 26:581–589.
- De Monte, L., M. Reni, E. Tassi, D. Clavenna, I. Papa, H. Recalde, M. Braga, V. Di Carlo, C. Doglioni, and M.P. Protti. 2011. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* 208:469–478. doi:10.1084/jem.20101876.

- de Vries, T.J., A. Fourkour, T. Wobbes, G. Verkroost, D.J. Ruiter, and G.N. van Muijen. 1997. Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res.* 57:3223–3229.
- Demaria, S., and S.C. Formenti. 2012. Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. *Front Oncol.* 2:95. doi:10.3389/fonc.2012.00095.
- Demaria, S., B. Ng, M.L. Devitt, J.S. Babb, N. Kawashima, L. Liebes, and S.C. Formenti. 2004. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58:862–870. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.09.012.
- Demaria, S., N. Bhardwaj, W.H. McBride, and S.C. Formenti. 2005a. Combining radiotherapy and immunotherapy: A revived partnership. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics.* 63:655–666. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.06.032.
- Demaria, S., N. Kawashima, A.M. Yang, M.L. Devitt, J.S. Babb, J.P. Allison, and S.C. Formenti. 2005b. Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 11:728–734.
- Dewan, M.Z., A.E. Galloway, N. Kawashima, J.K. Dewyngaert, J.S. Babb, S.C. Formenti, and S. Demaria. 2009. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin. Cancer Res.* 15:5379–5388. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0265.
- Dhodapkar, K.M., S. Barbuto, P. Matthews, A. Kukreja, A. Mazumder, D. Vesole, S. Jagannath, and M.V. Dhodapkar. 2008. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood.* 112:2878–2885. doi:10.1182/blood-2008-03-143222.
- Dinarello, C.A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 87:2095–2147.
- Dong, H., S.E. Strome, D.R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D.B. Flies, P.C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V.A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 8:793–800. doi:10.1038/nm730.
- Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 4:11–22. doi:10.1038/nrc1252.
- Dreno, B., J.-M. Nguyen, A. Khammari, M.-C. Pandolfino, M.H. Tessier, S. Bercegeay, A. Cassidanius, P. Lemarre, S. Billaudel, N. Labarriere, and F. Jotereau. 2002. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 51:539–546. doi:10.1007/s00262-002-0315-1.

- Dudley, M.E., J.C. Yang, R. Sherry, M.S. Hughes, R. Royal, U. Kammula, P.F. Robbins, J. Huang, D.E. Citrin, S.F. Leitman, J. Wunderlich, N.P. Restifo, A. Thomasian, S.G. Downey, F.O. Smith, J. Klapper, K. Morton, C. Laurencot, D.E. White, and S.A. Rosenberg. 2008. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol.* 26:5233–5239. doi:10.1200/JCO.2008.16.5449.
- Dudley, M.E., J.R. Wunderlich, J.C. Yang, R.M. Sherry, S.L. Topalian, N.P. Restifo, R.E. Royal, U. Kammula, D.E. White, S.A. Mavroukakis, L.J. Rogers, G.J. Gracia, S.A. Jones, D.P. Mangiameli, M.M. Pelletier, J. Gea-Banacloche, M.R. Robinson, D.M. Berman, A.C. Filie, A. Abati, and S.A. Rosenberg. 2005. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23:2346–2357. doi:10.1200/JCO.2005.00.240.
- Dudley, M.E., J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, R. Sherry, N.P. Restifo, A.M. Hubicki, M.R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C.A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, D.E. White, and S.A. Rosenberg. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science.* 298:850–854. doi:10.1126/science.1076514.
- Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3:991–998. doi:10.1038/ni1102-991.
- Durie, B.G.M. 2010. Role of new treatment approaches in defining treatment goals in multiple myeloma--the ultimate goal is extended survival. *Cancer Treat. Rev.* 36 Suppl 2:S18–23. doi:10.1016/S0305-7372(10)70008-6.
- Dvorak, H.F., V.M. Weaver, T.D. Tlsty, and G. Bergers. 2011. Tumor microenvironment and progression. *J Surg Oncol.* 103:468–474. doi:10.1002/jso.21709.

E

- Elgqvist, J., S. Frost, J.-P. Pouget, and P. Albertsson. 2014. The Potential and Hurdles of Targeted Alpha Therapy - Clinical Trials and Beyond. *Front Oncol.* 3:324. doi:10.3389/fonc.2013.00324.
- Elliott, M.R., F.B. Chekeni, P.C. Trampont, E.R. Lazarowski, A. Kadl, S.F. Walk, D. Park, R.I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J.J. Lysiak, T.K. Harden, N. Leitinger, and K.S. Ravichandran. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 461:282–286. doi:10.1038/nature08296.

F

- Ferrarini, M., G. Mazzoleni, N. Steimberg, D. Belloni, and E. Ferrero. 2013. Innovative Models to Assess Multiple Myeloma Biology and the Impact of Drugs. doi:10.5772/54312.

- Feyler, S., M. von Lilienfeld-Toal, S. Jarmin, L. Marles, A. Rawstron, A.J. Ashcroft, R.G. Owen, P.J. Selby, and G. Cook. 2009. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+)CD4(-)CD8(-)alpha-betaTCR(+) Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden. *Br. J. Haematol.* 144:686–695. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07530.x.
- Finkelstein, S.E., C. Iclozan, M.M. Bui, M.J. Cotter, R. Ramakrishnan, J. Ahmed, D.R. Noyes, D. Cheong, R.J. Gonzalez, R.V. Heysek, C. Berman, B.C. Lenox, W. Janssen, J.S. Zager, V.K. Sondak, G.D. Letson, S.J. Antonia, and D.I. Gabrilovich. 2012. Combination of external beam radiotherapy (EBRT) with intratumoral injection of dendritic cells as neoadjuvant treatment of high-risk soft tissue sarcoma patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 82:924–932. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.12.068.
- Finney, H.M., A.N. Akbar, and A.D.G. Lawson. 2004. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J. Immunol.* 172:104–113.
- Fonseca, R., P.L. Bergsagel, J. Drach, J. Shaughnessy, N. Gutierrez, A.K. Stewart, G. Morgan, B. Van Ness, M. Chesi, S. Minvielle, A. Neri, B. Barlogie, W.M. Kuehl, P. Liebisch, F. Davies, S. Chen-Kiang, B.G.M. Durie, R. Carrasco, O. Sezer, T. Reiman, L. Pilarski, H. Avet-Loiseau, International Myeloma Working Group. 2009. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia.* 23:2210–2221. doi:10.1038/leu.2009.174.
- Fontana, A., K. Frei, S. Bodmer, E. Hofer, M.H. Schreier, M.A. Palladino, and R.M. Zinkernagel. 1989. Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice. *J. Immunol.* 143:3230–3234.
- Formenti, S.C., and S. Demaria. 2009. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol.* 10:718–726. doi:10.1016/S1470-2045(09)70082-8.
- Formenti, S.C., and S. Demaria. 2013. Combining Radiotherapy and Cancer Immunotherapy: A Paradigm Shift. *J. Natl. Cancer Inst.* doi:10.1093/jnci/djs629.
- Freeman, G.J., A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L.J. Fitts, N. Malenkovich, T. Okazaki, M.C. Byrne, H.F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M.R. Bowman, B.M. Carreno, M. Collins, C.R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192:1027–1034.
- Frey, A.B., and N. Monu. 2008. Signaling defects in anti-tumor T cells. *Immunol. Rev.* 222:192–205. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00606.x.
- Fridman, W.-H., F. Pagès, C. Sautès-Fridman, and J. Galon. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer.* 12:298–306. doi:10.1038/nrc3245.

G

- Gabrilovich, D.I., and S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9:162–174. doi:10.1038/nri2506.
- Gajewski, T.F., Y. Meng, C. Blank, I. Brown, A. Kacha, J. Kline, and H. Harlin. 2006. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol. Rev.* 213:131–145. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00442.x.
- Ganss, R., E. Ryschich, E. Klar, B. Arnold, and G.J. Hämmerling. 2002. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res.* 62:1462–1470.
- Gao, Q., S.-J. Qiu, J. Fan, J. Zhou, X.-Y. Wang, Y.-S. Xiao, Y. Xu, Y.-W. Li, and Z.-Y. Tang. 2007. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol.* 25:2586–2593. doi:10.1200/JCO.2006.09.4565.
- Garfall, A.L., J.A. Fraietta, and M.V. Maus. 2014. Immunotherapy with chimeric antigen receptors for multiple myeloma. *Discovery Medicine.* 17:37–46.
- Garnett, C.T., C. Palena, M. Chakraborty, M. Chakraborty, K.-Y. Tsang, J. Schlom, and J.W. Hodge. 2004. Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 64:7985–7994. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1525.
- Garrett, I.R., S. Dallas, J. Radl, and G.R. Mundy. 1997. A murine model of human myeloma bone disease. *Bone.* 20:515–520.
- Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, T. Cabrera, J.J. Pérez-Villar, M. López-Botet, M. Duggan-Keen, and P.L. Stern. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today.* 18:89–95.
- Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J.-L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Génin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. André, R. Lidereau, N.M. McLaughlin, N.M. Haynes, M.J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 15:1170–1178. doi:10.1038/nm.2028.
- Girart, M.V., M.B. Fuertes, C.I. Domaica, L.E. Rossi, and N.W. Zwirner. 2007. Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. *J. Immunol.* 179:3472–3479. doi:10.4049/jimmunol.179.6.3472.
- Girolomoni, G., and P. Ricciardi-Castagnoli. 1997. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. 102–104.

- Gorelik, L., and R.A. Flavell. 2001. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med.* 7:1118–1122. doi:10.1038/nm1001-1118.
- Gorin, J.-B., J. Menager, S. Gouard, C. Maurel, Y. Guilloux, A. Faivre-Chauvet, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, M. Chérel, F. Davodeau, and J. Gaschet. 2014. Antitumor Immunity Induced after α Irradiation. *Neoplasia.* 16:319–328. doi:10.1016/j.neo.2014.04.002.
- Gorsch, S.M., V.A. Memoli, T.A. Stukel, L.I. Gold, and B.A. Arrick. 1992. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res.* 52:6949–6952.
- Griffin, T.W., J. Collins, F. Bokhari, M. Stochl, A.B. Brill, T. Ito, G. Emond, and H. Sands. 1990. Intraperitoneal immunoconjugates. *Cancer Res.* 50:1031s–1038s.
- Gross, G., T. Waks, and Z. Eshhar. 1989. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10024–10028.
- Grunhagen, D.J., J.H.W. de Wilt, W.J. Graveland, C. Verhoef, A.N. van Geel, and A.M.M. Eggermont. 2006. Outcome and prognostic factor analysis of 217 consecutive isolated limb perfusions with tumor necrosis factor-alpha and melphalan for limb-threatening soft tissue sarcoma. *Cancer.* 106:1776–1784. doi:10.1002/cncr.21802.
- Guillerme, J.-B., N. Boisgerault, D. Roulois, J. Menager, C. Combredet, F. Tangy, J.-F. Fonteneau, and M. Gregoire. 2013. Measles virus-vaccine infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733.
- Guilloux, Y., X.F. Bai, X. Liu, P. Zheng, and Y. Liu. 2001. Optimal induction of effector but not memory antitumor cytotoxic T lymphocytes involves direct antigen presentation by the tumor cells. *Cancer Res.* 61:1107–1112.
- Gulenchyn, K.Y., X. Yao, S.L. Asa, S. Singh, and C. Law. 2012. Radionuclide therapy in neuroendocrine tumours: a systematic review. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 24:294–308. doi:10.1016/j.clon.2011.12.003.
- Gulley, J.L., P.M. Arlen, A. Bastian, S. Morin, J. Marte, P. Beetham, K.-Y. Tsang, J. Yokokawa, J.W. Hodge, C. Ménard, K. Camphausen, C.N. Coleman, F. Sullivan, S.M. Steinberg, J. Schlom, and W. Dahut. 2005. Combining a recombinant cancer vaccine with standard definitive radiotherapy in patients with localized prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 11:3353–3362. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2062.
- Gustafsson, A.M., T. Bäck, J. Elgqvist, L. Jacobsson, R. Hultborn, P. Albertsson, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, H. Jensen, and S. Lindegren. 2012. Comparison of therapeutic efficacy and biodistribution of ²¹³Bi- and ²¹¹At-labeled monoclonal antibody MX35 in an ovarian cancer model. *Nucl. Med. Biol.* 39:15–22. doi:10.1016/j.nucmedbio.2011.07.003.

H

- Hackstein, H., and A.W. Thomson. 2004. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat. Rev. Immunol.* 4:24–34. doi:10.1038/nri1256.
- Han, E.Q., X.-L. Li, C.-R. Wang, T.-F. Li, and S.-Y. Han. 2013. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy: progress and challenges. *J Hematol Oncol.* 6:47. doi:10.1186/1756-8722-6-47.
- Haso, W., D.W. Lee, N.N. Shah, M. Stetler-Stevenson, C.M. Yuan, I.H. Pastan, D.S. Dimitrov, R.A. Morgan, D.J. FitzGerald, D.M. Barrett, A.S. Wayne, C.L. Mackall, and R.J. Orentas. 2013. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 121:1165–1174. doi:10.1182/blood-2012-06-438002.
- Hauck, M.L., and M.R. Zalutsky. 1998. The effects of local hyperthermia on the catabolism of a radioiodinated chimeric monoclonal antibody. *Clin. Cancer Res.* 4:2071–2077.
- Hegde, M., A. Corder, K.K.H. Chow, M. Mukherjee, A. Ashoori, Y. Kew, Y.J. Zhang, D.S. Baskin, F.A. Merchant, V.S. Brawley, T.T. Byrd, S. Krebs, M.F. Wu, H. Liu, H.E. Heslop, S. Gottchalk, E. Yvon, and N. Ahmed. 2013. Combinational targeting offsets antigen escape and enhances effector functions of adoptively transferred T cells in glioblastoma. *Mol. Ther.* 21:2087–2101. doi:10.1038/mt.2013.185.
- Hersey, P., and X.D. Zhang. 2001. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat. Rev. Cancer.* 1:142–150. doi:10.1038/35101078.
- Hicklin, D.J.D., Z.Z. Wang, F.F. Arienti, L.L. Rivoltini, G.G. Parmiani, and S.S. Ferrone. 1998. beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J. Clin. Invest.* 101:2720–2729. doi:10.1172/JCI498.
- Hideshima, T., C. Mitsiades, G. Tonon, P.G. Richardson, and K.C. Anderson. 2007. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer.* 7:585–598. doi:10.1038/nrc2189.
- Hiniker, S.M., D.S. Chen, and S.J. Knox. 2012. Abscopal effect in a patient with melanoma. *N. Engl. J. Med.* 366:2035–author reply 2035–6. doi:10.1056/NEJMc1203984#SA1.
- Hofgaard, P.O., H.C. Jodal, K. Bommert, B. Huard, J. Caers, H. Carlsen, R. Schwarzer, N. Schünemann, F. Jundt, M.M. Lindeberg, and B. Bogen. 2012. A novel mouse model for multiple myeloma (MOPC315.BM) that allows noninvasive spatiotemporal detection of osteolytic disease. *PLoS ONE.* 7:e51892. doi:10.1371/journal.pone.0051892.
- Houston, A., F.D. Waldron-Lynch, M.W. Bennett, D. Roche, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. O'Connell. 2003a. Fas ligand expressed in colon cancer is not associated with increased apoptosis of tumor cells in vivo. *Int. J. Cancer.* 107:209–214. doi:10.1002/ijc.11392.

Houston, A., M.W. Bennett, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. O'Connell. 2003b. Fas ligand mediates immune privilege and not inflammation in human colon cancer, irrespective of TGF-beta expression. *Br. J. Cancer*. 89:1345–1351. doi:10.1038/sj.bjc.6601240.

Huang, M., M. Stolina, S. Sharma, J.T. Mao, L. Zhu, P.W. Miller, J. Wollman, H. Herschman, and S.M. Dubinett. 1998. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res*. 58:1208–1216.

Huneke, R.B., C.G. Pippin, R.A. Squire, M.W. Brechbiel, O.A. Gansow, and M. Strand. 1992. Effective alpha-particle-mediated radioimmunotherapy of murine leukemia. *Cancer Res*. 52:5818–5820.

I

Ifeadi, V., and C. Garnett-Benson. 2012. Sub-lethal irradiation of human colorectal tumor cells imparts enhanced and sustained susceptibility to multiple death receptor signaling pathways. *PLoS ONE*. 7:e31762. doi:10.1371/journal.pone.0031762.

Ishihara, H., K. Tsuneoka, A.B. Dimchev, and M. Shikita. 1993. Induction of the expression of the interleukin-1 beta gene in mouse spleen by ionizing radiation. *Radiat. Res*. 133:321–326.

Ishiyama, H., B.S. Teh, H. Ren, S. Chiang, A. Tann, A.I. Blanco, A.C. Paulino, and R. Amato. 2012. Spontaneous regression of thoracic metastases while progression of brain metastases after stereotactic radiosurgery and stereotactic body radiotherapy for metastatic renal cell carcinoma: abscopal effect prevented by the blood-brain barrier? *Clin Genitourin Cancer*. 10:196–198. doi:10.1016/j.clgc.2012.01.004.

J

J Radl, C.F.H.P.V.D.B.E. de G. 1978. Idiopathic paraproteinaemia. I. Studies in an animal model--the ageing C57BL/KaLwRij mouse. *Clin. Exp. Immunol*. 33:395.

Jain, M., G. Venkatraman, and S.K. Batra. 2007. Optimization of radioimmunotherapy of solid tumors: biological impediments and their modulation. *Clin. Cancer Res*. 13:1374–1382. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2436.

Jain, R.K., L.L. Munn, and D. Fukumura. 2002. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat. Rev. Cancer*. 2:266–276. doi:10.1038/nrc778.

Jurcic, J.G., S.M. Larson, G. Sgouros, M.R. McDevitt, R.D. Finn, C.R. Divgi, Å.M. Ballangrud, K.A. Hamacher, D. Ma, J.L. Humm, M.W. Brechbiel, R. Molinet, and D.A. Scheinberg. 2002. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood*. 100:1233–1239.

K

- Kachikwu, E.L., K.S. Iwamoto, Y.-P. Liao, J.J. DeMarco, N. Agazaryan, J.S. Economou, W.H. McBride, and D. Schae. 2011. Radiation enhances regulatory T cell representation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 81:1128–1135. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.09.034.
- Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 2:251–262. doi:10.1038/nri778.
- Kalos, M., and C.H. June. 2013. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity.* 39:49–60. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.002.
- Kaminski, M.S., K.R. Zasadny, I.R. Francis, A.W. Milik, C.W. Ross, S.D. Moon, S.M. Crawford, J.M. Burgess, N.A. Petry, and G.M. Butchko. 1993. Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with [¹³¹I]anti-B1 (anti-CD20) antibody. *N. Engl. J. Med.* 329:459–465. doi:10.1056/NEJM199308123290703.
- Kaminski, M.S., M. Tuck, J. Estes, A. Kolstad, C.W. Ross, K. Zasadny, D. Regan, P. Kison, S. Fisher, S. Kroll, and R.L. Wahl. 2005. ¹³¹I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 352:441–449. doi:10.1056/NEJMoa041511.
- Kassis, A.I. 2008. Therapeutic radionuclides: biophysical and radiobiologic principles. *Semin Nucl Med.* 38:358–366. doi:10.1053/j.semnuclmed.2008.05.002.
- Kassis, A.I. 2011. Molecular and cellular radiobiological effects of Auger emitting radionuclides. *Radiat Prot Dosimetry.* 143:241–247. doi:10.1093/rpd/ncq385.
- Kassis, A.I., and S.J. Adelstein. 2005. Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J. Nucl. Med.* 46 Suppl 1:4S–12S.
- Keisari, Y., I. Hochman, H. Confino, R. Korenstein, and I. Kelson. 2014. Activation of local and systemic anti-tumor immune responses by ablation of solid tumors with intratumoral electrochemical or alpha radiation treatments - Springer. *Cancer Immunol. Immunother.* 63:1–9. doi:10.1007/s00262-013-1462-2.
- Kelly, M.P., F.T. Lee, K. Tahtis, F.E. Smyth, M.W. Brechbiel, and A.M. Scott. 2007. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting ²¹³Bi-C-functionalized trans-cyclohexyl-diethylenetriaminepentaacetic acid-humanized 3S193 is enhanced by combination with paclitaxel chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 13:5604s–5612s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1071.
- Kennel, S.J., and S. Mirzadeh. 1998. Vascular Targeted Radioimmunotherapy with ²¹³Bi—An α -Particle Emitter. *Nucl. Med. Biol.* 25:241–246.
- Kennel, S.J., R. Boll, M. Stabin, H.M. Schuller, and S. Mirzadeh. 1999. Radioimmunotherapy of micrometastases in lung with vascular targeted ²¹³Bi. *Br. J. Cancer.* 80:175–184. doi:10.1038/sj.bjc.6690337.

- Kennel, S.J., T. Lankford, S. Davern, L. Foote, K. Taniguchi, I. Ohizumi, Y. Tsutsumi, S. Nakagawa, T. Mayumi, and S. Mirzadeh. 2002. Therapy of rat tracheal carcinoma IC-12 in SCID mice: vascular targeting with [213Bi]-MAb TES-23. *Eur. J. Cancer.* 38:1278–1287.
- Kenter, G.G., M.J.P. Welters, A.R.P.M. Valentijn, M.J.G. Löwik, D.M.A. Berends-van der Meer, A.P.G. Vloon, F. Essahsah, L.M. Fathers, R. Offringa, J.W. Drijfhout, A.R. Wafelman, J. Oostendorp, G.J. Fleuren, S.H. van der Burg, and C.J.M. Melief. 2009. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N. Engl. J. Med.* 361:1838–1847. doi:10.1056/NEJMoa0810097.
- Kershaw, M.H., J.A. Westwood, and P.K. Darcy. 2013. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 13:525–541. doi:10.1038/nrc3565.
- Ketterer, N., A.B. Delaloye, C. Helg, F. Luthi, and F. Buchegger. 2007. Radio-immunothérapie du lymphome folliculaire: un pas vers la guérison? *Bull Cancer.* 94:799–806. doi:doi: 10.1684/bdc.2007.0420.
- Khammari, A., N. Labarriere, V. Vignard, J.-M. Nguyen, M.-C. Pandolfino, A.C. Knol, G. Quéreux, S. Saiagh, A. Brocard, F. Jotereau, and B. Dreno. 2009. Treatment of metastatic melanoma with autologous Melan-A/MART-1-specific cytotoxic T lymphocyte clones. *J. Invest. Dermatol.* 129:2835–2842. doi:10.1038/jid.2009.144.
- Khong, H.T., and N.P. Restifo. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.* 3:999–1005. doi:10.1038/ni1102-999.
- Kim, J.-Y., Y.-O. Son, S.-W. Park, J.-H. Bae, J.S. Chung, H.H. Kim, B.-S. Chung, S.-H. Kim, and C.-D. Kang. 2006. Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation. *Exp. Mol. Med.* 38:474–484. doi:10.1038/emm.2006.56.
- Kim, K.-W., S.-H. Kim, J.-G. Shin, G.-S. Kim, Y.-O. Son, S.-W. Park, B.-H. Kwon, D.-W. Kim, C.-H. Lee, M.-Y. Sol, M.-H. Jeong, B.-S. Chung, and C.-D. Kang. 2004. Direct injection of immature dendritic cells into irradiated tumor induces efficient antitumor immunity. *Int. J. Cancer.* 109:685–690. doi:10.1002/ijc.20036.
- Kim, Y.-S., and M.W. Brechbiel. 2012. An overview of targeted alpha therapy. *Tumour Biol.* 33:573–590. doi:10.1007/s13277-011-0286-y.
- Kircher, M.F., J.R. Allport, E.E. Graves, V. Love, L. Josephson, A.H. Lichtman, and R. Weissleder. 2003. In vivo high resolution three-dimensional imaging of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte trafficking to tumors. *Cancer Res.* 63:6838–6846.
- Kitson, S.L., V. Cuccurullo, T.S. Moody, and L. Mansi. 2013. Radionuclide antibody-conjugates, a targeted therapy towards cancer. *Curr Radiopharm.* 6:57–71.
- Kneifel, S., D. Cordier, S. Good, M.C.S. Ionescu, A. Ghaffari, S. Hofer, M. Kretzschmar, M. Tolnay, C. Apostolidis, B. Waser, M. Arnold, J. Mueller-Brand, H.R. Maecke, J.C. Reubi, and A. Merlo. 2006. Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-substance p. *Clin. Cancer Res.* 12:3843–3850. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2820.

- Kochenderfer, J.N., and S.A. Rosenberg. 2013. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nat Rev Clin Oncol*. 10:267–276. doi:10.1038/nrclinonc.2013.46.
- Koppe, M.J., R.P. Bleichrodt, A.C. Soede, A.A. Verhofstad, D.M. Goldenberg, W.J.G. Oyen, and O.C. Boerman. 2004. Biodistribution and therapeutic efficacy of (125/131)I-, (186)Re-, (88/90)Y-, or (177)Lu-labeled monoclonal antibody MN-14 to carcinoembryonic antigen in mice with small peritoneal metastases of colorectal origin. *J. Nucl. Med.* 45:1224–1232.
- Korkolopoulou, P., L. Kaklamanis, F. Pezzella, A.L. Harris, and K.C. Gatter. 1996. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br. J. Cancer*. 73:148–153.
- Kotera, Y., K. Shimizu, and J.J. Mulé. 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.
- Kowolik, C.M., M.S. Topp, S. Gonzalez, T. Pfeiffer, S. Olivares, N. Gonzalez, D.D. Smith, S.J. Forman, M.C. Jensen, and L.J.N. Cooper. 2006. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res*. 66:10995–11004. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0160.
- Köhler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256:495–497.
- Kraeber-Bodéré, F., A. Faibre-Chauvet, C. Saï-Maurel, E. Gautherot, M. Fiche, L. Campion, J. Le Boterff, J. Barbet, J.F. Chatal, and P. Thédrez. 1999. Bispecific antibody and bivalent hapten radioimmunotherapy in CEA-producing medullary thyroid cancer xenograft. *J. Nucl. Med.* 40:198–204.
- Kraeber-Bodéré, F., P.-Y. Salaun, A. Oudoux, D.M. Goldenberg, J.-F. Chatal, and J. Barbet. 2010. Pretargeted radioimmunotherapy in rapidly progressing, metastatic, medullary thyroid cancer. *Cancer*. 116:1118–1125. doi:10.1002/cncr.24800.
- Kramer, K., J.L. Humm, M.M. Souweidane, P.B. Zanzonico, I.J. Dunkel, W.L. Gerald, Y. Khakoo, S.D. Yeh, H.W. Yeung, R.D. Finn, S.L. Wolden, S.M. Larson, and N.-K.V. Cheung. 2007. Phase I study of targeted radioimmunotherapy for leptomeningeal cancers using intra-Ommaya 131-I-3F8. *J. Clin. Oncol*. 25:5465–5470. doi:10.1200/JCO.2007.11.1807.
- Kristinsson, S.Y., O. Landgren, P.W. Dickman, A.R. Derolf, and M. Björkholm. 2007. Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *J. Clin. Oncol*. 25:1993–1999. doi:10.1200/JCO.2006.09.0100.
- Kroemer, G., and L. Zitvogel. 2012. Abscopal but desirable: The contribution of immune responses to the efficacy of radiotherapy. *Oncoimmunology*. 1:407–408.

- Kroemer, G., L. Galluzzi, O. Kepp, and L. Zitvogel. 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 31:51–72. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100008.
- Kryczek, I., R. Liu, G. Wang, K. Wu, X. Shu, W. Szeliga, L. Vatan, E. Finlayson, E. Huang, D. Simeone, B. Redman, T.H. Welling, A. Chang, and W. Zou. 2009. FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res.* 69:3995–4000. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3804.
- Kryczek, I., S. Wei, L. Vatan, J. Escara-Wilke, W. Szeliga, E.T. Keller, and W. Zou. 2007. Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J. Immunol.* 179:1423–1426.
- Kukreja, A., S. Radfar, B.-H. Sun, K. Insogna, and M.V. Dhodapkar. 2009. Dominant role of CD47-thrombospondin-1 interactions in myeloma-induced fusion of human dendritic cells: implications for bone disease. *Blood.* 114:3413–3421. doi:10.1182/blood-2009-03-211920.
- Kumar, S.K., S.V. Rajkumar, A. Dispenzieri, M.Q. Lacy, S.R. Hayman, F.K. Buadi, S.R. Zeldenrust, D. Dingli, S.J. Russell, J.A. Lust, P.R. Greipp, R.A. Kyle, and M.A. Gertz. 2008. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood.* 111:2516–2520. doi:10.1182/blood-2007-10-116129.
- Kwilas, A.R., R.N. Donahue, M.B. Bernstein, and J.W. Hodge. 2012. In the field: exploiting the untapped potential of immunogenic modulation by radiation in combination with immunotherapy for the treatment of cancer. *Front Oncol.* 2:104. doi:10.3389/fonc.2012.00104.
- Kyle, R.A., and S.V. Rajkumar. 2004. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 351:1860–1873. doi:10.1056/NEJMra041875.
- Kyle, R.A., and S.V. Rajkumar. 2008. Multiple myeloma. *Blood.* 111:2962–2972. doi:10.1182/blood-2007-10-078022.

L

- Labarriere, N., M.-C. Pandolfino, N. Gervois, A. Khammari, M.H. Tessier, B. Dreno, and F. Jotereau. 2002. Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 51:532–538. doi:10.1007/s00262-002-0313-3.
- Ladoire, S., L. Arnould, L. Apetoh, B. Coudert, F. Martin, B. Chauffert, P. Fumoleau, and F. Ghiringhelli. 2008. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin. Cancer Res.* 14:2413–2420. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4491.
- Lamers, C.H., S. Sleijfer, S. van Steenbergen, P. van Elzakker, B. van Krimpen, C. Groot, A. Vulto, M. den Bakker, E. Oosterwijk, R. Debets, and J.W. Gratama. 2013. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol. Ther.* 21:904–912. doi:10.1038/mt.2013.17.

- Landowski, T.H., N. Qu, I. Buyuksal, J.S. Painter, and W.S. Dalton. 1997. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood*. 90:4266–4270.
- Langmuir, V.K., H.L. Mendonca, and D.V. Woo. 1992. Comparisons between two monoclonal antibodies that bind to the same antigen but have differing affinities: uptake kinetics and ¹²⁵I-antibody therapy efficacy in multicell spheroids. *Cancer Res*. 52:4728–4734.
- Leffers, N., M.J.M. Gooden, R.A. de Jong, B.-N. Hoogeboom, K.A. ten Hoor, H. Hollema, H.M. Boezen, A.G.J. van der Zee, T. Daemen, and H.W. Nijman. 2009. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol. Immunother*. 58:449–459. doi:10.1007/s00262-008-0583-5.
- Less, J.R., T.C. Skalak, E.M. Sevick, and R.K. Jain. 1991. Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. *Cancer Res*. 51:265–273.
- Leu, A.J., D.A. Berk, A. Lymboussaki, K. Alitalo, and R.K. Jain. 2000. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res*. 60:4324–4327.
- Li, J., M. He, B. Shen, D. Yuan, and C. Shao. 2013. Alpha particle-induced bystander effect is mediated by ROS via a p53-dependent SCO2 pathway in hepatoma cells. *Int. J. Radiat. Biol*. 89:1028–1034. doi:10.3109/09553002.2013.817706.
- Lin, E.Y., A.V. Nguyen, R.G. Russell, and J.W. Pollard. 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med*. 193:727–740.
- Lindén, O., C. Hindorf, E. Cavallin-Ståhl, W.A. Wegener, D.M. Goldenberg, H. Horne, T. Ohlsson, L. Stenberg, S.-E. Strand, and J. Tennvall. 2005. Dose-fractionated radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma using DOTA-conjugated, ⁹⁰Y-radiolabeled, humanized anti-CD22 monoclonal antibody, epratuzumab. *Clin. Cancer Res*. 11:5215–5222. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0172.
- Little, M., S.M. Kipriyanov, F. Le Gall, and G. Moldenhauer. 2000. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol. Today*. 21:364–370.
- Liu, J., Y. Duan, X. Cheng, X. Chen, W. Xie, H. Long, Z. Lin, and B. Zhu. 2010. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 407:348–354. doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.021.
- Locke, F.L., T. Nishihori, M. Alsina, and M.A. Kharfan-Dabaja. 2013. Immunotherapy strategies for multiple myeloma: the present and the future. *Immunotherapy*. 5:1005–1020. doi:10.2217/imt.13.97.
- Loza, M.J., L. Zamai, L. Azzoni, E. Rosati, and B. Perussia. 2002. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood*. 99:1273–1281.

Lugade, A.A., E.W. Sorensen, S.A. Gerber, J.P. Moran, J.G. Frelinger, and E.M. Lord. 2008. Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. *J. Immunol.* 180:3132–3139. doi:10.4049/jimmunol.180.5.3132.

Lugade, A.A., J.P. Moran, S.A. Gerber, R.C. Rose, J.G. Frelinger, and E.M. Lord. 2005. Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J. Immunol.* 174:7516–7523. doi:10.4049/jimmunol.174.12.7516.

M

Ma, D., M.R. McDevitt, R.D. Finn, and D.A. Scheinberg. 2001. Rapid preparation of short-lived alpha particle emitting radioimmunopharmaceuticals. *Appl Radiat Isot.* 55:463–470. doi:10.1016/S0969-8043(01)00048-3.

Ma, Y., O. Kepp, F. Ghiringhelli, L. Apetoh, L. Aymeric, C. Locher, A. Tesniere, I. Martins, A. Ly, N.M. Haynes, M.J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2010. Chemotherapy and radiotherapy: cryptic anticancer vaccines. *Semin. Immunol.* 22:113–124. doi:10.1016/j.smim.2010.03.001.

Mahnke, K., K. Schönfeld, S. Fondel, S. Ring, S. Karakhanova, K. Wiedemeyer, T. Bedke, T.S. Johnson, V. Storn, S. Schallenberg, and A.H. Enk. 2007. Depletion of CD4+CD25+ human regulatory T cells in vivo: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro. *Int. J. Cancer.* 120:2723–2733. doi:10.1002/ijc.22617.

Malamitsi, J., J. Zorzos, A.D. Varvarigou, S. Archimandritis, C. Dassiou, D.V. Skarlos, P. Dimitriou, M. Likourinas, A. Zizi, and C. Proukakis. 1995. Immunolocalization of transitional cell carcinoma of the bladder with intravesically administered technetium-99m labelled HMFG1 monoclonal antibody. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 22:25–31. doi:10.1007/BF00997244.

Manz, M.G., T. Miyamoto, K. Akashi, and I.L. Weissman. 2002. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:11872–11877. doi:10.1073/pnas.172384399.

Martins, I., A. Tesniere, O. Kepp, M. Michaud, F. Schlemmer, L. Senovilla, C. Séror, D. Métivier, J.-L. Perfettini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2009. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle.* 8:3723–3728. doi:10.4161/cc.8.22.10026.

Martins, I., Y. Wang, M. Michaud, Y. Ma, A.Q. Sukkurwala, S. Shen, O. Kepp, D. Métivier, L. Galluzzi, J.-L. Perfettini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2014. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ.* 21:79–91. doi:10.1038/cdd.2013.75.

Mason, K.A., H. Ariga, R. Neal, D. Valdecanas, N. Hunter, A.M. Krieg, J.K. Whisnant, and L. Milas. 2005. Targeting toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* 11:361–369.

- Mateos, M.-V., J.-M. Hernández, M.-T. Hernández, N.-C. Gutiérrez, L. Palomera, M. Fuertes, J. Díaz-Mediavilla, J.-J. Lahuerta, J. de la Rubia, M.-J. Terol, A. Sureda, J. Bargay, P. Ribas, F. de Arriba, A. Alegre, A. Oriol, D. Carrera, J. García-Laraña, R. García-Sanz, J. Bladé, F. Prósper, G. Mateo, D.-L. Esseltine, H. van de Velde, and J.-F.S. Miguel. 2006. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study. *Blood*. 108:2165–2172. doi:10.1182/blood-2006-04-019778.
- Matloubian, M., R.J. Concepcion, and R. Ahmed. 1994. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J. Virol.* 68:8056–8063.
- Matsumura, S., and S. Demaria. 2010. Up-regulation of the pro-inflammatory chemokine CXCL16 is a common response of tumor cells to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 173:418–425. doi:10.1667/RR1860.1.
- Matsumura, S., B. Wang, N. Kawashima, S. Braunstein, M. Badura, T.O. Cameron, J.S. Babb, R.J. Schneider, S.C. Formenti, M.L. Dustin, and S. Demaria. 2008. Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. *The Journal of Immunology*. 181:3099–3107.
- Maus, M.V., S.A. Grupp, D.L. Porter, and C.H. June. 2014. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*. 123:2625–2635. doi:10.1182/blood-2013-11-492231.
- McDevitt, M.R., E. Barendswaard, D. Ma, L. Lai, M.J. Curcio, G. Sgouros, A.M. Ballangrud, W.H. Yang, R.D. Finn, V. Pellegrini, M.W. Geerlings, M. Lee, M.W. Brechbiel, N.H. Bander, C. Cordon-Cardo, and D.A. Scheinberg. 2000. An alpha-particle emitting antibody ([²¹³Bi]J591) for radioimmunotherapy of prostate cancer. *Cancer Res.* 60:6095–6100.
- McDevitt, M.R., G. Sgouros, R.D. Finn, J.L. Humm, J.G. Jurcic, S.M. Larson, and D.A. Scheinberg. 1998. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med.* 25:1341–1351.
- McDevitt, M.R., R.D. Finn, G. Sgouros, D. Ma, and D.A. Scheinberg. 1999. An ²²⁵Ac/²¹³Bi generator system for therapeutic clinical applications: construction and operation. *Appl Radiat Isot.* 50:895–904.
- McElwain, T.J., and R.L. Powles. 1983. High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. *Lancet.* 2:822–824.
- McHugh, R.S., M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, and M.C. Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 16:311–323. doi:10.1016/S1074-7613(02)00280-7.
- Medrek, C., F. Pontén, K. Jirström, and K. Leandersson. 2012. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer.* 12:306. doi:10.1186/1471-2407-12-306.

- Meeker, T.C., J. Lowder, D.G. Maloney, R.A. Miller, K. Thielemans, R. Warnke, and R. Levy. 1985. A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy. *Blood*. 65:1349–1363.
- Melief, C.J.M. 2008. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity*. 29:372–383. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.004.
- Melief, C.J.M., and S.H. van der Burg. 2008. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat. Rev. Cancer*. 8:351–360. doi:10.1038/nrc2373.
- Menager, J., F. Ebstein, R. Oger, P. Hulin, S. Nedellec, E. Duverger, A. Lehmann, P.-M. Kloetzel, F. Jotereau, and Y. Guilloux. 2014. Cross-Presentation of Synthetic Long Peptides by Human Dendritic Cells: A Process Dependent on ERAD Component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1. *PLoS ONE*. 9:e89897. doi:10.1371/journal.pone.0089897.
- Menu, E., K. Asosingh, I. Van Riet, P. Croucher, B. Van Camp, and K. Vanderkerken. 2004. Myeloma cells (5TMM) and their interactions with the marrow microenvironment. *Blood Cells Mol. Dis.* 33:111–119. doi:10.1016/j.bcmed.2004.04.012.
- Michaud, M., I. Martins, A.Q. Sukkurwala, S. Adjemian, Y. Ma, P. Pellegatti, S. Shen, O. Kepp, M. Scoazec, G. Mignot, S. Rello-Varona, M. Tailler, L. Menger, E. Vacchelli, L. Galluzzi, F. Ghiringhelli, F. di Virgilio, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2011. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*. 334:1573–1577. doi:10.1126/science.1208347.
- Michel, R.B., A.V. Rosario, M.W. Brechbiel, T.J. Jackson, D.M. Goldenberg, and M.J. Mattes. 2003. Experimental therapy of disseminated B-Cell lymphoma xenografts with ²¹³Bi-labeled anti-CD74. *Nucl. Med. Biol.* 30:715–723.
- Mihara, K., J. Bhattacharyya, A. Kitanaka, K. Yanagihara, T. Kubo, Y. Takei, H. Asaoku, Y. Takihara, and A. Kimura. 2012. T-cell immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 is effective in eliminating myeloma cells. *Leukemia*. 26:365–367. doi:10.1038/leu.2011.205.
- Milas, L., K.A. Mason, H. Ariga, N. Hunter, R. Neal, D. Valdecanas, A.M. Krieg, and J.K. Whisnant. 2004. CpG oligodeoxynucleotide enhances tumor response to radiation. *Cancer Res.* 64:5074–5077. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0926.
- Milas, L., N. Hunter, and H.R. Withers. 1975. Combination of local irradiation with systemic application of anaerobic corynebacteria in therapy of a murine fibrosarcoma. *Cancer Res.* 35:1274–1277.
- Milenic, D.E., K. Garmestani, E.D. Brady, P.S. Albert, D. Ma, A. Abdulla, and M.W. Brechbiel. 2004. Targeting of HER2 antigen for the treatment of disseminated peritoneal disease. *Clin. Cancer Res.* 10:7834–7841. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1226.

- Milone, M.C., J.D. Fish, C. Carpenito, R.G. Carroll, G.K. Binder, D. Teachey, M. Samanta, M. Lakhali, B. Gloss, G. Danet-Desnoyers, D. Campana, J.L. Riley, S.A. Grupp, and C.H. June. 2009. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol. Ther.* 17:1453–1464. doi:10.1038/mt.2009.83.
- Minchinton, A.I., and I.F. Tannock. 2006. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer.* 6:583–592. doi:10.1038/nrc1893.
- Moretta, A. 2002. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 2:957–964. doi:10.1038/nri956.
- Moretta, L., G. Ferlazzo, C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, M.C. Mingari, and A. Moretta. 2006. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol. Rev.* 214:219–228. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00450.x.
- Morgan, W.F. 2003. Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene.* 22:7094–7099. doi:10.1038/sj.onc.1206992.
- Moser, B., and P. Loetscher. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* 2:123–128. doi:10.1038/84219.
- Mosmann, T.R., and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today.* 17:138–146. doi:10.1016/0167-5699(96)80606-2.
- Mothersill, C., and C.B. Seymour. 2004. Radiation-induced bystander effects--implications for cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 4:158–164. doi:10.1038/nrc1277.
- Mulford, D.A., D.A. Scheinberg, and J.G. Jurcic. 2005. The promise of targeted α -particle therapy. *J. Nucl. Med.* 46 Suppl 1:199S–204S.

N

- Navarro-Teulon, I., C. Lozza, A. Pèlerin, E. Vivès, and J.-P. Pouget. 2013. General overview of radioimmunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy.* 5:467–487. doi:10.2217/imt.13.34.
- Newcomb, E.W., S. Demaria, Y. Lukyanov, Y. Shao, T. Schnee, N. Kawashima, L. Lan, J.K. Dewyngaert, D. Zagzag, W.H. McBride, and S.C. Formenti. 2006. The combination of ionizing radiation and peripheral vaccination produces long-term survival of mice bearing established invasive GL261 gliomas. *Clin. Cancer Res.* 12:4730–4737. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0593.
- Newcomb, E.W., Y. Lukyanov, N. Kawashima, M. Alonso-Basanta, S.-C. Wang, M. Liu, M. Jure-Kunkel, D. Zagzag, S. Demaria, and S.C. Formenti. 2010. Radiotherapy enhances antitumor effect of anti-CD137 therapy in a mouse Glioma model. *Radiat. Res.* 173:426–432. doi:10.1667/RR1904.1.

Nikitina, E.Y., and D.I. Gabrilovich. 2001. Combination of gamma-irradiation and dendritic cell administration induces a potent antitumor response in tumor-bearing mice: approach to treatment of advanced stage cancer. *Int. J. Cancer*. 94:825–833.

Nikula, T.K., M.R. McDevitt, R.D. Finn, C. Wu, R.W. Kozak, K. Garmestani, M.W. Brechbiel, M.J. Curcio, C.G. Pippin, L. Tiffany-Jones, M.W. Geerlings, C. Apostolidis, R. Molinet, M.W. Geerlings, O.A. Gansow, and D.A. Scheinberg. 1999. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J. Nucl. Med.* 40:166–176.

Noonan, K., L. Marchionni, J. Anderson, D. Pardoll, G.D. Roodman, and I. Borrello. 2010. A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*. 116:3554–3563. doi:10.1182/blood-2010-05-283895.

Noonan, K., W. Matsui, P. Serafini, R. Carbley, G. Tan, J. Khalili, M. Bonyhadi, H. Levitsky, K. Whartenby, and I. Borrello. 2005. Activated marrow-infiltrating lymphocytes effectively target plasma cells and their clonogenic precursors. *Cancer Res.* 65:2026–2034. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3337.

Novak, A.J., J.R. Darce, B.K. Arendt, B. Harder, K. Henderson, W. Kindsvogel, J.A. Gross, P.R. Greipp, and D.F. Jelinek. 2004. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood*. 103:689–694. doi:10.1182/blood-2003-06-2043.

O

O'Donoghue, J.A., M. Bardiès, and T.E. Wheldon. 1995. Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *J. Nucl. Med.* 36:1902–1909.

O'Neill, D.W., S. Adams, and N. Bhardwaj. 2004. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood*. 104:2235–2246. doi:10.1182/blood-2003-12-4392.

O'Shea, J.J., and W.E. Paul. 2010. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 327:1098–1102. doi:10.1126/science.1178334.

Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.-L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Métivier, N. Larochette, P. Van Endert, F. Ciccocanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 13:54–61. doi:10.1038/nm1523.

Ochsenbein, A.F. 2002. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 9:1043–1055. doi:10.1038/sj.cgt.7700540.

Ocqueteau, M., J.F. San Miguel, M. González, J. Almeida, and A. Orfao. 1996. Do myelomatous plasma cells really express surface immunoglobulins? *Haematologica*. 81:460–463.

Ohba, K., K. Omagari, T. Nakamura, N. Ikuno, S. Saeki, I. Matsuo, H. Kinoshita, J. Masuda, H. Hazama, I. Sakamoto, and S. Kohno. 1998. Abscopal regression of hepatocellular carcinoma after radiotherapy for bone metastasis. *Gut*. 43:575–577. doi:10.1136/gut.43.4.575.

Onishi, M., S. Kinoshita, Y. Morikawa, A. Shibuya, J. Phillips, L.L. Lanier, D.M. Gorman, G.P. Nolan, A. Miyajima, and T. Kitamura. 1996. Applications of retrovirus-mediated expression cloning. *Exp Hematol*. 24:324–329.

Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi. 2008. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:10113–10118. doi:10.1073/pnas.0711106105.

Oranger, A., C. Carbone, M. Izzo, and M. Grano. 2013. Cellular mechanisms of multiple myeloma bone disease. *Clin. Dev. Immunol*. 2013:289458. doi:10.1155/2013/289458.

Oyama, T., S. Ran, T. Ishida, S. Nadaf, L. Kerr, D.P. Carbone, and D.I. Gabrilovich. 1998. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol*. 160:1224–1232.

P

Padera, T.P., B.R. Stoll, J.B. Tooredman, D. Capen, E. di Tomaso, and R.K. Jain. 2004. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*. 427:695. doi:10.1038/427695a.

Pagel, J.M., T.A. Gooley, J. Rajendran, D.R. Fisher, W.A. Wilson, B.M. Sandmaier, D.C. Matthews, H.J. Deeg, A.K. Gopal, P.J. Martin, R.F. Storb, O.W. Press, and F.R. Appelbaum. 2009. Allogeneic hematopoietic cell transplantation after conditioning with 131I-anti-CD45 antibody plus fludarabine and low-dose total body irradiation for elderly patients with advanced acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*. 114:5444–5453. doi:10.1182/blood-2009-03-213298.

Palumbo, A., and K. Anderson. 2011. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 364:1046–1060. doi:10.1056/NEJMra1011442.

Panaretakis, T., N. Joza, N. Modjtahedi, A. Tesniere, I. Vitale, M. Durchschlag, G.M. Fimia, O. Kepp, M. Piacentini, K.-U. Froehlich, P. van Endert, L. Zitvogel, F. Madeo, and G. Kroemer. 2008. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ*. 15:1499–1509. doi:10.1038/cdd.2008.67.

Panaretakis, T., O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A.-C. Bjorklund, D.C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. Van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D.B. Williams, and G. Kroemer. 2009. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J*. 28:578–590. doi:10.1038/emboj.2009.1.

- Park, S.I., J. Shenoi, J.M. Pagel, D.K. Hamlin, D.S. Wilbur, N. Orgun, A.L. Kenoyer, S. Frayo, A. Axtman, T. Bäck, Y. Lin, D.R. Fisher, A.K. Gopal, D.J. Green, and O.W. Press. 2010. Conventional and pretargeted radioimmunotherapy using bismuth-213 to target and treat non-Hodgkin lymphomas expressing CD20: a preclinical model toward optimal consolidation therapy to eradicate minimal residual disease. *Blood*. 116:4231–4239. doi:10.1182/blood-2010-05-282327.
- Petersen, R.P., M.J. Campa, J. Sperlazza, D. Conlon, M.-B. Joshi, D.H. Harpole, and E.F. Patz. 2006. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*. 107:2866–2872. doi:10.1002/cncr.22282.
- Pfeffer, L.M., C.A. Dinarello, R.B. Herberman, B.R. Williams, E.C. Borden, R. Bordens, M.R. Walter, T.L. Nagabhushan, P.P. Trotta, and S. Pestka. 1998. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res*. 58:2489–2499.
- Pillay, V., H.K. Gan, and A.M. Scott. 2011. Antibodies in oncology. *N Biotechnol*. 28:518–529. doi:10.1016/j.nbt.2011.03.021.
- Pollard, J.W. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. 4:71–78. doi:10.1038/nrc1256.
- Porter, D.L., B.L. Levine, M. Kalos, A. Bagg, and C.H. June. 2011. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med*. 365:725–733. doi:10.1056/NEJMoa1103849.
- Postow, M.A., M.K. Callahan, C.A. Barker, Y. Yamada, J. Yuan, S. Kitano, Z. Mu, T. Rasalan, M. Adamow, E. Ritter, C. Sedrak, A.A. Jungbluth, R. Chua, A.S. Yang, R.-A. Roman, S. Rosner, B. Benson, J.P. Allison, A.M. Lesokhin, S. Gnjjatic, and J.D. Wolchok. 2012. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N. Engl. J. Med*. 366:925–931. doi:10.1056/NEJMoa1112824.
- Prabhala, R.H., D. Pelluru, M. Fulciniti, H.K. Prabhala, P. Nanjappa, W. Song, C. Pai, S. Amin, Y.-T. Tai, P.G. Richardson, I.M. Ghobrial, S.P. Treon, J.F. Daley, K.C. Anderson, J.L. Kutok, and N.C. Munshi. 2010. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood*. 115:5385–5392. doi:10.1182/blood-2009-10-246660.
- Prabhala, R.H., P. Neri, J.E. Bae, P. Tassone, M.A. Shamma, C.K. Allam, J.F. Daley, D. Chauhan, E. Blanchard, H.S. Thatte, K.C. Anderson, and N.C. Munshi. 2006. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*. 107:301–304. doi:10.1182/blood-2005-08-3101.
- Press, O.W., J.F. Eary, F.R. Appelbaum, P.J. Martin, C.C. Badger, W.B. Nelp, S. Glenn, G. Butchko, D. Fisher, and B. Porter. 1993. Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N. Engl. J. Med*. 329:1219–1224. doi:10.1056/NEJM199310213291702.
- Pressman, D., and L. Korngold. 1953. The in vivo localization of anti-Wagner-osteogenic-sarcoma antibodies. *Cancer*. 6:619–623.

Prise, K.M., and J.M. O'Sullivan. 2009. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 9:351–360. doi:10.1038/nrc2603.

Propper, D.J., D. Chao, J.P. Braybrooke, P. Bahl, P. Thavasu, F. Balkwill, H. Turley, N. Dobbs, K. Gatter, D.C. Talbot, A.L. Harris, and T.S. Ganesan. 2003. Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 9:84–92.

Q

Qu, C.F., E.Y. Song, Y. Li, S.M. Rizvi, C. Raja, R. Smith, A. Morgenstern, C. Apostolidis, and B.J. Allen. 2005. Pre-clinical study of ²¹³Bi labeled PAI2 for the control of micrometastatic pancreatic cancer. *Clinical & experimental metastasis*. 22:575–586.

Quang, T.S., and L.W. Brady. 2004. Radioimmunotherapy as a novel treatment regimen: ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody 425 in the treatment of high-grade brain gliomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58:972–975. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.09.096.

R

Radl, J., J.W. Croese, C. Zurcher, M.H. Van den Enden-Vieveen, and A.M. de Leeuw. 1988. Animal model of human disease. Multiple myeloma. *The American Journal of Pathology*. 132:593.

Raja, C., P. Graham, S.M. Abbas Rizvi, E. Song, H. Goldsmith, J. Thompson, A. Bosserhoff, A. Morgenstern, C. Apostolidis, J. Kearsley, R. Reisfeld, and B.J. Allen. 2007. Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *cbr*. 6:846–852.

Rajkumar, S.V., E. Blood, D. Vesole, R. Fonseca, P.R. Greipp, Eastern Cooperative Oncology Group. 2006. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 24:431–436. doi:10.1200/JCO.2005.03.0221.

Rajkumar, S.V., S.R. Hayman, M.Q. Lacy, A. Dispenzieri, S.M. Geyer, B. Kabat, S.R. Zeldenrust, S. Kumar, P.R. Greipp, R. Fonseca, J.A. Lust, S.J. Russell, R.A. Kyle, T.E. Witzig, and M.A. Gertz. 2005. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*. 106:4050–4053. doi:10.1182/blood-2005-07-2817.

Ratta, M., F. Fagnoni, A. Curti, R. Vescovini, P. Sansoni, B. Oliviero, M. Fogli, E. Ferri, G.R. Della Cuna, S. Tura, M. Baccarani, and R.M. Lemoli. 2002. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood*. 100:230–237. doi:10.1182/blood.V100.1.230.

Read, S., V. Malmström, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 192:295–302.

- Rees, G. 1981. Abscopal regression in lymphoma: a mechanism in common with total body irradiation? *Clinical radiology*. 32:475–480. doi:10.1016/S0009-9260(81)80310-8.
- Reits, E.A., J.W. Hodge, C.A. Herberts, T.A. Groothuis, M. Chakraborty, E.K. Wansley, K. Camphausen, R.M. Luiten, A.H. de Ru, J. Neijssen, A. Griekspoor, E. Mesman, F.A. Verreck, H. Spits, J. Schlom, P. van Veelen, and J.J. Neefjes. 2006. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* 203:1259–1271. doi:10.1084/jem.20052494.
- Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg. 2012. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat. Rev. Immunol.* 12:269–281. doi:10.1038/nri3191.
- Richardson, P.G., P. Sonneveld, M.W. Schuster, D. Irwin, E.A. Stadtmauer, T. Facon, J.-L. Harousseau, D. Ben-Yehuda, S. Lonial, H. Goldschmidt, D. Reece, J.F. San-Miguel, J. Bladé, M. Boccadoro, J. Cavenagh, W.S. Dalton, A.L. Boral, D.L. Esseltine, J.B. Porter, D. Schenkein, K.C. Anderson, and K.C. Anderson. 2005. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 352:2487–2498. doi:10.1056/NEJMoa043445.
- Rieber, M., and M.S. Rieber. 2008. Sensitization to radiation-induced DNA damage accelerates loss of bcl-2 and increases apoptosis and autophagy. *cbt.* 7:1561–1566.
- Riva, P., A. Arista, V. Tison, C. Sturiale, G. Franceschi, A. Spinelli, N. Riva, M. Casi, G. Moscatelli, and M. Frattarelli. 1994. Intralesional radioimmunotherapy of malignant gliomas. An effective treatment in recurrent tumors. *Cancer.* 73:1076–1082.
- Rizvi, S.M.A., C.F. Qu, Y.J. Song, C. Raja, and B.J. Allen. 2005. In vivo studies of pharmacokinetics and efficacy of Bismuth-213 labeled antimelanoma monoclonal antibody 9.2.27. *cbt.* 4:763–768. doi:10.4161/cbt.4.7.1868.
- Rodriguez-Rocha, H., A. Garcia-Garcia, M.I. Panayiotidis, and R. Franco. 2011. DNA damage and autophagy. *Mutat. Res.* 711:158–166. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.03.007.
- Rose, A.C., P.J. Shenoy, G. Garrett, M. Seward, R.A. Kucuk, H. Doksansky, L.J. Nastoupil, and C.R. Flowers. 2012. A systematic literature review and meta-analysis of radioimmunotherapy consolidation for patients with untreated follicular lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 12:393–399. doi:10.1016/j.clml.2012.09.012.
- Rosenberg, S.A., and M.E. Dudley. 2009. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr. Opin. Immunol.* 21:233–240. doi:10.1016/j.coi.2009.03.002.
- Rosenberg, S.A., J.C. Yang, R.M. Sherry, U.S. Kammula, M.S. Hughes, G.Q. Phan, D.E. Citrin, N.P. Restifo, P.F. Robbins, J.R. Wunderlich, K.E. Morton, C.M. Laurencot, S.M. Steinberg, D.E. White, and M.E. Dudley. 2011. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 17:4550–4557. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.
- Rosenberg, S.A., J.J. Mulé, P.J. Spiess, C.M. Reichert, and S.L. Schwarz. 1985. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J. Exp. Med.* 161:1169–1188.

- Rosenberg, S.A., J.R. Yannelli, J.C. Yang, S.L. Topalian, D.J. Schwartzentruber, J.S. Weber, D.R. Parkinson, C.A. Seipp, J.H. Einhorn, and D.E. White. 1994. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J. Natl. Cancer Inst.* 86:1159–1166.
- Rosenberg, S.A., N.P. Restifo, J.C. Yang, R.A. Morgan, and M.E. Dudley. 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* 8:299–308. doi:10.1038/nrc2355.
- Rosenberg, S.A., P. Aebbersold, K. Cornetta, A. Kasid, R.A. Morgan, R. Moen, E.M. Karson, M.T. Lotze, J.C. Yang, and S.L. Topalian. 1990. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* 323:570–578. doi:10.1056/NEJM199008303230904.
- Rosenblat, T.L., M.R. McDevitt, D.A. Mulford, N. Pandit-Taskar, C.R. Divgi, K.S. Panageas, M.L. Heaney, S. Chanel, A. Morgenstern, G. Sgouros, S.M. Larson, D.A. Scheinberg, and J.G. Jurcic. 2010. Sequential cytarabine and alpha-particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 16:5303–5311. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0382.
- Rousseau, C., L. Ferrer, S. Supiot, M. Bardiès, F. Davodeau, A. Faivre-Chauvet, P. Baumgartner, J. Wijdenes, M. Lacombe, J. Barbet, T. Guillaume, P. Moreau, J.-L. Harousseau, F. Kraeber-Bodéré, and M. Chérel. 2012. Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B-B4) antibody in multiple myeloma patients. *Tumour Biol.* 33:679–688. doi:10.1007/s13277-012-0362-y.
- Ruocco, M.G., K.A. Pilonis, N. Kawashima, M. Cammer, J. Huang, J.S. Babb, M. Liu, S.C. Formenti, M.L. Dustin, and S. Demaria. 2012. Suppressing T cell motility induced by anti-CTLA-4 monotherapy improves antitumor effects. *J. Clin. Invest.* 122:3718–3730. doi:10.1172/JCI61931DS1.

S

- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182:18–32.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 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.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1999. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J. Exp. Med.* 189:611–614.

- Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.* 29:1617–1625. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-3.
- Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 18:593–620. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.593.
- Sanda, M.G., N.P. Restifo, J.C. Walsh, Y. Kawakami, W.G. Nelson, D.M. Pardoll, and J.W. Simons. 1995. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:280–285.
- Santoro, L., S. Boutaleb, V. Garambois, C. Bascoul-Molleivi, V. Boudousq, P.-O. Kotzki, M. Pèlegriin, I. Navarro-Teulon, A. Pèlegriin, and J.-P. Pouget. 2009. Noninternalizing monoclonal antibodies are suitable candidates for 125I radioimmunotherapy of small-volume peritoneal carcinomatosis. *J. Nucl. Med.* 50:2033–2041. doi:10.2967/jnumed.109.066993.
- Sato, E., S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.-T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, and K. Odunsi. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:18538–18543. doi:10.1073/pnas.0509182102.
- Savoldo, B., C.A. Ramos, E. Liu, M.P. Mims, M.J. Keating, G. Carrum, R.T. Kamble, C.M. Bollard, A.P. Gee, Z. Mei, H. Liu, B. Grilley, C.M. Rooney, H.E. Heslop, M.K. Brenner, and G. Dotti. 2011. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J. Clin. Invest.* 121:1822–1826. doi:10.1172/JCI46110.
- Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418:191–195. doi:10.1038/nature00858.
- Schreck, S., D. Friebel, M. Buettner, L. Distel, G. Grabenbauer, L.S. Young, and G. Niedobitek. 2009. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol.* 27:31–39. doi:10.1002/hon.878.
- Schreiber, H., T.H. Wu, J. Nachman, and W.M. Kast. 2002. Immunodominance and tumor escape. *Semin. Cancer Biol.* 12:25–31. doi:10.1006/scbi.2001.0401.
- Schwartz, R. S. (2004). *Paul Ehrlich's magic bullets. The New England journal of medicine* (Vol. 350, pp. 1079–1080). doi:10.1056/NEJMp048021
- Scott, A.M., J.P. Allison, and J.D. Wolchok. 2012. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun.* 12:14.

- Seidl, C., C. Zöckler, R. Beck, L. Quintanilla-Martinez, F. Bruchertseifer, and R. Senekowitsch-Schmidtke. 2011. 177Lu-immunotherapy of experimental peritoneal carcinomatosis shows comparable effectiveness to 213Bi-immunotherapy, but causes toxicity not observed with 213Bi. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 38:312–322. doi:10.1007/s00259-010-1639-2.
- Senovilla, L., E. Vacchelli, J. Galon, S. Adjemian, A. Eggermont, W.H. Fridman, C. Sautès-Fridman, Y. Ma, E. Tartour, L. Zitvogel, G. Kroemer, and L. Galluzzi. 2012. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology.* 1:1323–1343. doi:10.4161/onci.22009.
- Sgouros, G., A.M. Ballangrud, J.G. Jurcic, M.R. McDevitt, J.L. Humm, Y.E. Erdi, B.M. Mehta, R.D. Finn, S.M. Larson, and D.A. Scheinberg. 1999. Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: 213Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia. *J. Nucl. Med.* 40:1935–1946.
- Sgouros, G., J.C. Roeske, M.R. McDevitt, S. Palm, B.J. Allen, D.R. Fisher, A.B. Brill, H. Song, R.W. Howell, G. Akabani, SNM MIRD Committee, W.E. Bolch, A.B. Brill, D.R. Fisher, R.W. Howell, R.F. Meredith, G. Sgouros, B.W. Wessels, and P.B. Zanzonico. 2010. MIRD Pamphlet No. 22 (abridged): radiobiology and dosimetry of alpha-particle emitters for targeted radionuclide therapy. *J. Nucl. Med.* 51:311–328. doi:10.2967/jnumed.108.058651.
- Sharma, S., M. Stolina, Y. Lin, B. Gardner, P.W. Miller, M. Kronenberg, and S.M. Dubinett. 1999. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J. Immunol.* 163:5020–5028.
- Sharpe, A.H., and G.J. Freeman. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2:116–126. doi:10.1038/nri727.
- Shawler, D.L., R.M. Bartholomew, L.M. Smith, and R.O. Dillman. 1985. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J. Immunol.* 135:1530–1535.
- Shen, C.-J., Y.-X. Yang, E.Q. Han, N. Cao, Y.-F. Wang, Y. Wang, Y.-Y. Zhao, L.-M. Zhao, J. Cui, P. Gupta, A.J. Wong, and S.-Y. Han. 2013. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRvIII expressing glioma. *J Hematol Oncol.* 6:33. doi:10.1186/1756-8722-6-33.
- SHI, W., and D.W. SIEMANN. 2006. Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. *Anticancer Res.* 26:3445–3453.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 163:5211–5218.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 3:135–142. doi:10.1038/ni759.

- Shin, M.S., W.S. Park, S.Y. Kim, H.S. Kim, S.J. Kang, K.Y. Song, J.Y. Park, S.M. Dong, J.H. Pi, R.R. Oh, J.Y. Lee, N.J. Yoo, and S.H. Lee. 1999. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *The American Journal of Pathology*. 154:1785–1791. doi:10.1016/S0002-9440(10)65434-X.
- Shiraishi, K., Y. Ishiwata, K. Nakagawa, S. Yokochi, C. Taruki, T. Akuta, K. Ohtomo, K. Matsushima, T. Tamatani, and S. Kanegasaki. 2008. Enhancement of antitumor radiation efficacy and consistent induction of the abscopal effect in mice by ECI301, an active variant of macrophage inflammatory protein-1alpha. *Clin. Cancer Res.* 14:1159–1166. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4485.
- Siccardi, A.G., G.L. Buraggi, L. Callegaro, A.C. Colella, P.G. De Filippi, G. Galli, G. Mariani, R. Masi, R. Palumbo, and P. Riva. 1989. Immunoscintigraphy of adenocarcinomas by means of radiolabeled F(ab')₂ fragments of an anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody: a multicenter study. *Cancer Res.* 49:3095–3103.
- Silverstein, A.M. 2003. Cellular versus humoral immunology: a century-long dispute. *Nat. Immunol.* 4:425–428. doi:10.1038/ni0503-425.
- Singh, H., L.M. Serrano, T. Pfeiffer, S. Olivares, G. McNamara, D.D. Smith, Z. Al-Kadhimi, S.J. Forman, S.D. Gillies, M.C. Jensen, D. Colcher, A. Raubitschek, and L.J.N. Cooper. 2007. Combining adoptive cellular and immunocytokine therapies to improve treatment of B-lineage malignancy. *Cancer Res.* 67:2872–2880. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2283.
- Singhal, S., J. Mehta, R. Desikan, D. Ayers, P. Roberson, P. Eddlemon, N. Munshi, E. Anaissie, C. Wilson, M. Dhodapkar, J. Zeddis, and B. Barlogie. 1999. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 341:1565–1571. doi:10.1056/NEJM199911183412102.
- Slovin, S.F., C.S. Higano, O. Hamid, S. Tejawani, A. Harzstark, J.J. Alumkal, H.I. Scher, K. Chin, P. Gagnier, M.B. McHenry, and T.M. Beer. 2013. Ipilimumab alone or in combination with radiotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer: results from an open-label, multicenter phase I/II study. *Ann. Oncol.* 24:1813–1821. doi:10.1093/annonc/mdt107.
- Song, H., K. Shahverdi, D.L. Huso, C. Esaias, J. Fox, A. Liedy, Z. Zhang, R.T. Reilly, C. Apostolidis, A. Morgenstern, and G. Sgouros. 2008. ²¹³Bi (α-Emitter)-Antibody Targeting of Breast Cancer Metastases in the neu-N Transgenic Mouse Model. *Cancer Res.* 68:3873–3880. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6308.
- Song, H., R.F. Hobbs, R. Vajravelu, D.L. Huso, C. Esaias, C. Apostolidis, A. Morgenstern, and G. Sgouros. 2009. Radioimmunotherapy of breast cancer metastases with alpha-particle emitter ²²⁵Ac: comparing efficacy with ²¹³Bi and ⁹⁰Y. *Cancer Res.* 69:8941–8948. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1828.
- Stamell, E.F., J.D. Wolchok, S. Gnjjatic, N.Y. Lee, and I. Brownell. 2013. The Abscopal Effect Associated With a Systemic Anti-melanoma Immune Response. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics.* 85:293–295. doi:10.1016/j.ijrobp.2012.03.017.

- Stas, P., and I. Lasters. 2009. [Immunogenicity of therapeutic antibodies]. *Med Sci (Paris)*. 25:1070–1077. doi:10.1051/medsci/200925121070.
- Stigbrand, T., A. Ullén, P. Sandström, H. Mirzaie-Joniani, B. Sundström, B. Nilsson, L. Årlestig, R.R. Norrlund, K.R. Åhlström, and S.-O. Hietala. 1996. Twenty Years with Monoclonal Antibodies: State of the art-Where do we go? *Acta Oncol.* 35:259–265.
- Strobeck, M. 2007. Multiple myeloma therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 6:181–182. doi:10.1038/nrd2269.
- Stroncek, D.F., C.J. Melief, L. Castiello, A. Cesano, M.A. Cheever, S. Civini, B. Comin-Anduix, T.F. Gajewski, P.D. Greenberg, and P. Kalinski. 2013. Highlights of the society for immunotherapy of cancer (SITC) 27th annual meeting. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 1:4.
- Sukkurwala, A.Q., I. Martins, Y. Wang, F. Schlemmer, C. Ruckstuhl, M. Durchschlag, M. Michaud, L. Senovilla, A. Sistigu, Y. Ma, E. Vacchelli, E. Sulpice, X. Gidrol, L. Zitvogel, F. Madoe, L. Galluzzi, O. Kepp, and G. Kroemer. 2014. Immunogenic calreticulin exposure occurs through a phylogenetically conserved stress pathway involving the chemokine CXCL8. *Cell Death Differ.* 21:59–68. doi:10.1038/cdd.2013.73.
- Sun, J.C., and L.L. Lanier. 2011. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8⁺ T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11:645–657. doi:10.1038/nri3044.
- Supiot, S., F. Thillays, E. Rio, M.A. Mahé, F.J. Barbet, F. Kraeber-Bodéré, and M. Chérel. 2007. [Alpha-radioimmunotherapy: a review of recent developments]. *Cancer Radiother.* 11:252–259. doi:10.1016/j.canrad.2007.05.001.
- Supiot, S., S. Gouard, J. Charrier, C. Apostolidis, J.-F. Chatal, J. Barbet, F. Davodeau, and M. Chérel. 2005. Mechanisms of cell sensitization to alpha radioimmunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. *Clin. Cancer Res.* 11:7047s–7052s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-1004-0021.
- Swiecki, M., and M. Colonna. 2010. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol. Rev.* 234:142–162. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00881.x.

T

- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192:303–310.
- Takahashi, T.T., Y.Y. Kuniyasu, M.M. Toda, N.N. Sakaguchi, M.M. Itoh, M.M. Iwata, J.J. Shimizu, and S.S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 10:1969–1980. doi:10.1093/intimm/10.12.1969.

- TAKAYA, M., Y. NIIBE, S. TSUNODA, T. JOBO, M. IMAI, S. KOTANI, N. UNNO, and K. HAYAKAWA. 2007. Abscopal effect of radiation on toruliform para-aortic lymph node metastases of advanced uterine cervical carcinoma--a case report. *Anticancer Res.* 27:499–503.
- Tamma, S., X. Huang, M. Wong, M.C. Milone, L. Ma, B.L. Levine, C.H. June, J.E. Wagner, B.R. Blazar, and X. Zhou. 2010. 4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies. *Hum. Gene Ther.* 21:75–86. doi:10.1089/hum.2009.122.
- Tang, D., M.T. Loze, H.J. Zeh, and R. Kang. 2010. The redox protein HMGB1 regulates cell death and survival in cancer treatment. *Autophagy.* 6:1181–1183. doi:10.4161/auto.6.8.13367.
- Tarhini, A.A., H. Gogas, and J.M. Kirkwood. 2012. IFN- α in the treatment of melanoma. *J. Immunol.* 189:3789–3793. doi:10.4049/jimmunol.1290060.
- Teitz-Tennenbaum, S., Q. Li, S. Rynkiewicz, F. Ito, M.A. Davis, C.J. McGinn, and A.E. Chang. 2003. Radiotherapy potentiates the therapeutic efficacy of intratumoral dendritic cell administration. *Cancer Res.* 63:8466–8475.
- Teshima, T., J.B. Owen, G.E. Hanks, S. Sato, H. Tsunemoto, and T. Inoue. 1996. A comparison of the structure of radiation oncology in the United States and Japan. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34:235–242. doi:10.1016/0360-3016(95)02046-2.
- Thédrez, P., J.C. Saccavini, D. Nolibé, J.P. Simoen, D. Guerreau, J.F. Gestin, M. Kremer, and J.F. Chatal. 1989. Biodistribution of indium-111-labeled OC 125 monoclonal antibody after intraperitoneal injection in nude mice intraperitoneally grafted with ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 49:3081–3086.
- Thompson, C.B., and J.P. Allison. 1997. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity.* 7:445–450.
- Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1999. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* 164:183–190. doi:10.4049/jimmunol.164.1.183.
- Toes, R.E., R.J. Blom, R. Offringa, W.M. Kast, and C.J. Melief. 1996. Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J. Immunol.* 156:3911–3918.
- Tomblyn, M. 2012. Radioimmunotherapy for B-cell non-hodgkin lymphomas. *Cancer Control.* 19:196–203.
- Tomblyn, M.B., M.J. Katin, and P.E. Wallner. 2013. The new golden era for radioimmunotherapy: not just for lymphomas anymore. *Cancer Control.* 20:60–71.

- Topalian, S.L., F.S. Hodi, J.R. Brahmer, S.N. Gettinger, D.C. Smith, D.F. McDermott, J.D. Powderly, R.D. Carvajal, J.A. Sosman, M.B. Atkins, P.D. Leming, D.R. Spigel, S.J. Antonia, L. Horn, C.G. Drake, D.M. Pardoll, L. Chen, W.H. Sharfman, R.A. Anders, J.M. Taube, T.L. McMiller, H. Xu, A.J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G.D. Kollia, A. Gupta, J.M. Wigginton, and M. Sznol. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 366:2443–2454. doi:10.1056/NEJMoa1200690.
- Tougeron, D., E. Fauquembergue, and J.-B. Latouche. 2013. [Immune response and colorectal cancer]. *Bull Cancer.* 100:283–294. doi:10.1684/bdc.2013.1716.
- Tripodo, C., S. Sangaletti, P.P. Piccaluga, S. Prakash, G. Franco, I. Borrello, A. Orazi, M.P. Colombo, and S.A. Pileri. 2011. The bone marrow stroma in hematological neoplasms--a guilty bystander. *Nat Rev Clin Oncol.* 8:456–466. doi:10.1038/nrclinonc.2011.31.
- Tsai, C.-S., F.-H. Chen, C.-C. Wang, H.-L. Huang, S.-M. Jung, C.-J. Wu, C.-C. Lee, W.H. McBride, C.-S. Chiang, and J.-H. Hong. 2006. Macrophages From Irradiated Tumors Express Higher Levels of iNOS, Arginase-I and COX-2, and Promote Tumor Growth. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 68:499–507. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.01.041.

U

- Urban, J.L., J.M. Holland, M.L. Kripke, and H. Schreiber. 1982. Immunoselection of tumor cell variants by mice suppressed with ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* 156:1025–1041.
- Uyttenhove, C., J. Van Snick, and T. Boon. 1980. Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. I. Rejection by syngeneic mice. *J. Exp. Med.* 152:1175–1183.

V

- Vacchelli, E., I. Vitale, E. Tartour, A. Eggermont, C. Sautès-Fridman, J. Galon, L. Zitvogel, G. Kroemer, and L. Galluzzi. 2013. Trial Watch: Anticancer radioimmunotherapy. *Oncoimmunology.* 2:e25595. doi:10.4161/onci.25595.
- Vaidyanathan, G., H.S. Friedman, S.T. Keir, and M.R. Zalutsky. 1996. Evaluation of meta-[211 At] astatobenzylguanidine in an athymic mouse human neuroblastoma xenograft model. *Nucl. Med. Biol.* 23:851–856. doi:10.1016/0969-8051(96)00115-1.
- van der BRUGGEN, P., C. TRAVERSARI, P. CHOMEZ, C. LURQUIN, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 254:1643–1647.
- Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean, and B. Rocha. 2000. Response of naïve and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat. Immunol.* 1:47–53. doi:10.1038/76907.
- Vera, J., B. Savoldo, S. Vigouroux, E. Biagi, M. Pule, C. Rossig, J. Wu, H.E. Heslop, C.M. Rooney, M.K. Brenner, and G. Dotti. 2006. T lymphocytes redirected against the kappa light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells. *Blood.* 108:3890–3897. doi:10.1182/blood-2006-04-017061.

- Verbrugge, I., J. Hagekyriakou, L.L. Sharp, M. Galli, A. West, N.M. McLaughlin, H. Duret, H. Yagita, R.W. Johnstone, M.J. Smyth, and N.M. Haynes. 2012. Radiotherapy increases the permissiveness of established mammary tumors to rejection by immunomodulatory antibodies. *Cancer Res.* 72:3163–3174. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0210.
- Verecque, R., G. Buffenoir, R. Gonzalez, N. Cambier, D. Hetuin, F. Bauters, P. Fenaux, and B. Quesnel. 2000. gamma-ray irradiation induces B7.1 expression in myeloid leukaemic cells. *Br. J. Haematol.* 108:825–831.
- Vermi, W., R. Bonecchi, F. Facchetti, D. Bianchi, S. Sozzani, S. Festa, A. Berenzi, M. Cella, and M. Colonna. 2003. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J. Pathol.* 200:255–268. doi:10.1002/path.1344.
- Versteeg, R., K.M. Krüse-Wolters, A.C. Plomp, A. van Leeuwen, N.J. Stam, H.L. Ploegh, D.J. Ruiter, and P.I. Schrier. 1989. Suppression of class I human histocompatibility leukocyte antigen by c-myc is locus specific. *J. Exp. Med.* 170:621–635.
- Vignard, V., B. Lemercier, A. Lim, M.-C. Pandolfino, Y. Guilloux, A. Khammari, C. Rabu, K. Echasserieu, F. Lang, M.-L. Gougeon, B. Dreno, F. Jotereau, and N. Labarriere. 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.
- Viola, A., and A. Lanzavecchia. 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science.* 273:104–106.
- Vivier, E., D.H. Raulet, A. Moretta, M.A. Caligiuri, L. Zitvogel, L.L. Lanier, W.M. Yokoyama, and S. Ugolini. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 331:44–49. doi:10.1126/science.1198687.
- Vondráček, J.J., M.A.M. Sheard, P.P. Krejčí, K.K. Minksová, J.J. Hofmanová, and A.A. Kozubík. 2001. Modulation of death receptor-mediated apoptosis in differentiating human myeloid leukemia HL-60 cells. *J Leukoc Biol.* 69:794–802.

W

- Walter, R.B., O.W. Press, and J.M. Pagel. 2010. Pretargeted radioimmunotherapy for hematologic and other malignancies. *Cancer Biother. Radiopharm.* 25:125–142. doi:10.1089/cbr.2010.0759.
- Wang, S., J. Yang, J. Qian, M. Wezeman, L.W. Kwak, and Q. Yi. 2006a. Tumor evasion of the immune system: inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma. *Blood.* 107:2432–2439. doi:10.1182/blood-2005-06-2486.
- Wang, S., S. Hong, J. Yang, J. Qian, X. Zhang, E. Shpall, L.W. Kwak, and Q. Yi. 2006b. Optimizing immunotherapy in multiple myeloma: Restoring the function of patients' monocyte-derived dendritic cells by inhibiting p38 or activating MEK/ERK MAPK and neutralizing interleukin-6 in progenitor cells. *Blood.* 108:4071–4077. doi:10.1182/blood-2006-04-016980.

Wang, W., H.D. Edington, U.N.M. Rao, D.M. Jukic, S.R. Land, S. Ferrone, and J.M. Kirkwood. 2007. Modulation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 signaling in melanoma by high-dose IFN α 2b. *Clin. Cancer Res.* 13:1523–1531. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1387.

Watts, T.H., and M.A. DeBenedette. 1999. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr. Opin. Immunol.* 11:286–293.

Welters, M.J., G.G. Kenter, P.J. de V. van Steenwijk, M.J. Löwik, D.M. Berends-van der Meer, F. Essahsah, L.F. Stynenbosch, A.P. Vloon, T.H. Ramwadhoebe, and S.J. Piersma. 2010. Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:11895–11899.

Wherry, E.J. 2011. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12:492–499. doi:doi:10.1038/ni.2035.

Wrzesinski, C., C.M. Paulos, A. Kaiser, P. Muranski, D.C. Palmer, L. Gattinoni, Z. Yu, S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo. 2010. Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *J. Immunother.* 33:1–7. doi:10.1097/CJI.0b013e3181b88ffc.

X

Xu, X.-J., H.-Z. Zhao, and Y.-M. Tang. 2013. Efficacy and safety of adoptive immunotherapy using anti-CD19 chimeric antigen receptor transduced T-cells: a systematic review of phase I clinical trials. *Leuk. Lymphoma.* 54:255–260. doi:10.3109/10428194.2012.715350.

Xue, L.Y., N.J. Butler, G.M. Makrigiorgos, S.J. Adelstein, and A.I. Kassis. 2002. Bystander effect produced by radiolabeled tumor cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:13765–13770. doi:10.1073/pnas.182209699.

Y

Yamazaki, T., D. Hannani, V. Poirier-Colame, S. Ladoire, C. Locher, A. Sistigu, N. Prada, S. Adjemian, J.P.P. Catani, M. Freudenberg, C. Galanos, F. André, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2014. Defective immunogenic cell death of HMGB1-deficient tumors: compensatory therapy with TLR4 agonists. *Cell Death Differ.* 21:69–78. doi:10.1038/cdd.2013.72.

Yang, J.C., L. Haworth, R.M. Sherry, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, S.M. Steinberg, H.X. Chen, and S.A. Rosenberg. 2003. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N. Engl. J. Med.* 349:427–434. doi:10.1056/NEJMoa021491.

Yao, Z., M. Zhang, K. Garmestani, D.B. Axworthy, R.W. Mallett, A.R. Fritzberg, L.J. Theodore, P.S. Plascjak, W.C. Eckelman, and T.A. Waldmann. 2004. Pretargeted α emitting radioimmunotherapy using ^{213}Bi 1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid-biotin. *Clin. Cancer Res.* 10:3137–3146. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0171.

- Yee, C., J.A. Thompson, D. Byrd, S.R. Riddell, P. Roche, E. Celis, and P.D. Greenberg. 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. doi:10.1073/pnas.242600099.
- Yee, C., S.R. Riddell, and P.D. Greenberg. 1997. Prospects for adoptive T cell therapy. *Curr. Opin. Immunol.* 9:702–708. doi:10.1016/S0952-7915(97)80052-0.
- Yong, K.J., D.E. Milenic, K.E. Baidoo, and M.W. Brechbiel. 2013. Sensitization of tumor to ²¹²Pb radioimmunotherapy by gemcitabine involves initial abrogation of G2 arrest and blocked DNA damage repair by interference with Rad51. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 85:1119–1126. doi:10.1016/j.ijrobp.2012.09.015.

Z

- Zaks, T.Z., D.B. Chappell, S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo. 1999. Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J. Immunol.* 162:3273–3279.
- Zalutsky, M.R., and D.D. Bigner. 1996. Radioimmunotherapy with α -Particle Emitting Radioimmunoconjugates. *Acta Oncol.* 35:373–379. doi:10.3109/02841869609101654.
- Zalutsky, M.R., and O.R. Pozzi. 2004. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radionuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 48:289–296.
- Zalutsky, M.R., D.A. Reardon, G. Akabani, R.E. Coleman, A.H. Friedman, H.S. Friedman, R.E. McLendon, T.Z. Wong, and D.D. Bigner. 2008. Clinical experience with alpha-particle emitting ²¹¹At: treatment of recurrent brain tumor patients with ²¹¹At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J. Nucl. Med.* 49:30–38. doi:10.2967/jnumed.107.046938.
- Zhang, B., N.A. Bowerman, J.K. Salama, H. Schmidt, M.T. Spiotto, A. Schietinger, P. Yu, Y.-X. Fu, R.R. Weichselbaum, D.A. Rowley, D.M. Kranz, and H. Schreiber. 2007. Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. *J. Exp. Med.* 204:49–55. doi:10.1084/jem.20062056.
- Zhang, H., L. Liu, D. Yu, E.R. Kandimalla, H.B. Sun, S. Agrawal, and C. Guha. 2012. An in situ autologous tumor vaccination with combined radiation therapy and TLR9 agonist therapy. *PLoS ONE.* 7:e38111. doi:10.1371/journal.pone.0038111.
- Zhang, J.-P., J. Yan, J. Xu, X.-H. Pang, M.-S. Chen, L. Li, C. Wu, S.-P. Li, and L. Zheng. 2009. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J. Hepatol.* 50:980–989. doi:10.1016/j.jhep.2008.12.033.
- Zhang, M., Z. Yao, K. Garmestani, D.B. Axworthy, Z. Zhang, R.W. Mallett, L.J. Theodore, C.K. Goldman, M.W. Brechbiel, J.A. Carrasquillo, and T.A. Waldmann. 2002. Pretargeting radioimmunotherapy of a murine model of adult T-cell leukemia with the alpha-emitting radionuclide, bismuth 213. *Blood.* 100:208–216. doi:10.1182/blood-2002-01-0107.

Zitvogel, L., O. Kepp, and G. Kroemer. 2010. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*. 140:798–804. doi:10.1016/j.cell.2010.02.015.

Sites internet

- <http://globocan.iarc.fr/>
- <http://cancerimmunity.org/peptide/>
- <http://www.md.ucl.ac.be/histoire/livre/mnuc.pdf>
- <http://clinicaltrials.gov/>

RESUME ET MOTS CLES

Evaluation du potentiel thérapeutique de la radioimmunothérapie alpha en association avec le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de tumeur

La radioimmunothérapie alpha (RIT α) est une thérapie anti-cancéreuse vectorisée utilisant généralement comme vecteur, un anticorps monoclonal reconnaissant un antigène exprimé à la surface des cellules tumorales. Cette technique permet le ciblage d'un radionucléide émetteur de particules α sur les sites tumoraux dans le but de détruire spécifiquement les cellules cancéreuses. Les émetteurs α , comme le bismuth-213, représentent un outil idéal pour la destruction de cellules tumorales isolées ou en faible nombre. Nous avons montré, dans un modèle d'adénocarcinome murin, que l'irradiation α est capable d'initier une réponse immunitaire anti-tumorale efficace dépendante des lymphocytes T. Ces résultats montrent que le système immunitaire peut être stimulé suite à l'irradiation par les particules α suggérant la possibilité de combiner la RIT α avec une stratégie d'immunothérapie passive, le transfert de lymphocytes T spécifiques de tumeur (ACT). Nous démontrons l'efficacité de cette combinaison thérapeutique dans un modèle de myélome multiple murin syngénique et immunocompétent. La réussite dans le traitement de cette maladie disséminée montre une potentialisation de l'efficacité des lymphocytes T injectés après la RIT α ainsi qu'une stimulation du système immunitaire. Ces résultats suggèrent que ces deux stratégies agissent en synergie autant sur la destruction tumorale que sur la mise en place d'un environnement immunitaire favorable à l'élimination d'une pathologie difficilement traitable telle que le myélome multiple. Cette étude préclinique souligne la faisabilité et la pertinence d'associer ces deux stratégies ouvrant ainsi la possibilité de son transfert en clinique.

Mots clés : radioimmunothérapie alpha, bismuth-213, immunothérapie, myélome multiple, lymphocytes T

Evaluation of the therapeutic potential of the alpha radioimmunotherapy in combination with the adoptive transfer of tumor-specific T cells

Alpha radioimmunotherapy (α -RIT) is a targeted anti-cancer therapy which uses a vector (in general a monoclonal antibody) recognizing an antigen expressed on the surface of tumor cells. This technique allows to vectorize α particle emitters on tumor sites in order to specifically destroy cancer cells. α -emitters, such as bismuth-213, represent an ideal tool for the destruction of isolated or small clusters of tumor cells. We have shown in a murine adenocarcinoma model that α irradiation can initiate an effective immune dependent anti-tumor T cell response. These results demonstrated that the immune system can be stimulated after α irradiation, suggesting the possibility of combining α -RIT with immunotherapy strategies such as the transfer of tumor-specific T-lymphocytes. Here, we demonstrate the efficacy of the combination therapy in a murine model of multiple myeloma in syngeneic immunocompetent mice. The success in the treatment of this disseminated disease demonstrates the potentiation of the injected T-lymphocytes effectiveness after α -RIT and indicates that the immune system is stimulated. These results suggest that the two treatments work synergistically for tumor destruction and for the establishment of an immune environment, which leads to the elimination of multiple myeloma in our model. This preclinical study highlights the feasibility and relevance of combining these two strategies and thus opens the possibility for its clinical application.

Keywords : alpha-radioimmunotherapy, bismuth-213, immunotherapy, multiple myeloma, T-lymphocyte