UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE ET TECHNIQUES MÉDICALES

_____

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2013 N° 09

Étude des propriétés cytotoxiques et immuno-adjuvantes du virus oncolytique de la rougeole

_____

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Jean-Baptiste GUILLERME

Le 29 Octobre 2013 devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : Dr Anne HOSMALIN

Dr Jenny VALLADEAU-GUILEMOND

Examinateur : Dr Jean-François FONTENEAU

Directeur de thèse : Dr Marc GREGOIRE

Je dédie ce manuscrit à,

Stéphanie, la femme de ma vie !
Pour le soutien, la compréhension et l'amour que tu m'as apporté pendant toutes ces années.

Jérémie et David, mes grands frères.
Pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble.
Votre réussite est, pour moi, un exemple à suivre.
J'espère que vous serez fiers de moi.

Mes parents.
Sans vous je ne serais pas arrivé jusqu'ici.
Merci pour votre patience et votre obstination à me pousser à réussir.

Table des matières

I. La virothérapie anti-tumorale 1

A. Le virus de la rougeole 3

i. Structure 3

ii. Cycle de réplication 4

iii. Pathologie 5

iv. Vaccination 8

v. Utilisation du virus de la rougeole comme agent oncolytique 10

vi. Modification du virus de la rougeole 14

vii. Développement clinique 21

B. Autres virus oncolytiques 23

i. L'Adénovirus H101 23

ii. Virus Herpes Simplex : HSV-1 24

iii. Virus de la Vaccine : JX-594 26

II. La réponse immunitaire anti-tumorale 30

A. Les huit caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales 30

B. L'immunosurveillance des cancers 31

C. "Immunoediting des cancers" 33

D. Rôles des lymphocytes T CD8+ Cytotoxiques 34

E. Les antigènes de tumeur 35

III. Les cellules dendritiques (DC) 37

A. Découvertes et généralités 37

B. "Pathogen Associated Molecular Patterns" (PAMP) 38

C. "Pathogen Recognition Receptors" (PRR) 39

i. Les PRR de signalisation 39

ii. Les PRR d'endocytose 40

D. La théorie du danger 41

E. Mort cellulaire immunogène et "Damage Associated Molecular Patterns" 42

F. Les Toll-Like Receptor (TLR) humains 45

i. Les TLR de surface 46

ii. Les TLR intracellulaires 47

iii. Deux voies principales de signalisation régulées par les TLR 48
G. Les populations de DC humaines 49
H. Fonctions des DC 54
i. Recrutement des DC dans la réponse immunitaire 54
ii. Acquisition des antigènes 54
I. La présentation des antigènes par les cellules dendritiques 58
i. Les molécules de présentation : "Human Leukocytes Antigen" 58
ii. Voies de présentations classiques 58
iii. Présentation croisée des antigènes : "Cross-Presentation" 60
J. La synapse immunologique: Rôle des DC dans l'activation des Lymphocytes T 67
i. Structure de la synapse immunologique 68
ii. Activation des lymphocytes T naïfs 69
iii. Rôle des DC dans la polarisation de la réponse immunitaire 69
iv. Le "Cross-Priming": Activation des lymphocytes T CD8+ naïfs 70
IV. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans le cancer 72
A. Découverte des pDC 72
B. Les pDC sont recrutées dans les tumeurs 73
C. Subversion des fonctions des pDC par le microenvironnement tumoral 74
i. Suppression des fonctions immunostimulatrices des TApDC 75
ii. Acquisition de fonctions suppressives par les TApDC 76
D. Intérêt de stimuler les pDC pour la réponse immunitaire anti-tumorale 76
i. Récupération des fonctions immunostimulatrices des TApDC par une stimulation TLR7 76
ii. Engagement des TLR7/9 et synthèse d'IFN-α : dichotomie NF-κB/IRF7 77
iii. Fonctions de l'IFN de type I dans le rejet des tumeurs 78
iv. Les pDC sont équipées pour acquérir des antigènes, réaliser la présentation croisée des antigènes 79
v. Les pDC activées présentent des propriétés cytotoxiques 80
vi. Utilisation clinique des pDC 82
V. Objectifs de la thèse 85
VI. Article n°1 : "Natural Oncolytic Activity of Live-Attenuated Measles Virus against Human Lung and Colorectal Adenocarcinomas" 87
A. Résultats principaux 87
B. Article 89
VII. Article n°2 : "Measles Virus Vaccine–Infected Tumor Cells Induce Tumor Antigen Cross-Presentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells" 100

A. Résultats principaux 100
B. Article 101
VIII. Discussion 130
IX. Perspectives : 141
X. Références 147
XI. Annexe 1: "Antitumor Virotherapy by Attenuated Measles Virus (MV)" 173
XII. Annexe 2: "Attenuated measles virus used as an oncolytic virus activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells 191
XIII. Annexe 3: Brevet MV-ΔC 195

INTRODUCTION

I. La virothérapie anti-tumorale

Le développement de stratégie thérapeutique utilisant les propriétés anti-tumorales de certains virus s'est intensifié depuis une dizaine d'années. Dès les années 50, Moore rapportait déjà les propriétés oncolytiques de certains virus (Moore, 1952). Dans les années 70, des rémissions spontanées de cancers hématologiques, incluant des lymphomes de Hodgkin et de Burkitt, ont été rapportées suite à des infections par la souche sauvage du virus de la rougeole (wtMV) (Bluming and Ziegler, 1971; Ziegler, 1976). En effet, le wtMV possède un tropisme naturel pour les cellules immunitaires saines et celles néoplasiques responsables de ces cancers. A partir du rapport de ces observations s'est développée la possibilité d'utiliser des souches virales existantes ou de développer des virus pour infecter de manière spécifique les cellules tumorales. Aujourd'hui, plusieurs virus sont évalués comme agents anti-tumoraux notamment les Adénovirus, le virus de la stomatite vésiculaire (Vesicular stomatitis virus - VSV), le virus Herpes Simplex (HSV), le virus de la vaccine (Vaccinia virus) et le virus de la rougeole (Mealses Virus - MV) (Boisgerault et al., 2013; Msaouel et al., 2013; Russell et al., 2012).

L'utilisation de virus comme agent cytotoxique pour infecter et tuer les cellules tumorales repose sur l'observation que certains virus ont la capacité d'infecter de manière très préférentielle les cellules tumorales et d'épargner les cellules saines (Russell et al., 2012). Ces virus sont nommés virus oncolytiques, et leur tropisme particulier est la résultante de deux facteurs principaux. Le premier est la surexpression ou l'expression restreinte au tissu tumoral du récepteur d'entrée du virus. Le second facteur est la biologie de la tumeur. En effet, les cellules tumorales développent des résistances à l'apoptose, aux mécanismes qui régulent la transcription des gènes et la production des protéines, qui sont des mécanismes importants dans le contrôle des infections virales. Il a notamment été mis en évidence que les voies de signalisation de l'interféron (IFN) de type I sont fréquemment abolies dans les cellules tumorales (Chiocca, 2002). Or la voie de l'IFN de type I est un mécanisme clé de l'immunité innée dans le contrôle de la réplication virale. L'ensemble de ces dérèglements est favorable à la progression tumorale, mais favorise également la réplication virale. Ainsi, la tumeur pourrait constituer un lieu préférentiel de réplication virale (Msaouel et al., 2013). Dès lors, l'utilisation de virus ayant des propriétés anti-tumorales peut être envisagée comme une alternative pour le traitement de tumeurs réfractaires aux traitements conventionnels.

En plus de leur activité cytotoxique directe sur les cellules tumorales, les virus oncolytiques participeraient au rejet de la tumeur en permettant de surpasser l'immunosuppression

organisée par le microenvironnement tumoral. Par sa nature propre, le virus oncolytique constitue un signal de danger capable de recruter des cellules de l'immunité et notamment les cellules dendritiques (DC) considérées comme les meilleures cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les DC sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, et sont les seules CPA capables d'activer, *de novo*, une réponse immunitaire contre un antigène spécifique, notamment contre les antigènes de tumeurs, lorsqu'elles sont correctement activées (Banchereau and Steinman, 1998).

Les virus oncolytiques partagent entre eux certaines propriétés qui conditionnent leur efficacité et leur sécurité d'utilisation. Pour être qualifié d'oncolytique, un virus doit infecter très préférentiellement ou exclusivement les cellules tumorales. L'infection doit induire la mort cellulaire, et cette mort cellulaire doit être compatible avec l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Fielding, 2005). Enfin, les virus oncolytiques doivent avoir démontré leur innocuité pour les tissus sains et pouvoir être injectés à un titre élevé. Ainsi, plusieurs virus sont étudiés pour leur propriétés oncolytiques et sont maintenant à l'essai en clinique.

Parmi les virus oncolytiques, les souches vaccinales du MV montrent un fort potentiel en tant qu'agents anti-tumoraux. Il a été démontré que les souches atténuées de ce virus possèdent des propriétés oncolytiques contre de nombreux types de tumeurs, *in vitro* et *in vivo*, dans des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines sur des souris immunodéficientes (Msaouel et al., 2013; Russell et al., 2012). De manière complémentaire, la capacité du MV à activer une réponse immunitaire forte pourrait jouer un rôle déterminant dans l'efficacité de la virothérapie anti-tumorale basée sur le MV (Gauvrit et al., 2008; Guillerme et al., 2013b). Ainsi, la virothérapie anti-tumorale basée sur le MV est actuellement évaluée dans plusieurs essais cliniques (Russell et al., 2012).

Mon travail de thèse a consisté à étudier les propriétés lytiques et immuno-adjuvantes de la souche Schwarz du virus de la rougeole. Les travaux précédents de l'équipe ont démontré les propriétés oncolytiques de la souche Schwarz du virus de la rougeole contre des lignées de cellules tumorales dérivées de Mésothéliome Pleural Malin, une tumeur de la plèvre qui se développe suite à une exposition aux fibres d'amiante. Dans cette étude nous avons évalué les propriétés oncolytiques du MV sur des lignées de mélanome, d'adénocarcinome pulmonaire et colorectal.

A. Le virus de la rougeole

i. *Structure*

Le virus de la rougeole appartient au genre *Morbillivirus* et à la famille des *Paramyxoviridae* (Moss and Griffin, 2006). Les particules virales du MV sont pléomorphes avec une taille variant de 120 à 250 nm (Schneider-Schaulies and Meulen, 1999). Ces particules sont composées d'un complexe ribonucléoprotéique (RNP), constitué de l'ARN génomique viral monocaténaire qui code pour 8 protéines, associé à des protéines et entouré par une enveloppe lipidique **(Figure 1)**. Cette enveloppe virale est formée de phospholipides issus de la membrane de la cellule infectée à partir de laquelle le virion a bourgeonné. Elle est également associée aux protéines de la Matrice (M), aux protéines de surface de Fusion (F) et à l'Hémagglutinine (H) qui reconnaît les molécules CD46, CD150 et Nectin-4 (Moss and Griffin, 2006; Noyce et al., 2011). Le génome viral est constitué d'un brin d'Acide RiboNucléique (ARN) monocaténaire à polarité négative de 16000 nucléotides, encapsidé par la Nucléocapside (N), et associé au complexe polymérase viral constitué des phosphoprotéines (P) et de la protéine Large (L).

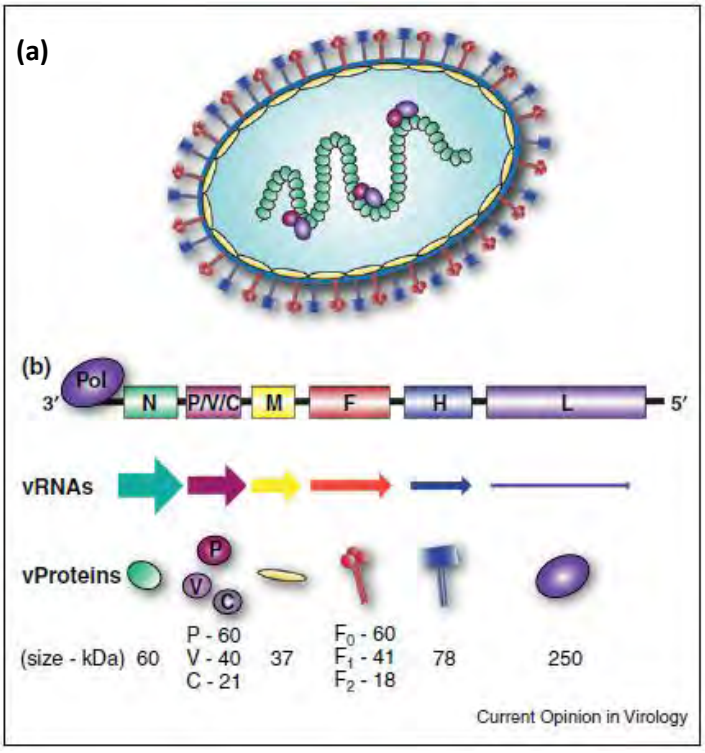


Figure 1: Représentations schématiques de la structure et des protéines virales du virus de la rougeole. a) Structure et organisation du virion. **b)** Organisation du génome viral. D'après (Delpeut et al., 2012)

La protéine L est une ARN polymérase RNP-spécifique (Ribo-Nucléo-protéique) multifonctionnelle, qui assure la synthèse des intermédiaires réplicatifs, des nouveaux ARN génomiques et des ARN messagers (ARNm) qui sont coiffés et polyadénylés également par cette enzyme. La phosphoprotéine (P) agit comme un cofacteur qui contrôle l'activité de la protéine L pendant la transcription et la réplication (Schneider-Schaulies and Meulen, 1999). L'ARN viral code également pour deux protéines non-structurales (V et C), impliquées dans la neutralisation de la voie Interféron de type I (IFN-I) de la cellule infectée et qui résultent d'un transcrit alternatif de l'ARN codant pour la Phosphoprotéine (P). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) répertorie 24 souches distinctes de virus de la rougeole réparties en 8 clades (Rec, 2001).

ii. *Cycle de réplication*

La réplication du virus de la rougeole est confinée au cytoplasme et débute par l'adsorption du MV sur les molécules de surface (CD150, CD46 ou Nectin-4) de la cellule hôte par l'intermédiaire de l'Hémagglutinine. L'interaction de ces deux protéines induit une modification de la conformation de la protéine F qui régule ensuite la fusion entre la particule virale et la cellule infectée. Le résultat de cette étape essentielle est l'entrée du génome viral et des protéines qui lui sont associées dans le cytoplasme de la cellule infectée (Biesecker et al., 2010). Ce complexe RNP sert de patron pour la réplication du génome du MV et la transcription des ARNm. La réplication du génome nécessite la synthèse d'un anti-génome complet à polarité positive qui sert ensuite à la synthèse de l'ARN génomique viral. Une fois le génome répliqué et les protéines virales synthétisées et assemblées, les virions bourgeonnent à la membrane plasmique pour conclure le cycle.

La réplication du virus de la rougeole est accompagnée de la formation de cellules géantes multinucléées (syncytia) non viables **(Figure 2)**. La formation de ces syncitia résulte de l'interaction des protéines virales H et F exprimées à la membrane de la cellule infectée avec les molécules CD46, CD150 ou Nectin-4 exprimées par les cellules voisines non-infectées. Ce phénomène participe à la propagation du virus et contribue largement aux propriétés oncolytiques du virus de la rougeole en permettant l'élimination des cellules voisines non-infectées (Bankamp et al., 2011). Ces syncytia peuvent recruter et détruire plusieurs dizaines de cellules pour une seule cellule infectée initialement. Il a d'ailleurs été démontré dans

des modèles animaux utilisant les virus HSV et VSV, qui ne présentent pas de propriétés fusogéniques naturelles mais modifiés pour exprimer la protéine (F), que la formation de syncytia augmente l'activité oncolytique de ces virus *in vivo* (Ebert et al., 2004; Fu et al., 2003).

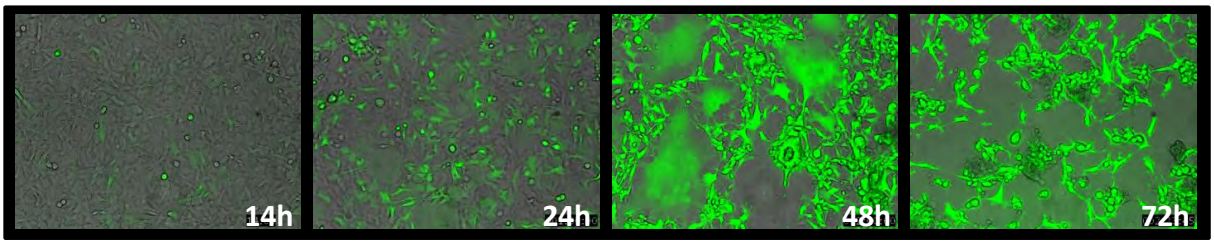


Figure 2 : Formation de syncitia après infection d'une lignée tumorale de mésothéliome pleural malin (Meso13) par la souche Schwarz du virus de la rougeole recombinant pour la enhanced Green Fluorescent Protein (MV-eGFP). MOI=1.

iii. *Pathologie*

La rougeole est une maladie hautement contagieuse et l'une des causes principales de décès chez les enfants dans le monde (Moss and Griffin, 2006). Une personne contaminée peut en infecter entre 15 et 20 autres (R0=15-20), ce qui signifie que stopper une infection endémique dans une population donnée requiert que plus de 95% de la population soit immunisée (Griffin et al., 2008). Les personnes qui recouvrent la santé après une infection par le virus de la rougeole sont immunisées à vie. La majorité des décès causés par la rougeole est due à l'immunosuppression induite par l'infection qui entraine le développement d'infections opportunistes.

La transmission du virus de la rougeole se fait par des gouttelettes de toux provenant du tractus respiratoire d'un individu contaminé, qui transportent le virus jusqu'à un individu susceptible de développer la maladie. Longtemps, les cellules épithéliales du tractus respiratoire ont été considérées comme les premières cellules infectées par le virus de la rougeole (Moss and Griffin, 2006). Cependant, elles n'expriment aucun récepteur connu pour la souche sauvage de la rougeole (CD150 ou Nectin-4) à leur pôle apical. De plus, des modèles expérimentaux développés chez le macaque ont mis en évidence qu'une souche modifiée du virus de la rougeole incapable d'infecter par Nectin-4 conduit à une infection systémique, alors que la souche modifiée qui n'infecte plus par CD150/SLAM est sévèrement atténuée (de Vries et al., 2012). Ces résultats suggèrent que l'infection primaire, qui se déroule dans le tractus respiratoire, est dépendante de CD150 et excluent les cellules épithéliales comme cibles du virus sauvage de la rougeole pour l'infection initiale (de Vries et al., 2012). Ce sont les macro-

phages, les cellules dendritiques (DC) et les cellules de Langerhans (LC) résidant dans le tractus respiratoire qui sont infectées (**Figure 3**). A l'état immature, ces cellules n'expriment ni la Nectin-4, ni le CD150/SLAM. Le MV s'adsorbe dans un premier temps à la molécule DC-SIGN, une lectine de type-C exprimée par les cellules cibles. L'attachement de la protéine H du MV induit une expression membranaire locale de la molécule CD150, ce qui permet au virus d'entrer dans la cellule (Delpeut et al., 2012). Les DC infectées migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour transmettre le virus aux lymphocytes T (LT) et B (LB) pour initier l'infection et conduit à une première virémie. Le virus se propage ensuite au thymus et aux organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les amygdales, provoquant une virémie secondaire responsable d'une immunosuppression aiguë. La période d'incubation dure 10 à 14 jours, puis les premiers symptômes apparaissent sous la forme de fièvre, de toux, de rhinite conjonctivite et d'une éruption cutanée. L'infection se propage rapidement dans différents organes comme la peau, les reins, le foie, et les tractus digestif et respiratoire,ce qui conduit à la libération de particules infectieuses responsables de la dissémination du virus. Dans le tractus respiratoire, l'infection des cellules épithéliales est due à la migration de DC et de lymphocytes infectés qui expriment des particules virales à leur surface (**Figure 3**). L'infection des cellules épithéliales dans le tractus respiratoire se fait par le récepteur Nectin-4 exprimé uniquement au pôle basolatéral de ces cellules (Delpeut et al., 2012).

Le MV présente également un tropisme cérébral, qui peut conduire au développement d'encéphalomyélites. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer sa propagation dans ce tissu. Le virus pourrait infecter les cellules endothéliales des vaisseaux irrigant la barrière hémato-encéphalique lors de la virémie secondaire, ou infecter directement les neurones au niveau de la jonction synaptique. Dans ce dernier cas, le récepteur à la substance P (Neurokinine-1) pourrait être le récepteur pour l'infection (**Figure 3**).

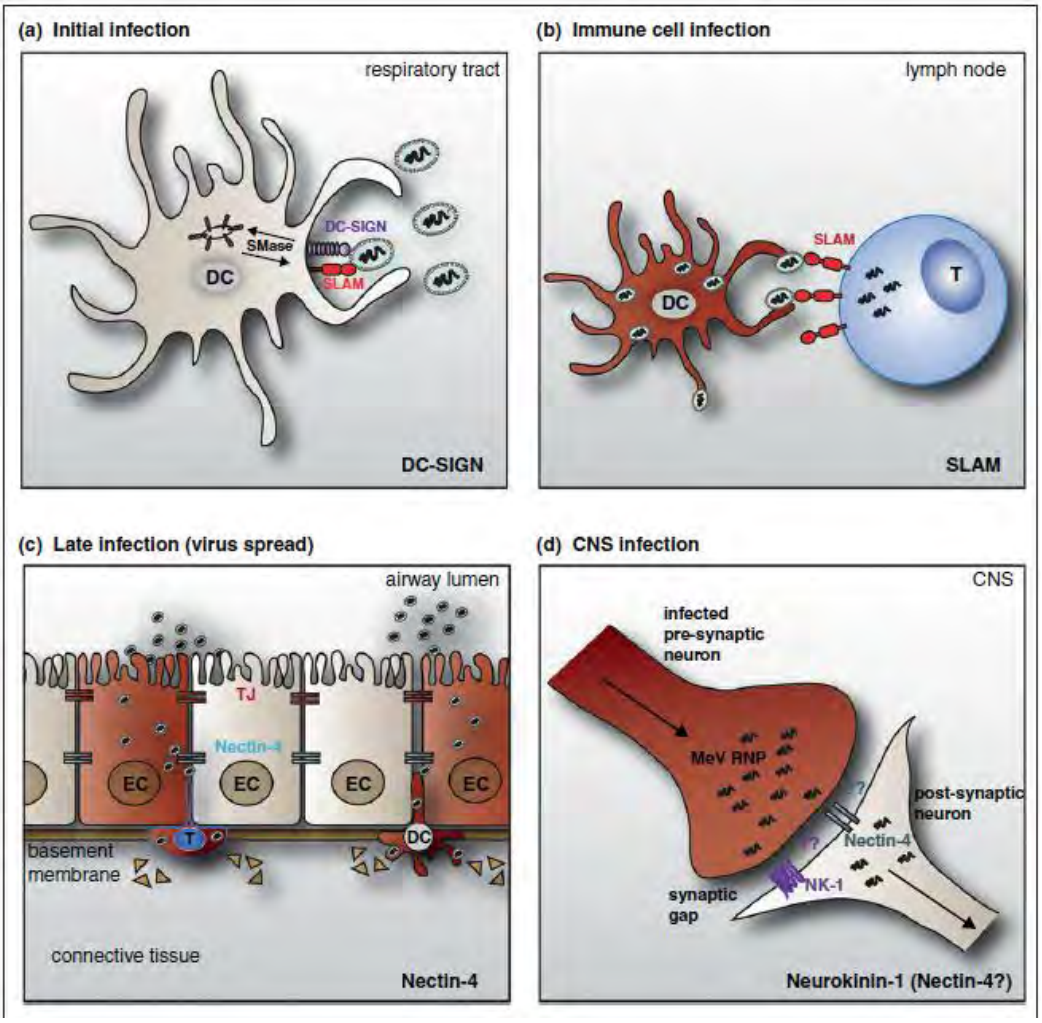


Figure 3 : Voies majeures d'infection et de dissémination du virus sauvage de la rougeole chez l'homme (Delpeut et al., 2012). A) Les DC résidentes du tractus respiratoire sont la cible du MV pour l'infection initiale, B) Les DC infectées migrent dans les ganglions lymphatiques locaux, infectent les LT résidents pour initier l'infection, C) Les DC et LT infectés circulent dans le sang puis migrent au pôle basolatéral des cellules du tractus respiratoire et les infectent via le récepteur Nectin-4, D) Le MV présente un tropisme pour les cellules neurales qui pourrait faire intervenir la Neurokinine-1 et/ou la Nectin-4 comme récepteurs pour l'infection.

Le développement d'une réponse immunitaire est indispensable à la guérison. Pendant la phase prodromique, une réaction immunitaire innée se développe, faisant intervenir la production d'interféron -α et -β (Moss and Griffin, 2006). Toutefois, l'élimination du virus nécessite la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire. Des anticorps sont produits contre toutes les protéines virales mais seuls les anticorps contre l'hémagglutinine H sont neutralisants. Les anticorps développés contre la protéine F ne sont pas neutralisants mais jouent un rôle critique en limitant la propagation du virus (Schneider-Schaulies and Meulen, 1999). Le développement de la réponse immunitaire cellulaire est nécessaire et

suffisant pour surpasser l'infection aiguë, comme le démontre la guérison de patients souffrant d'agammaglobulinémie, alors que les patients souffrant d'anomalies des cellules T développent souvent des complications sévères. Les patients infectés développent une immunité CD4+ et CD8+ spécifique de la rougeole, associée à une élévation de la concentration plasmatique en IL-2 et interféron-γ, puis de l'IL-4.

iv. *Vaccination*

La première souche de MV isolée en 1954 par Enders et Peebles a été obtenue à partir d'un patient, David Edmonston, et fut répertoriée sous le nom "Souche Edmonston". De nombreuses souches vivantes atténuées ont été générées à partir de cette souche sauvage suite à son passage sur différents types de cultures cellulaires (Bankamp et al., 2011; Enders and Peebles, 1954) (**Figure 4**). Par exemple, la Souche Schwarz, qui est utilisée pour la vaccination en Europe et au Brésil, a été obtenue en 1962 par des passages sur cultures de fibroblastes d'embryon de poulet de la souche Edmonston-Enders (Schwarz, 1962). L'analyse comparative des séquences des génomes entre la souche sauvage Edmonston et la souche Schwarz met en évidence une variation de 42 nucléotides (Bankamp et al., 2011). Ces mutations contribuent à l'atténuation de la virulence de la souche Schwarz.

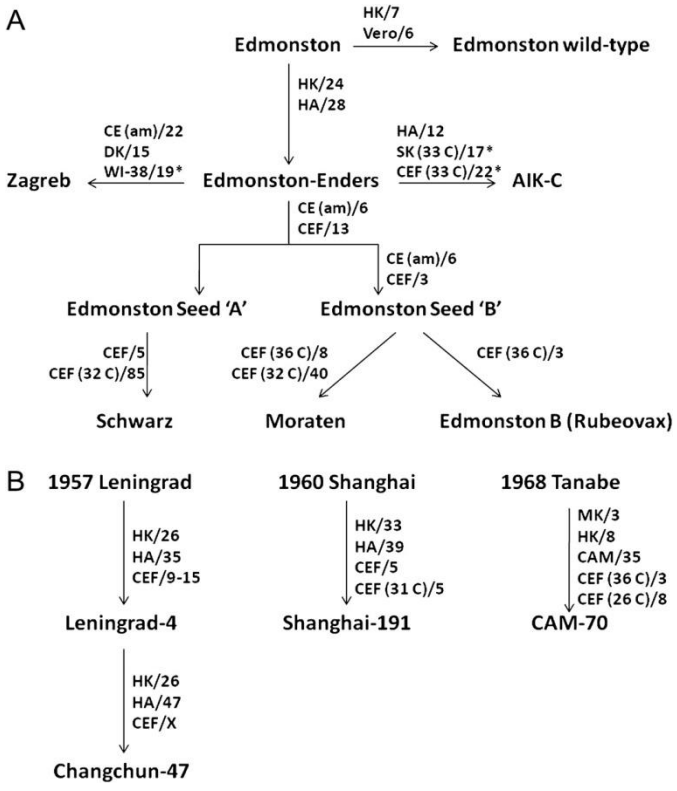


Figure 4 : A) Les différents passages des souches vaccinales dérivées de la souche Edmonston. B) Les différents passages des souches vaccinales dérivées des autres souches

du virus de la rougeole. Les passages sont effectués à 37°C sauf indication. Le nombre de passages est indiqué après le type de culture utilisée. CAM, chorioallantoic of chick embryo; CE (am), intraamniotic cavity of chick embryo; CEF, chick embryo fibroblast; DK, dog kidney; HA, human amnion; HK, human kidney; SK, sheep kidney; WI-38, human diploid cells; *Plaque purification. (Bankamp et al., 2011)

Malgré une solution vaccinale sûre et peu coûteuse, grâce à une politique de prix différenciés (28$ aux USA - 10 cents pour l'UNICEF), environ 20 millions de cas de rougeole sont rapportés chaque année, et plus de 95% des décès associés à une infection par le virus de la rougeole surviennent dans les pays sous-développés.
(http://www.who.int/immunization/topics/measles/en/index.html).

Des millions de doses de vaccins contre la rougeole ont été injectées aux enfants de nombreux pays au travers du programme d'immunisation "Extended Program on Immunization" (EPI) mené par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Ce vaccin induit une immunité forte et à long terme contre le virus de la rougeole, puisqu'après une ou deux injections, des anticorps et des lymphocytes T CD8+ (LT CD8+) mémoires spécifiques persistent encore 25 ans après la vaccination (Griffin, 2001). Avant ces campagnes de vaccination, le nombre de cas de rougeole estimé était de 4 à 5 millions par an entre 1953 et 1962 aux Etats-Unis (Lievano et al., 2012). Entre 2001 et 2008, l'incidence annuelle de la rougeole était de moins de 1 cas par million aux USA (Parker Fiebelkorn et al., 2010) et de moins de 10 cas par million en Europe (2009). La rougeole a causé, en 2010, 139 300 décès dans le monde. Cela représente une diminution de près de 97% du nombre de décès comparé aux 6 millions de décès annuels qui survenaient dans le monde avant l'utilisation du vaccin contre la rougeole (Wolfson et al., 2007).

Entre 1978 et 2010, Merck a distribué 575 millions de doses de vaccins Mumps-Measles-Rubeola (M-M-R^{TM} II) et reçu 17 536 rapports de survenue d'effets secondaires indésirables après immunisation. Seulement 4 822 d'entre eux ont été considérés comme des cas graves, ce qui donne un risque relatif d'avoir un effet indésirable grave de 8,4 cas par million de doses distribuées. La réversion vers une forme pathogène d'une souche atténuée du virus de la rougeole, présente dans la formulation destinée à la vaccination, n'a pas été rapportée (Hilleman, 2001).

v. *Utilisation du virus de la rougeole comme agent oncolytique*

1. Les récepteurs

La souche sauvage du virus de la rougeole utilise pour entrer dans les cellules la molécule CD150/SLAM (Signaling Lymphocyte Acivating Molecule), ce qui lui confère un tropisme naturel pour les cellules de l'immunité telles que les thymocytes, les Lymphocytes B et T, les monocytes/macrophages activés (Hsu et al., 2001; Tatsuo et al., 2000). Les souches atténuées, qui présentent des propriétés oncolytiques, utilisent la molécule CD46 comme principal récepteur d'entrée dans les cellules (Anderson et al., 2004; Naniche et al., 1993). La molécule CD46 est exprimée à faible densité de manière ubiquitaire par toutes les cellules nucléées de l'organisme (Liszewski and Atkinson, 1992). Son rôle est de bloquer la cascade d'activation du complément au niveau de la composante C3. Son expression à faible densité protège ainsi les tissus sains d'une activation accidentelle du complément. Toutefois, il est maintenant bien établi que les cellules tumorales de nombreux types de cancers surexpriment cette molécule pour échapper à la lyse dépendante du complément (Complement-Dependent Cytotoxicity - CDC), qui résulte d'une réponse anticorps contre les cellules tumorales (Fishelson et al., 2003; Gancz and Fishelson, 2009). Cette résistance à la CDC, dépendante de l'expression de la molécule CD46, a également été observée dans le cadre de la thérapie ciblée. En effet, Lieber et ses collaborateurs ont récemment démontré que la surexpression de la molécule CD46 par les Lymphocytes B dans le Lymphome Non Hodgkinien (LNH) inhibe l'action anti-tumorale des anticorps anti-CD20 (Rituximab), puisque l'effet anti-tumoral de ces anticorps monoclonaux est dû à l'activation du mécanisme de CDC (Di Gaetano et al., 2003). La déplétion transitoire des molécules CD46 à la surface des cellules de lymphome restaure l'effet lytique des anticorps sur ces cellules (Beyer et al., 2013).

L'expression sélective à haute densité de la molécule CD46 par les cellules tumorales confère au virus vivant atténué de la rougeole un tropisme naturel pour ces cellules. L'infection dépendante de la molécule CD46 est régulée par un principe d'effet de seuil : en-dessous d'une certaine densité, l'infection par le MV n'est pas efficace et la formation de syncytia entre les cellules infectées et leurs voisines non-infectées, qui est dépendante du niveau d'expression de CD46, est faible (Anderson et al., 2004). Ainsi, les tissus sains ne sont pas un lieu de réplication adéquat pour les souches atténuées du virus de la rougeole.

Récemment, la Nectin-4 a été décrite comme récepteur des souches sauvages et vaccinales du virus de la rougeole (Muhlebach et al., 2011; Noyce et al., 2011). La Nectin-4 est

impliquée dans le passage des particules virales des cellules infectées vers le tractus respiratoire des personnes infectées et joue donc un rôle important dans la transmission du virus (**Figure 3**) (Racaniello, 2011). La Nectin-4 est une protéine des jonctions adhérentes et est décrite à l'origine comme un récepteur du poliovirus (PolioVirus Receptor-Like protein 4 - PVRL-4) (Mendelsohn et al., 1989) et des virus de l'herpès HSV-1 et HSV-2 (Lopez et al., 2000). La Nectin-4 est principalement exprimée dans le placenta, la trachée, et peut être retrouvée à faible densité sur les cellules épithéliales des amygdales, des muqueuses orales et de certaines cellules neurales du cortex cérébral (Noyce et al., 2011). Elle est également décrite comme un marqueur fréquemment surexprimé dans les adénocarcinomes ovariens, pulmonaires, colorectaux, et mammaires (Derycke et al., 2010; Fabre-Lafay et al., 2005; Sugiyama et al., 2013; Takano et al., 2009). Récemment, il a été mis en évidence que la Nectin-4 est responsable de la spécificité de l'infection des cellules tumorales de certains cancers du sein (Sugiyama et al., 2013).

Cependant, d'autres molécules de surface doivent être impliquées dans l'adsorption du virus atténué de la rougeole, car certaines lignées tumorales qui n'expriment aucun des récepteurs décrits ci-dessus sont sensibles à l'infection par le MV (Takeda et al., 2007; Zhang et al., 2012b).

2. Susceptibilité à l'infection par le MV de nombreux types de cancers

De nombreuses études ont montré les propriétés oncolytiques du virus vivant atténué de la rougeole (souche Schwarz et Edmonston), *in vivo* et *in vitro*, sur des souris immunodéficientes portant des xénogreffes de cellules tumorales humaines (**Tableau 1**). Ainsi, l'efficacité oncolytique du MV a été observée contre le lymphome à cellules T (Grote et al., 2001; Parrula et al., 2011), le myélome (Peng et al., 2003), le cancer du pancréas (Penheiter et al., 2010), le glioblastome et le gliome (Allen et al., 2013; Phuong et al., 2003), les carcinomes ovarien (Galanis et al., 2010), rénal (Meng et al., 2010), colorectal (Boisgerault et al., 2013), pulmonaire (Boisgerault et al., 2013; Zhao et al., 2013) et mammaire (Sugiyama et al., 2013), le mélanome (Donnelly et al., 2013; Kaufmann et al., 2013), le mésothéliome (Gauvrit et al., 2008; Li et al., 2010), le médulloblastome (Hutzen et al., 2012; Studebaker et al., 2012) et contre l'hépatoblastome (Zhang et al., 2012c). Durant les 10 dernières années, l'effet oncolytique du virus atténué de la rougeole a été évalué et démontré pour au moins dix-neuf formes de cancers différents (**Tableau 1**).

Tableau 1: Récapitulatif de l'utilisation du MV en virothérapie anti-tumorale. MV-Ed (souche Edmonston du virus de la rougeole), MV-Sch (souche Schwarz du virus de la rougeole, eGFP (virus recombinant pour l' "enhanced Green Fluorescent Protein"), NIS (virus recombinant pour le symporteur Iode/sodium), IFN-β (virus recombinant pour l'Interféron β), CEA (virus recombinant pour le Carcino-Embryonary Antigen), αCD20 (hémagglutinine modifiée pour exprimer le domaine variable de l'anticorps anti-CD20), CD (cytosine désaminase), MMP (Matrix MetalloProteinsases), PSMA (Prostate-specific membrane antigen), mir7 (ARN micro 7), uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor), EGFR (epidermal growth factor receptor), SLAM (signaling lymphocyte activation molecule), PNP (purine nucleoside phosphorylase), NAP (neutrophil-activating protein). **D'après (Msaouel et al., 2013).**

Pathologie	Souches / Modifications	Modèles	Références
Mésotheliome	MV-Sch MV-Sch-eGFP MV-Ed-eGFP-NIS MV-Ed-IFNβ MV-Ed-IFNβ-NIS	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes	(Gauvrit et al., 2008; Li et al., 2010)
Carcinome mammaire	MV-Ed MV-Ed-eGFP MV-Ed-CEA MV-Ed-eGFP-h-uPA MV-Ed-eGFP-m-uPA MV-Ed-NAP MV-Ed-SLAM^{blind}	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes et modèle de carcinome mammaire murin	(Iankov et al., 2012; Iankov et al., 2010; Jing et al., 2009; Liu et al., 2008a; McDonald et al., 2006; Sugiyama et al., 2013)
Carcinome Colorectal	MV-Ed-αCEA MV-PNP-αCEA	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes	(Hammond et al., 2001; Ungerechts et al., 2007)
Adénocarcinome pulmonaire	MV-Sch MV-Sch-eGFP	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes	(Boisgerault et al., 2013; Zhao et al., 2013)
Carcinome Héptocellulaire	MV-Ed-eGFP MV-Ed-CEA MV-Ed-NIS MV-Ed-eGFP-MMPactivable	Cellules tumorales primaires, lignées de cellules tumorales, Xénogreffes et infection sur coupe de tissus tumoraux	(Blechacz et al., 2006; Iankov et al., 2007; Muhlebach et al., 2010)
Myélome Multiple	MV-Ed MV-Ed-eGFP-αCD38 MV-Ed-αCD138 MV-Ed-NIS MV-Ed-eGFP-Wue	Cellules primaires de myélome multiple, lignées de cellules tumorales et xénogreffes de cellules tumorales sur souris immunodéficientes. Essai Clinique en cours.	(Dingli et al., 2004; Hummel et al., 2009; Liu et al., 2010; Liu et al., 2012; Myers et al., 2007; Ong et al., 2006; Peng et al., 2001) (NCT00450814:vaccine therapy with or without cyclophosphamide in treating patients with recurrent or refractory multiple myeloma. Disponible depuis : http//www.clinicaltrials.goc/ct2/show/NCT00450814)
Cancer de la prostate	MV-Ed-eGFP MV-Ed-CEA MV-Ed-NIS MV-Ed-αPSMA	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes	(Liu et al., 2009; Msaouel et al., 2009a; Msaouel et al., 2009b)
Carcinome Ovarien	MV-Ed MV-Ed-eGFP MV-Ed-CEA	Cellules primaires de cancers ovariens, lignées de cellules tumorales et xénogreffes.	(Friedrich et al., 2013; Galanis et al., 2010; Hasegawa et al., 2006a; Hasegawa et al., 2006b; Liu et al.,

	MV-Ed-NIS MV-Ed-eGFP-αHer2/neu-EpCam	Essai clinique de phase I complété.	2008a; Mader et al., 2009; Peng et al., 2002; Zhou et al., 2012)
Mélanome	MV-Ed MV-Ed-eGFP MV-Sch MV-Sch-eGFP MV-Sch-ΔC MV-Sch-ΔC-eGFP	Cellules primaire de mélanomes, lignées tumorales humaines et xénogreffes sur souris immunodéficientes.	(Donnelly et al., 2013) et (Données non publiées et annexe 3)
Lymphomes/Leucémies	MV-Ed MV-Ed-αCD20 MV-Ed-GM-CSF MV-Ed-PNP-αCD20 MV-Ed-eGFP	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes. Essai clinique de phase I complété.	(Bucheit et al., 2003; Grote et al., 2001; Heinzerling et al., 2005; Ungerechts et al., 2010; Yaiw et al., 2011)
Glioblastome multiforme	MV-Ed MV-Ed-eGFP MV-Ed-NIS MV-Ed-^{mir7}activable MV-Ed-αEGFR	Cellules primaires de glioblastomes humains, lignées de cellules tumorales humaines et xénogreffes sur souris immuno-déficientes. Infection sur coupe de tissu cérébral humain. Essai clinque de phase I en cours.	(Allen et al., 2013; Leber et al., 2011; Liu et al., 2007; Opyrchal et al., 2012; Paraskevakou et al., 2007; Phuong et al., 2003)
Cancer pancréatique	MV-Ed MV-Ed-eGFP MV-Ed-NIS MV-Ed-eGFP-NIS	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes.	(Penheiter et al., 2012; Penheiter et al., 2010)
Neuroblastome	MV-Ed-CEA	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes.	(Zhang et al., 2012b)
Médulloblastome	MV-Ed-eGFP	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes.	(Studebaker et al., 2012)
Cancer anaplasique de la thyroïde	MV-Ed-NIS	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes.	(Reddi et al., 2012)
Cancer rénal	MV-Ed MV-Ed-Wt-P MV-Ed-Wt-NPL	Cellules primaires de carcinome rénal humain, lignées de cellules tumorales humaines et xénogreffes sur souris immunodéficientes.	(Meng et al., 2010)
Cancer squameux de la tête et du cou	MV-Ed-NIS MV-Ed-eGFP MV-Ed-eGFP-antiEGFR MV-Ed-CD-antiEGFR	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes.	(Li et al., 2012)
Fibrosarcome	MV-Ed MV-Ed-eGFP MV-Ed-MMPactivable	Lignées tumorales Humaines et Xénogreffes sur souris immunodéficientes	(Bucheit et al., 2003; Muhlebach et al., 2010)
Rhabdomyo-sarcome	MV-Ed-CEA	Lignées tumorales Humaines	(Liu et al., 2008a)
Métastases hépatiques de cancers colorectaux, cancers pancréatiques, de lymphomes B non-Hodgkiniens, mélanomes et carcinomes rénaux.	MV-Ed-eGFP MV-Ed-eGFP -MMPactivable	Infection sur coupe de tissus tumoraux humains	(Muhlebach et al., 2010)

vi. *Modification du virus de la rougeole*

Bien que le virus atténué de la rougeole présente un tropisme naturel pour les cellules tumorales qui surexpriment la molécule CD46, il est possible de modifier certaines de ses caractéristiques pour en optimiser les performances oncolytiques, en sécuriser l'utilisation ou en augmenter les propriétés immunostimulatrices (**Tableau 1**).

1. Optimiser ses propriétés lytiques

L'effet cytopathique du virus de la rougeole se traduit par la formation de cellules géantes multinucléées (ou syncytia) et conduit au déclenchement des mécanismes de l'apoptose (Esolen et al., 1995). Des modifications peuvent être apportées pour augmenter les propriétés oncolytiques du virus de la rougeole.

Ainsi, le groupe de S.J. Russell a développé un MV recombinant pour le symporter Iode/Sodium (MV-NIS) (Dingli et al., 2004). Ce virus permet de combiner l'effet cytopathique du MV avec les propriétés ionisantes de l'Iode 131 (^{131}I). Cette stratégie combinée porte le nom de radiovirothérapie (Penheiter et al., 2010). Les cellules tumorales infectées expriment le symporter NIS et concentrent l'^{131}I, un émetteur de particules β. Les particules β émises par la dégradation de l'^{131}I pénètrent les tissus environnants jusqu'à 400 µm de leur point d'émission, produisant un effet "bystander" local sur les cellules voisines résistantes à l'infection et/ou la lyse par le virus dans un modèle de xénogreffes de mélanome humain chez la souris (Dingli et al., 2004). L'expression du symporter Iode/Sodium permet également de suivre la cinétique de l'infection *in vivo* en utilisant un autre isotope de l'iode : l'iode 123 (^{123}I). Cette approche est décrite dans la partie **"Optimiser sa traçabilité"** de cette section.

Des stratégies de chimiovirothérapie ont également été développées. Dans ce cadre, le virus de la rougeole est modifié de façon à exprimer des gènes suicide, codant pour des enzymes "prodrug convertase" capables de convertir des molécules chimiques inertes en molécules cytotoxiques. Ainsi, le groupe de R. Cattaneo a développé un virus de la rougeole recombinant pour la purine nucléoside phosphorylase (PNP) d'Escherichia coli, une enzyme "prodrug convertase" capable de convertir le 6-methylpurine-2′-deoxyriboside (MeP-dR) en 6-methylpurine (MeP). Cette substance hautement diffusible est ensuite métabolisée en un analogue toxique de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP), qui inhibe immédiatement la synthèse des ADN, ARN et protéines (Ungerechts et al., 2007). Plus récemment, le groupe de U.M.

Lauer a généré un virus de la rougeole recombinant pour une enzyme bactérienne, la super-cytosine désaminase (SCD), capable de convertir la 5-fluorocytosine en 5-Fluorouracil, un agent chimiothérapeutique approuvé, qui est ensuite métabolisé par la cellule infectée en 5-Fluorouridine-mono phosphate (5-FUMP). Le 5-FUMP interfère avec les enzymes de réparation de l'ADN et inhibe la synthèse de l'ADN et des ARN. De manière à augmenter l'effet chimiothérapeutique, les auteurs ont également inclus le gène codant pour une protéine issue du virus de l'herpès, permettant la sécrétion à l'extérieur de la cellule infectée de l'agent activé, de sorte à induire la mort des cellules voisines (Lampe et al., 2013). Dans les deux cas, les auteurs ont montré une action synergique entre l'activité lytique du virus et l'action cytotoxique des agents chimiothérapeutiques.

Plus simplement, il a également été rapporté, dans un modèle de xénogreffes de cellules de carcinome rénal humain établies chez la souris immunodéficiente, que la souche atténuée du virus de la rougeole modifiée pour lui faire exprimer les protéines N, P et L de la souche sauvage possède des propriétés oncolytiques supérieures à la souche atténuée contrôle (Meng et al., 2010). Cet effet anti-tumoral supérieur serait dû à la capacité de cette souche à se répliquer même en présence d'IFN de type I.

2. Optimiser son immunogénicité

Des études suggèrent que l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale pourrait agir en synergie avec l'action lytique du MV (Boisgerault et al., 2010; Donnelly et al., 2013; Gauvrit et al., 2008; Zhang et al., 2012d). Différentes stratégies, regroupées sous le terme d'immuno-virothérapie, ont été développées de sorte à augmenter les propriétés immunogènes du virus oncolytique de la rougeole.

Les interférons de type I sont connus pour avoir des propriétés anti-angiogéniques (Brem et al., 1993) et pour favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale en participant à l'activation de différents types de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T et lymphocytes Natural Killer (NK) (Le Bon and Tough, 2002). Ces propriétés ont été exploitées en modifiant le virus atténué de la rougeole de sorte qu'il exprime l'IFN-β humain. Ainsi, Li et ses collègues ont montré que ce MV-IFN-β présente une meilleure capacité à détruire des tumeurs de mésothéliome, établies en xénogreffes sous-cutanées sur des souris immunodéficientes, et à augmenter la survie des souris traitées en comparaison avec le MV Contrôle (Li et al., 2010).

Les séquences codant pour la "Neutrophil-Activating Protein - NAP" (Iankov et al., 2012) ou encore le Granulocyte - Macrophage Colony Stimulation Factor (GM-CSF) (Grossardt et al., 2013) ont également été insérées dans le MV. Le MV codant pour la protéine NAP soluble a ainsi montré une efficacité thérapeutique supérieure comparée à la souche classique du MV dans un modèle préclinique de cancer du sein (Iankov et al., 2012). Cette efficacité accrue est associée aux propriétés immuno-adjuvantes de la protéine NAP, une petite protéine de 144 acides aminés dérivée d'*Helicobacter Pylori* et agoniste du Toll-Like Receptor 2 (TLR2). Les cellules infectées sécrètent en grande quantité cette protéine qui induit l'expression de Tumor-Necrosis Factor-α (TNF-α), d'Interleukine (IL-) -6 et -12 et promeut ainsi la polarisation de la réponse immunitaire vers un profil Th1 favorable au développement d'une réponse immunitaire cellulaire anti-tumorale (Amedei et al., 2006; D'Elios et al., 2007). Le MV-GM-CSF a lui aussi montré une efficacité thérapeutique supérieure au MV contrôle dans un modèle murin de cancer colorectal. Cette efficacité accrue est associée à une augmentation de l'infiltration de lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux après injection intra-tumorale du MV-GM-CSF (Grossardt et al., 2013).

L'immuno-virothérapie, en optimisant le recrutement de la réponse immunitaire innée et adaptative contre des antigènes de tumeurs, augmenterait ainsi l'effet thérapeutique de la stratégie de virothérapie anti-tumorale.

3. Optimiser la spécificité de l'infection

L'entrée du virus dans les cellules est dépendante de la reconnaissance, par l'hémagglutinine virale, de la molécule de surface CD46 exprimée à faible densité par toutes les cellules nucléées de l'organisme et exprimée à forte densité sur les cellules tumorales, ou de la reconnaissance de la molécule Nectin-4. Il est possible de modifier, grâce au génie génétique, le tropisme naturel du MV et de le rediriger vers un tropisme dépendant de l'expression des marqueurs associés au tissu tumoral. Ces modifications sont réalisées dans l'objectif d'augmenter la spécificité de l'infection au tissu tumoral, de limiter l'infection des tissus sains ou de limiter la possibilité pour les cellules tumorales d'échapper à la lyse par le virus.

Une des stratégies consiste à remplacer la partie C-terminale extracellulaire de l'hémagglutinine par un domaine d'anticorps à chaîne unique dirigé contre un marqueur membranaire exprimé à la surface des cellules tumorales (Peng et al., 2003). La souche modifiée perd ainsi sa capacité à infecter les cellules par les marqueurs classiques (CD46, CD150/SLAM, Nectin-4) et acquiert un tropisme restreint aux cellules exprimant l'antigène reconnu par la

chaîne de l'anticorps greffé à l'extrémité de l'hémagglutinine. Ainsi, le virus atténué de la rougeole a pu être redirigé efficacement contre différents marqueurs associés au tissu tumoral en utilisant la mutagénèse "site-spécifique". Les groupes de M.S. Topp et S.J. Russell ont inséré respectivement, la chaîne codant pour le domaine d'anticorps à chaîne unique dérivée de l'anticorps monoclonal Wue-1, dirigé contre le marqueur CD138 associé au Myélome Multiple (MM) (Hummel et al., 2009) et la chaîne codant pour le domaine d'anticorps à chaîne unique dirigé contre CD38, un marqueur spécifique des cellules de myélome (Peng et al., 2003). Le MV a également été modifié de sorte que l'infection soit dépendante de l'expression d'autres marqueurs spécifiques de tumeurs tels que la molécule CD20, spécifique des Lymphomes B Non-Hodgkiniens et dont l'efficacité a été mesurée sur des échantillons issus de patients (Yaiw et al., 2011). Un MV modifié pour que l'infection soit dépendante de l'expression de l'antigène membranaire spécifique du cancer de la prostate ("Prostate-Specific Membrane Antigen" - PSMA) a également été utilisé dans un modèle murin de xénogreffes de cellules tumorales humaines (Liu et al., 2009).

Très récemment, K. Fiedrich et ses collègues ont développé une stratégie de redirection du tropisme du virus oncolytique consistant en l'ajout, à l'extrémité de l'hémagglutinine virale, d'un motif répété de protéine Ankyrine (Designed Ankyrin Repeat Protein - DARPins) (Friedrich et al., 2013). Les Ankyrines sont des motifs protéiques répétés de 33 acides aminés, qui peuvent se répéter de 4 à 34 fois. Ces domaines Ankyrines sont impliqués dans la régulation des interactions protéine-protéine. En utilisant les méthodes du phage display et du ribosome display, les auteurs ont sélectionné deux motifs Ankyrines ayant une reconnaissance spécifique pour deux marqueurs associés au tissu tumoral (Stefan et al., 2011) : le récepteur pour le facteur de croissance épidermique humain Her2/*neu* (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) et une molécule d'adhésion des cellules épithéliales EpCam (Epithelial cell adhesion molecule) (Friedrich et al., 2013). Par génie génétique, les séquences codant pour ces deux motifs ont été fusionnées et insérées dans la séquence de l'hémagglutinine virale, supprimant sa capacité à reconnaître les molécules d'adhésions classiques. Les auteurs ont ainsi obtenu un MV recombinant capable de reconnaître deux récepteurs différents et démontrés *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffes de cellules tumorales humaines que ce virus modifié infecte et élimine efficacement les tumeurs de ces animaux. D'après les auteurs, cette bi-spécificité permettrait d'éviter les phénomènes de sélection de variants tumoraux n'exprimant plus les récepteurs au virus, suite à la pression de sélection imposée par l'infection. De plus en redirigeant le tropisme du virus oncolytique de la rougeole vers la mo-

lécule EpCAM, un marqueur associé aux cellules tumorales souches, les auteurs espèrent pouvoir s'attaquer directement aux cellules qui initient la tumeur (Friedrich et al., 2013).

Pour augmenter la restriction de l'infection au tissu tumoral, il est également possible de modifier l'expression d'autres protéines virales que l'hémagglutinine. Ainsi, le groupe de C.J. Buchholz a modifié la séquence codant pour la protéine de fusion (F) du MV, en y insérant par génie génétique une séquence de clivage pour la Matrix MétalloProtéinase-2 (MMP-2) (Muhlebach et al., 2010). Les métalloprotéinases sont surexprimées dans une large variété de cancers, et plusieurs membres de cette famille sont associés à la progression tumorale, à la propagation des métastases et à un mauvais pronostic (Deryugina and Quigley, 2006). L'activation des propriétés fusogéniques de la protéine F requiert l'action de protéases ubiquitaires exprimées dans l'appareil de Golgi (Muhlebach et al., 2010). L'addition d'une séquence nécessitant l'action de MMP-2 restreint la fonctionnalité de la protéine F du virus de la rougeole au tissu tumoral (Muhlebach et al., 2010). Les auteurs ont ainsi démontré, sur des coupes de tissus hépatiques sains ou tumoraux prélevés chez 44 patients, que l'infection et la lyse par ce virus modifié sont restreintes au tissu tumoral, alors que le virus sauvage infecte les cellules saines hépatiques et provoque la formation de syncitia dans le tissu sain.

Le tropisme cellulaire du MV peut être contrôlé en exploitant l'expression tissu-spécifique de certains microARN (miR). Les miR sont des ARN simple-brin courts propres aux cellules eucaryotes et composés en moyenne de 22 nucléotides. Les miR sont des régulateurs post-transcriptionnels capables d'inhiber l'expression d'un gène. Leur appariement à la séquence complémentaire de l'ARN messager du gène cible conduit à la répression transcriptionnelle ou à la dégradation de cet ARNm (Bartel, 2009). L'expression différentielle des miR est une caractéristique du tissu tumoral (Odjele et al., 2012). Il a été démontré récemment que miR-7 n'est pas exprimé par les cellules de glioblastome multiforme (GBM) probablement parce qu'il est impliqué dans la répression de l'expression du récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGF-R) (Kefas et al., 2008), alors que sa présence est abondante dans le tissu neural sain. Cette expression différentielle fait de miR-7 une cible idéale pour restreindre la réplication du virus oncolytique de la rougeole au tissu neural néoplasique (Leber et al., 2011). Ainsi, en insérant une séquence cible pour miR-7 dans la région 3' non-transcrite du gène codant pour la protéine F, le groupe de C. von Kalle, a montré dans un modèle préclinique de xénogreffes de glioblastome humain chez la souris, que la réplication du virus modifié était restreinte aux cellules tumorales n'exprimant par miR-7 (Leber et al., 2011).

Ces stratégies permettraient d'augmenter la sécurité d'utilisation du virus oncolytique de la rougeole lors de son utilisation en virothérapie anti-tumorale en atténuant fortement la

virulence du virus dans les tissus non ciblés. Cette sécurité d'utilisation accrue serait un atout intéressant, notamment dans le traitement du GBM qui nécessiterait l'injection intracérébrale de grande quantité de virus.

4. Optimiser sa traçabilité

L'évaluation de l'efficacité thérapeutique du virus oncolytique de la rougeole en clinique nécessite la possibilité de mesurer, par des méthodes non invasives, la spécificité de l'infection dans le tissu tumoral et le niveau de réplication du virus. Dans cette optique, le virus de la rougeole peut être modifié pour faciliter l'étude pharmacocinétique. Ainsi, des virus recombinant pour l'Antigène Carcino-Embryonnaire (CEA), pour la chaîne légère λ d'immunoglobuline ou pour le symporter Iode/Sodium, ont été développés.

L'expression du CEA comme marqueur sérique de la réplication virale a déjà prouvé son efficacité chez des patientes traitées pour des cancers ovariens. Chaque injection de virus était suivie d'une augmentation sérique du CEA (Galanis et al., 2010). Toutefois, l'expression de CEA ne permet pas de dire si le virus s'est répliqué dans une cellule tumorale ou dans une cellule saine.

Une autre stratégie a été développée par le groupe d'E. Galanis, dans le cas particulier du myélome, pour attester de la réplication du virus dans les cellules tumorales. Le myélome est un cancer hématologique qui touche les plasmocytes (Lymphocytes B activés) responsables de la production de grandes quantités d'immunoglobulines. Dans la grande majorité des cas, ils sécrètent des gamma immunoglobulines monoclonales composées de deux chaînes lourdes γ et de deux chaînes légères κ (IgGκ). Ainsi, l'insertion d'une séquence codant pour une chaîne légère λ d'immunoglobuline, dans le virus de la rougeole, permet la formation d'une immunoglobuline circulante chimérique IgGκ/λ par les plasmocytes malins infectés. Cette IgGκ/λ peut être détectée dans le sang par un test ELISA modifié comprenant un anticorps d'ancrage reconnaissant la chaîne légère λ et un anticorps de détection reconnaissant la chaîne lourde γ invariante du clone d'IgG sécrété par les plasmocytes malins (Iankov et al., 2009).

Le MV-NIS utilisé dans la stratégie de radiovirothérapie permet également de suivre de façon non invasive la réplication du virus. Les cellules tumorales infectées exprimant le symporter Iode/Sodium sont capables de concentrer l'^{123}I, ce qui permet de suivre la dispersion du virus au sein d'une tumeur par "single-photon emission computed tomography/computed tomography" (SPECT/CT) (Penheiter et al., 2012).

vii. *Développement clinique*

1. Essai clinique de phase I : Lymphome Cutané à Cellules T

Suite à l'infection naturelle par la souche sauvage de virus de la rougeole, des régressions spontanées de lymphome d'Hodgkin (Taqi et al., 1981; Zygiert, 1971) et de lymphome de Burkitt (Bluming and Ziegler, 1971; Ziegler, 1976) ont été observées. Ces observations suggèrent que le virus sauvage de la rougeole possède des propriétés oncolytiques contre les tumeurs hématologiques, probablement grâce à son tropisme dirigé contre la molécule CD150. Par la suite, Heinzerling et ses collègues ont évalué l'efficacité oncolytique de la souche atténuée du virus de la rougeole Edmonston-Zagreb dans le premier essai clinique de phase I sur cinq patients souffrant de Lymphome Cutané à Cellules T (Cutaneous T-Cell Lymphoma - CTCL) (Heinzerling et al., 2005). Cette pathologie se caractérise par l'accumulation de lymphocytes T clonaux dans la peau, conduisant à la formation de plaques et de tumeurs. Cette étude clinque montre que l'injection intra-tumorale de MV provoque une infection locale des cellules tumorales, mise en évidence par l'effet cytopathique caractéristique du virus. Cette étude a permis de montrer que l'infection locale, au point d'injection, n'est pas inhibée par la présence d'une pré-immunité contre la rougeole et qu'un prétraitement systémique par l'IFN-α permet d'atténuer la virulence du MV dans les cellules saines, sensibles à l'action antivirale de l'IFN-α, alors que les cellules tumorales ont perdu cette sensibilité et sont efficacement infectées. Des régressions tumorales ont été observées pour trois patients avec, de manière surprenante, des régressions de tumeurs distantes non injectées.

2. Essai clinique de phase I : Cancer Ovarien chimio résistant

Les propriétés oncolytiques du virus atténué de la rougeole ont également été évaluées cliniquement chez des patientes, pré-immunisées contre la rougeole et présentant des cancers récurrents des ovaires réfractaires aux injections de Taxol et platine. Eventhia Galanis et ses collègues (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) ont utilisé la souche Edmonston recombinant pour le CEA soluble (MV-CEA) qui permet le suivi de la réplication virale par dosage sérique du CEA (Galanis et al., 2010). Des doses croissantes de virus, allant de 10^3 $TCID_{50}$ (0,1 fois la dose vaccinale) à 10^9 $TCID_{50}$ (100 000 fois la dose vaccinale), ont été injectées en intra péritonéal aux patientes. La solution virale est diluée dans 500mL de solution saline puis infusée pendant 30 minutes. Le traitement est répété tous les mois et les patientes ont reçu jusqu'à 6

cycles de traitement. La dose maximale de virus injectée a été déterminée sur des critères techniques limitant la production de doses plus concentrées. Les doses injectées n'ont pas permis de déterminer la dose maximale injectable. Une réponse clinique objective a été observée pour 14 des 21 patientes incluses dans l'essai, avec une stabilisation de la maladie d'une durée moyenne de 92.5 jours. Cette stabilisation est associée, pour cinq des patientes, à une diminution du marqueur tumoral CA-125. La médiane de survie des patientes traitées (12.15 mois) a été doublée par rapport à la moyenne de survie attendue dans cette population de patientes (6 mois). Ces résultats mettent en lumière le potentiel thérapeutique de la virothérapie anti-tumorale dans le traitement des patientes atteintes de cancers ovariens.

3. Essais cliniques en cours

Trois essais cliniques de phase I visant à évaluer l'efficacité de la virothérapie anti-tumorale utilisant le virus de la rougeole sont actuellement en cours. Ces essais recrutent des patients atteints de carcinomes squameux récurrents ou métastatiques de la tête et du cou, de mésothéliome ou de myélome multiple. Tous ces essais cliniques sont réalisés à la Mayo clinic, Rochester, Minnesota, USA, avec l'objectif commun de déterminer la dose maximale injectable de le souche Edmonston modifiée (MV-NIS) (http://www.clinicaltrials.gov). Tous les patients recrutés doivent être séropositifs pour la rougeole, avec un taux supérieur à 20EU/ml d'IgG anti-rougeole. L'essai clinique concernant le myélome multiple présente la particularité d'évaluer si l'injection de cyclophosphamide, un agent immunosuppresseur déjà utilisé dans le traitement du myélome, augmente l'effet de la virothérapie anti-tumorale utilisant le MV-NIS.

B. Autres virus oncolytiques

D'autres virus à ARN sont étudiés pour leurs propriétés lytiques, notamment le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et le virus de la maladie de Newcastle (NDV) (Boisgerault et al., 2010). Des virus à ADN sont également évalués dans des stratégies de virothérapie anti-tumorale. Parmi les virus à ADN utilisés on retrouve notamment les Herpès Simplex Virus (HSV), les Adénovirus (AdV), et les Poxvirus (Boisgerault et al., 2010; Russell et al., 2012). La majorité des virus à ADN ne présente pas un tropisme naturel pour les cellules tumorales ; l'acquisition de leurs propriétés anti-tumorales est donc le produit du génie génétique. Trois virus à ADN en particulier sont commercialisés ou en phase avancée dans des essais cliniques : le H101 de la famille des Adénovirus, le HSV et le virus de la vaccine de la famille des Pox-virus.

i. *L'Adénovirus H101*

Le H101 est un virus à ADN de la famille des Adénovirus (AdV) de type 5 et est, à ce jour, le seul virus oncolytique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché. Il est uniquement utilisé en Chine en combinaison avec la radiothérapie dans le traitement de cancer ORL (Garber, 2006). Le virus H101 utilise comme porte d'entrée dans les cellules le récepteur des Coxsackies et Adénovirus (CAR). Le récepteur CAR est exprimé de manière ubiquitaire par les cellules épithéliales normales et est principalement localisé au niveau des jonctions serrées ce qui suggère qu'il joue un rôle dans l'adhésion cellulaire même si sa fonction n'est pas formellement déterminée. L'entrée du virus commence par l'ancrage des protéines fibreuses virales au récepteur cellulaire CAR, et se poursuit avec l'endocytose de la particule virale régulée par l'interaction entre la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) et les intégrines cellulaires $\alpha_v\beta$ au niveau de puits de clatherines. La particule virale transite par le compartiment endosomal où elle est désassemblée sous l'action du pH. L'ADN viral peut alors être transporté au noyau, via un transport actif associé aux microtubules, où il pourra être transcrit (Kanerva and Hemminki, 2004).

Le virus H101, produit par Shanghai Sunway Biotech, est un virus recombinant présentant une délétion des gènes E1B-55kDs et E3. Ces mutations confèrent au virus H101 ses propriétés anti-tumorales (He et al., 2011). Le gène suppresseur de tumeur p53 est fréquemment muté ou son activité est inhibée par des modifications épigénétiques dans les cellules cancéreuses (White, 1994; Zhang et al., 2009). La perte de fonction de p53 permet aux cel-

lules tumorales d'échapper aux mécanismes d'apoptose et promeut la progression tumorale. La stratégie de virothérapie anti-tumorale utilisant l'adénovirus H101 ou son proche cousin le virus ONYX-015, tire avantage de cette aberration. En effet, la réplication de ces adénovirus requiert que la protéine p53 soit dans un état inactivé. Les Adénovirus infectent les cellules quiescentes et provoquent leur entrée en phase S du cycle cellulaire pour permettre la réplication du génome viral. Le gène E1B des adénovirus humains code pour une protéine de 55kDa qui se lie à p53 et l'inactive, prérequis indispensable à la réplication virale (Bischoff et al., 1996). La délétion ou les mutations du gène p53 sont fréquentes dans la plupart des cancers humains. Bischoff et ses collaborateurs ont démontré qu'un adénovirus portant une délétion du gène E1B n'est plus capable de se répliquer dans les cellules saines ayant p53 fonctionnel. Toutefois, ce virus se réplique de façon efficace dans les cellules tumorales dont la fonction de p53 est altérée. Ainsi, même si les Adénovirus n'infectent pas de manière sélective les cellules tumorales, la délétion du gène E1B n'autorise leur réplication que dans les cellules déficientes pour les gènes p53 (Bischoff et al., 1996).

Le virus oncolytique H101 présente également une délétion du gène E3, qui code pour des protéines aux fonctions immuno-régulatrices. Il a été démontré dans des modèles animaux qu'un adénovirus portant la délétion du gène E3 induit une meilleure réponse inflammatoire que le virus sauvage (Sparer et al., 1996). En effet, les ORF 10.4K et 14.5K du gène E3, codent pour des glycoprotéines transmembranaires qui forment un hétérodimère (E3-10.4K/14.5K) impliqué dans la diminution de l'expression du récepteur à l'Epithelial Growth Factor (EGF-R) (Tollefson et al., 1991), du récepteur Fas, un membre pro-apototique de la famille des Tumor Necrosis Factor Receptor (TNF-R) (Shisler et al., 1997) et dans l'internalisation des TNF Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptors 1 et 2 (TRAIL-R1 et R2) (Benedict et al., 2001). La région E3 du génome des Adénovirus contribue donc à inhiber la réponse immunitaire de l'hôte et particulièrement la réponse immunitaire cellulaire, dont certaines voies de défense dépendent de l'expression de ces récepteurs par les cellules infectées, notamment pour la lyse par les Lymphocytes T et NK régie par l'engagement de Fas et TRAIL. La délétion de la région E3 contribue ainsi aux propriétés oncolytiques de l'Adénovirus H101 en abolissant ses mécanismes immunosuppresseurs.

ii. *Virus Herpes Simplex : HSV-1*

Le virus oncolytique le plus avancé pour une commercialisation en Europe et aux USA est le Virus Herpès Simplex recombinant pour le GM-CSF (HSV-1-hGM-CSF) déve-

loppé par l'industriel Amgen : Talimogen Laherparepvec (TVEC). Le TVEC vient récemment de compléter un essai clinique de phase III randomisé dont les résultats devraient être communiqués courant 2013 (Sheridan, 2013). Le HSV-1 est un virus à ADN double brin du genre Simplexvirus et de la famille des Herpesviridae. Les propriétés oncolytiques d'HSV-1 ont été étudiées dans un essai clinique de phase II sur des patients souffrant de mélanome non opérable.

Le TVEC a été modifié de façon à exprimer le GM-CSF humain dans l'objectif d'optimiser la réponse immunitaire anti-tumorale qui pourrait se mettre en place suite à la libération d'antigènes de tumeur par la lyse induite par l'infection. Le gène du GM-CSF a été introduit au niveau de la séquence codant pour le gène viral ICP34.5, inactivant ainsi sa synthèse (Liu et al., 2003). L'expression du gène ICP34.5 contrecarre le blocage de la réplication d'HSV régulée par la voie Protéine Kinase R (PKR) des cellules infectées. En absence de la protéine codée par le gène ICP34.5, la PKR phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2-α et inhibe ainsi la totalité de la synthèse protéique dans la cellule infectée, y compris celle des protéines virales (Chou et al., 1995). Ainsi, la délétion du gène ICP34.5 confère au TVEC la spécificité de sa réplication dans les cellules qui ne présentent pas d'activité PKR fonctionnelle ; dysfonction fréquemment retrouvée dans le tissu tumoral (Liu et al., 2003). Le TVEC présente également une délétion du gène ICP47, décrit pour interférer avec la présentation antigénique par les cellules infectées en bloquant l'activation de la protéine "Transporter Associated with antigen Processing" (TAP), inhibant ainsi le passage des peptides antigèniques dans le réticulum endoplasmique pour y être chargés sur les molécules du CMH-I (Hill et al., 1995). La délétion du gène ICP47 renforce donc les propriétés immunogènes du TVEC. Pour finir, la délétion du gène ICP47 provoque la surexpression du gène viral US11, facteur qui amplifie la réplication du virus (Mohr et al., 2001). Afin de sécuriser l'utilisation du TVEC, la Thymidine Kinase virale n'a pas été modifiée de sorte qu'elle reste sensible aux agents antiviraux.

Ainsi, l'HSV oncolytique a démontré son efficacité à infecter et détruire de nombreux types de cellules tumorales. L'injection intra-tumorale a permis de démontrer, dans des modèles animaux, la capacité de ce virus à inhiber la progression tumorale au niveau local en détruisant les cellules tumorales infectées et au niveau systémique en induisant une réponse immunitaire cytotoxique anti-tumorale (Toda et al., 1999). Dans un essai clinique de phase II sur des patients atteints de mélanome non opérable de stade IIIc et IV, le TVEC a montré sa capacité à induire une réponse objective chez 26% des patients traités par des injections intra-tumorales, sur les tumeurs injectées aussi bien que sur des tumeurs distantes non injectées

(Senzer et al., 2009). La survie estimée à un an des patients inclus dans cette étude était de 25,5%. La survie globale à un an des patients ayant été traités par des injections intratumorales d'HSV oncolytique est de 58% et si l'on considère uniquement les patients qui ont présenté une réponse partielle ou complète elle est de 93%. Cette étude a également mis en évidence qu'il n'y avait pas de corrélation entre les réponses observées suite au traitement par le TVEC et le fait que le patient ait reçu une ou plusieurs thérapies préalables. Le statut sérologique vis-à-vis du HSV était également sans effet sur la réponse.

iii. *Virus de la Vaccine : JX-594*

Le JX-594 pexastimogene devacirepvec (Pexa-Vec; JX-594) est un virus oncolytique et immuno-thérapeutique de la famille des Poxvirus, dérivé du virus de la vaccine. Il contient une seule molécule d'ADN bicaténaire linéaire et se réplique dans le cytoplasme cellulaire. Le virus s'adsorbe sur des Glycosaminoglycanes (GAGs) à la surface des cellules, puis il est internalisé dans les vacuoles lysosomales où il est dépouillé de son enveloppe sous l'influence d'enzymes hydrolytiques. La nucléoprotéine est ensuite libérée dans le cytoplasme, puis dégradée à son tour pour libérer la molécule d'ADN virale. Les adénovirus ont évolué pour exploiter des voies de transduction cellulaire afin d'activer leur réplication et leur dissémination. Les Poxvirus ont une réplication et une propagation rapide dépendante de la voie EGFR-ras, surexprimée dans la majorité des cellules tumorales.

Le JX-594 a été obtenu après modification de la souche Wyeth de la vaccine et présente une délétion du gène codant pour la thymidine kinase (*TK)* virale indispensable à sa réplication. Du fait de la délétion du gène codant pour la *TK* virale, la réplication du JX-594 nécessite une activité *TK* cellulaire très importante. L'activation de la voie EGFR-Ras et une forte activité cellulaire *TK* sont fréquemment associées aux tissus tumoraux (Hengstschlager et al., 1998) et confèrent au JX-594 son tropisme pour les cellules tumorales. Chez la souris, l'injection systémique de vaccine, présentant une délétion du gène codant pour la *TK,* a montré une diminution de l'expression des protéines virales de 3 log dans le tissu sain par rapport au tissu tumoral (McCart et al., 2001). Le JX-594 est également recombinant pour l'expression du GM-CSF et la β-galactosidase (β-gal). Ces facteurs permettent respectivement de stimuler la réponse immunitaire (Dranoff et al., 1993) et d'attester de la réplication virale (Breitbach et al., 2013). Le JX-594 est ainsi un virus oncolytique dont la réplication est restreinte au tissu tumoral, et est armé d'une cytokine immunostimulatrice. Il peut être délivré à

la tumeur par injection intraveineuse (Breitbach et al., 2011) ou injection intra-tumorale (Park et al., 2008).

Ainsi, injecté directement dans la tumeur ou par voie intraveineuse, le JX-594 a démontré son efficacité systémique sur un modèle préclinique de cancer du foie (Kim et al., 2006). Plusieurs essais cliniques ont également été réalisés. Les objectifs de ces essais étaient de déterminer la dose maximale tolérée du JX-594 injectable directement dans la tumeur ou par voie intraveineuse, de démontrer son efficacité oncolytique et d'évaluer ses propriétés immuno-thérapeutiques. En 2008, les résultats d'un essai clinique de phase I sur des patients en phase terminale de cancers primitifs ou métastatiques du foie (colon, carcinome hépatocellulaire (CHC), mélanome, carcinome rénal, carcinome pulmonaire,...), réfractaires aux traitements usuels, ont été publiés (Park et al., 2008). Park et ses collègues ont mis en évidence que le virus JX-594 est bien toléré pour des doses inférieures ou égales à 1.10^9 PFU : l'effet secondaire le plus fréquent après injection étant un syndrome grippal. Au-delà de la dose maximale tolérée, l'injection de JX-594 provoque une hyper bilirubinémie et une obstruction du canal biliaire secondaire au gonflement de la tumeur. Le JX-594 a été injecté directement dans la tumeur avec un intervalle de trois semaines pour un maximum de 8 cycles d'injections. Au total 14 patients ont été traités, dont 3 présentaient une infection par le virus de l'hépatite B (HBV).

Dès 15 minutes après l'injection intra-tumorale, les patients présentent une virémie qui s'atténue pour disparaitre dans les 4 à 6h suivant l'injection, probablement dû à un passage massif du virus dans le sang. Une réémergence du virus dans le sang est observée dans les 3 à 15 jours qui succèdent l'injection. Aux doses les plus fortes est associée l'expression de GM-CSF qui conduit à l'augmentation du nombre de neutrophiles, éosinophiles et monocytes. Dans cette étude, le JX-594 a démonté son efficacité sur différents types de tumeurs, et aussi bien sur les tumeurs qui ont été directement injectées que sur des tumeurs distantes non injectées. L'infection de tumeurs non injectées est probablement possible grâce à la pharmacocinétique de la réplication du virus en deux étapes impliquant à chaque étape, une virémie permettant au virus de se propager (Microbiologie médicale Par Ernest Jawetz,Melnick, Joseph Lewis,Edward Allen Adelberg). Aucune libération du virus dans les urines ou la salive n'a été observée. L'absence de modification significative du bilan hépatique (dosage des transaminases) suggère qu'il n'y a pas de destruction massive des hépatocytes sains par JX-594 (Park et al., 2008). Le traitement par JX-594 de trois patients atteints d'hépato carcinome cellulaire provoqué par le virus de l'hépatite B (HBV) a mis en évidence une forte inhibition de la réplication du HBV. Les cellules tumorales pourraient être un lieu de réplication préférentielle

pour le HBV. La destruction par le JX-594 des cellules hépatiques tumorales pourrait expliquer cette action anti-HBV. Pour ces trois patients, une réponse anti-tumorale objective a été observée sur la tumeur injectée et sur des tumeurs non injectées. Une métastase dans le cou d'un des patients présentait un développement rapide. Celle-ci a été injectée pendant 4 cycles et a rapidement présenté une réponse objective et a été maintenue stable pendant au moins six mois (Liu et al., 2008c).

Plus récemment, un essai de phase II randomisé (n=30) a été réalisé sur des patients atteints de CHC (Heo et al., 2013). Les patients ont reçu soit une dose forte de 10^9PFU soit une dose faible de 10^8PFU. La diminution du volume tumoral et la génération d'une réponse immunitaire anti-tumorale ne sont pas liées à la dose. Par contre, la survie globale est étroitement corrélée à la dose reçue. Ainsi, la médiane de survie du groupe traité par la dose forte est de 14,1 mois alors que celle du groupe traité par la dose faible est de 6,7 mois. De manière intéressante, la présence ou l'absence d'anticorps neutralisant contre la vaccine avant l'injection curative ne corrèle pas avec une modification de la survie.

Quatre patients ayant reçu la dose forte de JX-594 avaient suivi une thérapie systémique avec un inhibiteur de tyrosine kinase (Sorafenib), avant leur inclusion dans le test. Leur espérance de survie était alors de 2 à 4 mois selon les résultats d'un essai de phase III randomisé sur le Sorafenib (Cheng et al., 2009). Ces patients traités par JX-594 ont une médiane de survie de 13.6 mois et deux d'entre eux étaient toujours en vie deux ans après le traitement (Heo et al., 2013).

Cette étude a permis de mettre en évidence que le traitement par JX-594 permet l'induction d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Dans 70% des cas, le sérum des patients traités par JX-594 présente une activité cytotoxique dépendante du complément (CDC) contre des lignées cellulaires de CHC. La génération de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes de la vaccine et du transgène β-gal a également été mise en évidence (Heo et al., 2013).

Très récemment, le JX-594 a montré son efficacité à interrompre la vascularisation tumorale. En effet, Breitbach et ses collègues ont montré que les cellules endothéliales impliquées dans la néoangiogenèse tumorale sous dépendance du FGF-2, un médiateur impliqué dans la résistance aux traitements par anti-VEGF, étaient sensibles à JX-594. La voie cellulaire du VEGF-R active des médiateurs intracellulaires proches ou partagés avec la voie EGFR (ras/MAPK). Dès lors, les cellules endothéliales impliquées dans la néovascularisation permettent une réplication efficace du JX-594. Le traitement par JX-594 pourrait donc être indiqué pour des patients dont le traitement par agents anti-angigogéniques aurait échoué. Il

convient, en tous cas, de ne pas injecter de manière concomitante le JX-594 et un traitement anti-angiogénique qui perturberait la voie VEGF dont la réplication virale dépend dans les cellules endothéliales (Breitbach et al., 2013). A ce jour, JX-594 a été injecté à 160 patients atteints de cancers variés et a été correctement supporté dans la majorité des cas (Breitbach et al., 2013). L'ensemble de ces résultats fait du JX-594 l'un des virus oncolytiques les plus prometteurs.

II. La réponse immunitaire anti-tumorale

A. Les huit caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales

Les tumeurs sont des tissus complexes composés de multiples types cellulaires distincts qui interagissent les uns avec les autres. Les cellules qui forment ces tumeurs ont évolué progressivement d'un état normal vers un état néoplasique. Ce processus pathogénique peut être rationnalisé par la nécessité pour les cellules tumorales naissantes d'acquérir certains caractères liés à leur malignité. Hanahan et Weinberg proposent en 2000, le principe 'Hallmarks of cancer" comme étant les six caractéristiques fonctionnelles qui permettent aux cellules tumorales de survivre, de proliférer et de se disséminer (indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, résistance aux inhibiteurs de croissance, capacité de prolifération indéfinie / immortalisation, capacité à stimuler l'angiogenèse, capacité d'invasion des tissus et formation de métastases (Hanahan and Weinberg, 2000)). Ces fonctions peuvent être acquises à différents moments du processus de tumorigenèse. L'acquisition de ces caractéristiques est dépendante de deux phénomènes : l'instabilité génétique et l'inflammation chronique.

L'instabilité génétique des cellules tumorales génère des mutations aléatoires, des réarrangements chromosomiques, des modifications épigénétiques et l'acétylation des histones (Berdasco and Esteller, 2010). Ces mutations concernent majoritairement les gènes regroupés sous le nom de "gatekeppers and caretakers of the genome" (Kinzler and Vogelstein, 1997), littéralement les gènes qui contrôlent la prolifération cellulaire, qui prennent soin du génome et qui sont chargés de détecter et de réparer les dommages de l'ADN. Il est donc primordial pour les cellules tumorales de neutraliser les mécanismes de surveillance cellulaire qui contrôlent l'entrée en apoptose ou la sénescence des cellules présentant une accumulation de mutations. Ainsi, p53, aussi appelé "gardien du génome" (Lane, 1992), est fréquemment altéré dans les cellules tumorales ce qui permet aux cellules altérées de proliférer (Muller and Vousden, 2013).

L'inflammation chronique est, quant à elle, déclenchée par des lésions pré tumorales et tumorales. Ces lésions sont largement infiltrées par des cellules du système immunitaire qui génèrent cet environnement inflammatoire (Robinson et al., 2003; Talmadge, 2011). Cet infiltrat reflète les tentatives du système immunitaire à éradiquer la tumeur. Il est cependant clair, aujourd'hui, que l'inflammation associée au tissu tumoral a un effet paradoxal qui promeut la tumorigenèse et le développement tumoral (He et al., 2012; Moore et al., 1999). En effet, de

nombreuses cytokines, sécrétées par l'infiltrat immunitaire intra-tumoral, ont démontré leur capacité à promouvoir la progression tumorale telles que IL-4, , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, TGF-β..., notamment en muselant la réponse immunitaire adaptative (Candido and Hagemann, 2013; Zitvogel et al., 2006). D'autres médiateurs pro-inflammatoires, tels que les protéases et les eicosanoïdes, peuvent être sécrétés par la tumeur pour promouvoir sa progression, sa dissémination et sa vascularisation (Candido and Hagemann, 2013). Enfin, les cellules inflammatoires peuvent également libérer des dérivés réactifs de l'oxygène qui ont un effet mutagène sur les cellules environnantes, ce qui augmente l'instabilité génétique au sein de la lésion tumorale (Grivennikov et al., 2010).

Récemment, Hanahan et Weinberg ont réactualisé ce concept en y ajoutant deux caractéristiques supplémentaires : la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement à la destruction par le système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011). Cette dernière caractéristique est également connue sous le nom de "cancer immunoediting" que je développerai dans la section **"Immunoediting des cancers"** (Dunn et al., 2004; Zitvogel et al., 2006).

Pour comprendre la pertinence de l'utilisation d'un virus oncolytique comme agent anti-tumoral et immuno-adjuvant, il convient d'abord de définir quelles sont les interactions entre la tumeur et le système immunitaire, et quels sont les prérequis nécessaires à l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale forte et spécifique.

B. L'immunosurveillance des cancers

L'implication du système immunitaire dans le contrôle de la progression tumorale est soupçonnée depuis le début du 20ème siècle. Dès les années 1950, Burnet et Thomas proposent le concept de l'immunosurveillance des cancers. Cette théorie propose que les lymphocytes agissent comme des sentinelles qui reconnaissent et éliminent les cellules tumorales générées en permanence par l'organisme (Burnet, 1957). Cependant, l'expérimentation animale n'a pas permis, dans un premier temps, de démontrer cette hypothèse. Les modèles animaux utilisés alors comme modèles immunodéficients (RAG-/-) conservaient une immunité fonctionnelle résiduelle suffisante pour ne pas observer de différence significative de la survenue de cancer chez ces animaux par rapport aux animaux sauvages (Stutman, 1974; Stutman, 1979).

Dans les années 1990, de nouvelles données expérimentales et l'analyse d'individus présentant une immunodéficience congénitale ou acquise ressuscitent le concept d'immunosurveillance. En effet, les patients transplantés suivant un traitement immunosuppresseur pré-

sentent une fréquence de cancer supérieure aux sujets immunocompétents pour une classe d'âge donnée (Birkeland et al., 1995). Le fait que certains patients développent spontanément des réactions immunitaires innées et/ou adaptatives contre la tumeur qu'ils portent (Jager et al., 2000; Stockert et al., 1998) ou qu'il existe, dans de nombreux cas, une corrélation entre la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) et la survie des patients (Galon et al., 2006; Gooden et al., 2011) sont autant d'éléments qui soutiennent l'existence de l'immunosurveillance chez l'homme.

Ces observations ont été confirmées par des résultats obtenus de l'expérimentation chez des animaux totalement immunodéficients. Shankaran Vijay et ses collègues apportent définitivement la preuve de l'implication d'une voie dépendante de l'IFN-γ et des lymphocytes cytotoxiques dans l'immunosurveillance des cancers en 2001. En utilisant des souris déficientes pour les gènes Recombinase Activationg Gene (RAG-2) impliqués dans le réarrangement du T-Cell Receptor (TCR), pour le récepteur à l'IFN-γ (IFNGR1), pour STAT1, le facteur de transcription dédié à la régulation des voies de signalisation dépendantes de l'IFN-γ et des IFN-α/β ou double déficientes RAG2-/- x STAT1-/-, ils démontrent que la fonction antitumorale du système immunitaire est étroitement dépendante de l'action des lymphocytes T, B et NKT et que cette fonction est largement régulée par l'IFN-γ (Shankaran et al., 2001). En effet, ces souris développent, sous l'influence d'un agent carcinogène, plus de tumeurs et plus rapidement que leurs homologues sauvages et également plus de tumeurs spontanées que les souris sauvages. L'IFN-γ a la capacité d'augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales en permettant la surexpression des composants de la voie de présentation des antigènes dans le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH-I) notamment TAP-1 (Shankaran et al., 2001) et H-2Db chez la souris. L'IFN-γ a également des propriétés antiprolifératives et proapoptotiques en régulant l'expression Fas-Fas-ligand (Xu et al., 1998).

En utilisant une approche de transplantation tumorale, Shankaran V. et ses collègues démontrent également l'influence du système immunitaire sur l'immunogénicité des tumeurs formées sous l'influence d'un l'agent carcinogène : le Methylcholanthrene (MCA). Des souris sauvages 129/SvEv ou immunodéficientes (RAG-2 -/-), sont traitées avec 100µg de MCA afin d'obtenir des tumeurs dont les cellules sont récupérées dans le but d'établir les lignées correspondantes. Des cellules de chaque lignée tumorale sont injectées en sous-cutanée à des souris immunodéficientes RAG-2 -/-. Les deux types de cellules tumorales prolifèrent et induisent le développement de tumeurs chez 100% des animaux immunodéficients. Ces lignées sont également injectées à des souris sauvages. La lignée tumorale obtenu chez une souris sauvage 129/SvEv induit une tumeur chez 100% des animaux, alors que la lignée tumorale obtenue

chez la souris immunodéficiente RAG-2-/- n'induit le développement d'une tumeur que dans 50% des cas chez la souris immunocompétente. Les tumeurs générées chez l'animal immunocompétent sont donc qualitativement différentes des tumeurs développées par un animal immunodéficient. Cette observation a conduit les auteurs à formuler l'hypothèse du "cancer immunoediting" (Shankaran et al., 2001).

C. "Immunoediting des cancers"

Le "cancer immunoediting" est une réactualisation du concept de l'immunosurveillance qui tient compte à la fois de la capacité du système immunitaire à reconnaître et éliminer des cellules tumorales, et de son rôle dans la sélection de variants tumoraux sous-immunogènes. Dunn et ses collègues proposent ainsi que le cancer immunoediting se déroule en trois phases (Dunn et al., 2004).

La première phase reprend le concept de l'immunosurveillance, c'est la phase d'élimination. Le système immunitaire reconnaît et détruit totalement la tumeur en développement, grâce à l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique dirigée contre la tumeur. Cette phase d'élimination est un processus continu qui est répété à chaque fois qu'une tumeur ayant des caractéristiques antigéniques nouvelles et identifiables se développe.

Le système immunitaire applique ainsi une pression de sélection Darwinienne sur les cellules tumorales naissantes, et favorise la génération de nouvelles cellules tumorales peu immunogènes. Dès lors s'installe un équilibre dynamique dans lequel le système immunitaire, par l'action des lymphocytes et de l'IFN-γ, exerce une pression suffisante sur les cellules tumorales pour limiter leur prolifération, mais pas pour les éliminer totalement. Récemment, il a été démontré que l'immunité innée participe activement au cancer immunoediting, notamment par l'intermédiaire de Neutrophiles Associés aux Tumeurs (TAN). Sous l'influence du TGF-β produit par la tumeur, les TANs sécrétent la Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) essentielle à la progression tumorale et à la néovascularisation (Berger-Achituv et al., 2013). Les macrophages de type 1 (M1) joueraient également un rôle important dans ce phénomène de cancer immunoediting suite à leur activation par l'IFN-γ sécrété par les lymphocytes Natural Killers (NK) en l'absence d'immunité adaptative (O'Sullivan et al., 2012). Cette phase d'équilibre est de durée variable mais représente la phase la plus longue du cancer immunoediting.

Finalement les cellules tumorales peu immunogènes sélectionnées pendant la phase d'équilibre peuvent proliférer malgré la présence d'un système immunitaire fonctionnel : c'est la phase d'échappement. Les cellules tumorales ont développé la capacité d'inhiber l'action des

différents effecteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale. La perte de l'expression des molécules du CMH de classe I (Atkins et al., 2004), l'inhibition des mécanismes de lyse par le système Granzyme-B-perforine en surexprimant un inhibiteur la sérine protéase PI-9 (Medema et al., 2001), la sécrétion de TGF-β (Sanjabi and Flavell, 2010), l'expression constitutive de l'indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO) (Uyttenhove et al., 2003), qui dégrade le tryptophane indispensable à la prolifération des LT, sont autant de mécanismes impliqués dans la tolérance du système immunitaire aux tumeurs.

D. Rôles des lymphocytes T CD8+ Cytotoxiques

Les lymphocytes T CD8+ font partie des cellules effectrices de la réponse immunitaire. Cette population est caractérisée par l'expression du récepteur des cellules T (TCR) constitué de deux chaînes αβ. Ce sont des cellules cytotoxiques capables de lyser les cellules qui expriment, dans le cadre de restriction HLA de classe I du CTL, l'antigène reconnu par le TCR. Ce contact est dépendant de la molécule CD8 et initie la lyse de la cellule reconnue. Un mécanisme précoce de lyse met en jeu la sécrétion de perforine et de granzyme par le CTL activé. La perforine forme des pores dans la membrane cytoplasmique de la cellule cible, permettant ainsi l'entrée du granzyme qui induit l'apoptose en clivant des protéines pro-apoptotiques (Stinchcombe et al., 2001). Un second mécanisme met en jeu la protéine FasL sécrétée ou exprimée à la membrane du CTL. FasL se lie à son récepteur sur la cellule cible et induit l'activation du programme d'apoptose (Shresta et al., 1998). Les CTL activés peuvent également sécréter du TNF-α qui, une fois fixé sur le récepteur exprimé par les cellules tumorales, induit l'apoptose (Andersen et al., 2006). Les CTL activés sécrètent également de l'IFN-γ, une cytokine qui sensibilise la cellule cible à la lyse par le CTL en augmentant la présentation des antigènes dans les molécules HLA-I ainsi que l'expression du récepteur Fas qui pourra être engagé par le CTL et conduire à l'apoptose de la cellule cible (Andersen et al., 2006).

L'infiltration dans la tumeur de lymphocytes T cytotoxiques est associée à un bon pronostic (Galon et al., 2006). Cette observation suggère que les CTL jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire anti-tumorale. La possibilité de transférer l'immunité anti-tumorale d'un individu à un autre a été démontrée dès 1972 chez la souris par transfert "adoptif" de cellules T d'une souris immunisée vers une souris naïve, ainsi protégée contre l'établissement d'une tumeur (Rouse et al., 1972). Chez l'homme, ces lymphocytes T spécifiques reconnaissant les cellules tumorales ont notamment été décrits chez des patients atteints de mélanome (Knuth et al., 1984). Une fois isolés, ces CTL peuvent proliférer et lyser la lignée de cellules

tumorales autologues et les lignées tumorales allogéniques qui expriment l'antigène reconnu dans la restriction HLA de classe I du CTL. Ces découvertes ont conduit au développement de stratégies thérapeutiques de "transfert adoptif" consistant en l'injection à des patients de grandes quantités de CTL autologues ou allogéniques reconnaissant les cellules tumorales, et amplifiés *ex vivo*. Les CTL injectés peuvent être monoclonaux ou polyclonaux (Zhou and Levitsky, 2012). En général, des injections d'interleukine 2 (IL-2) sont réalisées pour améliorer la survie des cellules injectées (Rosenberg et al., 1994). La découverte des antigènes de tumeurs a permis la sélection puis l'amplification de CTL monoclonaux reconnaissant un antigène de tumeur spécifique.

E. Les antigènes de tumeur

Il existe deux catégories d'antigènes de tumeur : les antigènes uniques et les antigènes partagés. Aujourd'hui, un grand nombre de ces antigènes (épitopes et restrictions HLA) est répertorié dans la base de données (http://www.cancerimmunity.org).

Les antigènes uniques résultent d'une mutation ponctuelle qui affecte généralement la séquence codante d'une protéine. Cette mutation est généralement unique et son expression est restreinte à un patient. Parfois, cette mutation est partagée par un petit groupe de patients comme dans les cas de la mutation N-RAS Q61R (Linard et al., 2002).

Les antigènes de tumeur partagés peuvent être subdivisés en trois catégories : les "Cancer Testis Antigens" (CTA), les antigènes de différenciation et les antigènes surexprimés.

Les CTA sont exprimés uniquement dans les cellules tumorales. Les seules cellules saines qui expriment ces CTA sont les cellules du placenta et de la lignée germinale (Scanlan et al., 2004). Ces cellules bénéficient d'un statut immuno-privilégié et n'expriment pas de HLA de classe I. Le développement d'une réaction immunitaire contre ces antigènes ne provoquera donc pas la destruction des tissus sains. Des réponses spontanées lymphocytaires et humorales contre ces antigènes ont été observées chez des patients (Caballero and Chen, 2009). Les antigènes MAGE, BAGE, XAGE et LAGE (dont LAGE-2 ou NY-ESO-1) appartiennent à cette famille (http://www.cancerimmunity.org). NY-ESO-1 est un des CTA les plus étudiés. Il a été découvert à New York en 1997 par Chen et ses collaborateurs, à partir des cellules tumorales d'un patient atteint d'un cancer de l'œsophage, grâce à sa capacité à générer une réponse anticorps spontanée chez ce patient. Ce CTA est codé par le gène CTAG1 porté par le chromosome X (Xq28) (Chen et al., 1997). Sa fonction biologique dans les cellules germinales n'est pas connue. NY-ESO-1 est exprimé notamment dans 40% des mélanomes,

25% des cancers du poumon non à petites cellules et de manière remarquable dans 80% des sarcomes synoviaux (Gnjatic et al., 2006). Des réponses LT CD8+ spontanées ont été mises en évidence, reconnaissant majoritairement des épitopes contenus dans la partie centrale de la protéine, notamment l'épitope 157-165 reconnu dans le contexte HLA-A*0201 (Jager et al., 1998).

Les antigènes de différenciation sont exprimés par les cellules tumorales et le tissu sain dont la tumeur est issue. C'est le cas des antigènes Tyrosinase et MART-1/MELAN-A exprimés par les mélanocytes sains et les cellules de mélanomes. Générer une réaction immunitaire contre ces antigènes peut conduire au développement de réactions auto-immunes (http://www.cancerimmunity.org).

Les antigènes surexprimés sont exprimés par de nombreux tissus sains mais sont surexprimés par les cellules tumorales. Dans cette famille on retrouve notamment les antigènes CEA, MUC1, Her-2/neu, EpCAM, MMP-2, p53 (http://www.cancerimmunity.org).

Le transfert adoptif de lymphocytes T a montré des résultats encourageants ces dernières années mais reste une procédure lourde (Chouaib et al., 2006; Dudley et al., 2002; Mackensen et al., 2006). D'autres stratégies d'immunothérapie développent la possibilité d'utiliser les propriétés des cellules dendritiques pour stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique et durable, puisque ces cellules jouent un rôle clé dans l'initiation des réponses lymphocytaires.

III. Les cellules dendritiques (DC)

A. Découvertes et généralités

Ralph Steinman présente dès 1973 une série de publications dans le "Journal of Experimental Medicine" dédiées à la description du phénotype et des fonctions d'une nouvelle population cellulaire isolée initialement de rates de souris (Steinman et al., 1975; Steinman and Cohn, 1973; Steinman and Cohn, 1974; Steinman et al., 1974). Le prix Nobel de médecine ou physiologie lui sera décerné pour cette découverte en 2011. Ces cellules, qui diffèrent des granulocytes, lymphocytes et phagocytes mononuclées, présentent un cytoplasme large et ont la particularité de présenter des pseudopodes de taille et de nombre variables. Les auteurs ont mis en évidence dans cette population des cellules présentant des morphologies variées allant de la cellule allongée avec deux pôles distincts, à la cellule présentant de multiples dendrites ayant un aspect proche de celui d'un neurone **(Figure 5)**. Le nom retenu pour caractériser cette nouvelle population sera donc celui de cellule dendritique (DC) (Steinman and Cohn, 1973). Lors de leurs premières observations, Steinman et ses collègues décrivent les DC comme ayant une faible capacité d'endocytose (Steinman and Cohn, 1973), n'étant pas des cellules souches ou des précurseurs des érythrocytes ou des cellules myéloïdes et ne retenant ni les antigènes, ni les complexes immuns à leur surface (Steinman and Cohn, 1974).

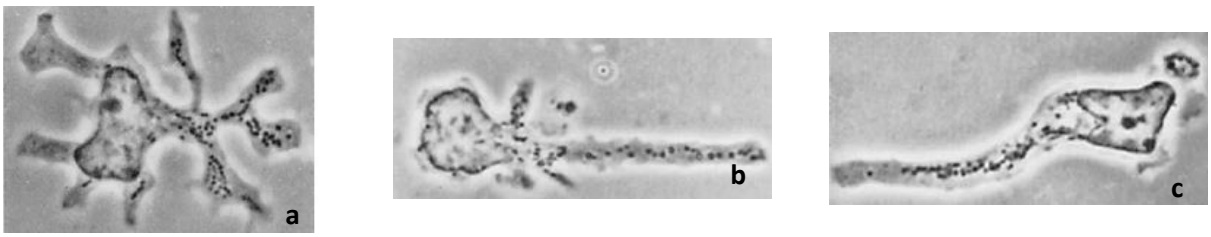


Figure 5 : Cellules dendritiques isolées de rate de souris observées par Steinman et ses collaborateurs en microscopie à contraste de phase, (a) d'un ganglion lymphatique cervical (b) et des plaques de Peyer (c) (Steinman and Cohn, 1973).

Les DC représentent une population distincte de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Présentes dans tous les tissus sous forme immature, elles opèrent le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et ont pour fonction principale de maintenir la tolérance ou de déclencher la réponse immunitaire. La capacité des DC à induire la tolérance immunitaire ou à activer la réponse immunitaire dépend essentiellement de leur état de maturation. Ce modèle simplifié admet qu'en absence d'infection ou de signaux de danger, les DC sont dans un état immature et présentent les antigènes du "soi" aux Lymphocytes T (signal 1) en l'absence des molécules de costimulation, ce qui a pour conséquence l'apoptose ou l'anergie des LT ou

leur différenciation en LT régulateurs (LTreg). Les DC immatures participent ainsi au phénomène de tolérance périphérique (Dhodapkar et al., 2001; Roncarolo et al., 2001; Steinman et al., 2000). En situation de danger, les DC sont capables, grâce à l'expression d'un répertoire de récepteurs conservés : les "Pathogen Recognition Receptors" (PRR), d'intégrer les signaux moléculaires relatifs à ce danger. L'activation des PRR a pour conséquence la migration des DC vers les ganglions lymphatiques drainant et l'activation de leur programme de maturation. Ceci leur permet aussi d'exprimer les molécules de costimulation et les cytokines nécessaires à la présentation efficace des antigènes conduisant à l'activation des LT naïfs. Les DC matures sont alors capables de délivrer de manière concomitante les signaux 1 et 2 d'activation nécessaires aux LT naïfs : liaison au récepteur T (TCR) et signal de costimulation. Les DC présentent des capacités remarquables de présentation des antigènes aux lymphocytes T CD8+ dans le contexte des molécules HLA de classe I et aux Lymphocytes T CD4+ dans le contexte HLA de classe II. Ce sont également les seules CPA capables d'activer des lymphocytes naïfs. Ces propriétés fonctionnelles font des DC une cible prioritaire des stratégies vaccinales et d'immunothérapie anti-tumorale (Vulink et al., 2008).

B. "Pathogen Associated Molecular Patterns" (PAMP)

Les PAMP sont des motifs moléculaires conservés entre les pathogènes, et reconnus par les "Pathogen Recognition Receptors" (PRR). Les PAMP constituent le signal 0, défini par Charles Janeway et qui précède les signaux 1, 2 et 3 nécessaires à l'activation de la réponse immunitaire adaptative (Janeway, 1989). Ce signal est nécessaire à l'activation de la réponse immunitaire innée, et notamment à la maturation des DC qui opèrent le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les PAMP sont majoritairement représentés par les ARN et ADN viraux simple ou double brins riches en îlots CpG non méthylés, l'ADN bactérien et d'autres composants bactériens comme les lipopolysaccharides (composant de la paroi des bactéries Gram négatives), les diacyl ou triacyl lipopeptides, la flagelline ou encore certains constituants des champignons (Doughty, 2011).

C. "Pathogen Recognition Receptors" (PRR)

La reconnaissance du danger lié à l'intrusion d'un pathogène (PAMP) est réalisée par une série de récepteurs exprimés par les cellules de l'immunité innée, et notamment par les cellules dendritiques : les PRR. Ces récepteurs peuvent être classés en fonction de leurs propriétés : signalisation et endocytose. Ainsi, les PRR de signalisation sont représentés par les "Toll-Like Receptors" (TLR), "RIG-I Like Receptors" (RLR) et les "NOD-Like Receptors" (NLR) et les PRR d'endocytose sont représentés par les "C-Type Lectin Recepetors" (CLR) et les "Scavenger Receptor" (SR).

i. *Les PRR de signalisation*

Dix membres de la famille des TLR ont été identifiés chez l'homme. Les TLR reconnaissent notamment des motifs moléculaires associés aux virus et aux bactéries, dans le domaine extracellulaire et dans les compartiments endo-lysosomaux. Leurs fonctions sont plus largement décrites dans la section **"Les Toll-Like Receptor (TLR) humains"**.

La famille des RLR comprend trois membres : RIG-I, MDA-5 et LGP2 qui participent à la reconnaissance des ARN viraux présents dans le cytoplasme des cellules infectées. RIG-I et MDA-5 contiennent un domaine "DExD/H box RNA helicase" qui leur permet de fixer les ARN et un domaine "Caspase activation and recruitment domain" (CARD) essentiel pour la transduction du signal. L'engagement des RLR conduit à l'activation des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF-κB aboutissant à la synthèse d'IFN-β et de cytokines pro-inflammatoires. LGP2 est capable de fixer les ARN viraux mais ne contient pas de domaine CARD. Son rôle exact n'est pas déterminé mais il pourrait agir comme un régulateur négatif de RIG-I et MDA-5 par compétition, en captant les ARN sans induire de signalisation en aval (Doughty, 2011).

Les NLR sont des protéines cytoplasmiques impliquées dans la reconnaissance de PAMP bactériens et viraux. Chez l'homme, 23 gènes codent pour des protéines de la famille NLR. Les NLR peuvent être subdivisés en 2 catégories : les récepteurs de type NOD et les récepteurs de type NALP. Les récepteurs NOD sont spécialisés dans la reconnaissance des peptidoglycanes des bactéries Gram négatives (NOD1) et des dipeptides muramyl, constituants des bactéries Gram négatives et positives (NOD2). La reconnaissance des PAMP par les récepteurs de type NALP conduit à l'activation de l'inflammasome qui permet l'activation

de la caspase 1 responsable de la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, IL-18 et IL-33 (Kawai and Akira, 2009).

ii. *Les PRR d'endocytose*

Les récepteurs de type lectine-C (CLR) sont spécialisés dans la reconnaissance des motifs glycosylés des antigènes de manière dépendante au Calcium grâce à l'expression d'un ou de plusieurs domaines "carbohydrate recognition domain" (CRD) (Figdor et al., 2002). Deux groupes de CLR peuvent être distingués en fonction de l'orientation de la protéine lorsqu'elle est insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Les CLR du groupe I sont des protéines transmembranaires de type I. Elle possèdent un seul domaine transmembranaire, et leur extrémité N-Terminale est exposée du côté extracellulaire de la membrane plasmique. Les CLR du groupe II sont des protéines transmembranaires de type II. Elle possèdent un seul domaine transmembranaire, et leur extrémité N-Terminale est exposée du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire. Le groupe des CLR de type I comprend le "Macrophage Manose Receptor" et DEC-205. Le group des CLR de type II comprennent DC-SIGN, la Langerine, DCIR, CLEC1, Dectin-1, Dectin-2, DLEC mais aussi BDCA2. Les domaines intracytoplasmiques des CLR sont diverses et contiennent des motifs conservés important pour l'internalisation des antigènes (di-leucine, tri-acide ou des motifs tyrosine), c'est le cas du MMR, de DEC-205 ou DC-SIGN. D'autres CLR contiennent des motifs permettant la transduction de signaux. Les récepteurs de type DCIR contiennent un motif inhibiteur (ITIM) alors que les récepteurs de type Dectine-1 contiennent un motif activateur (ITAM).

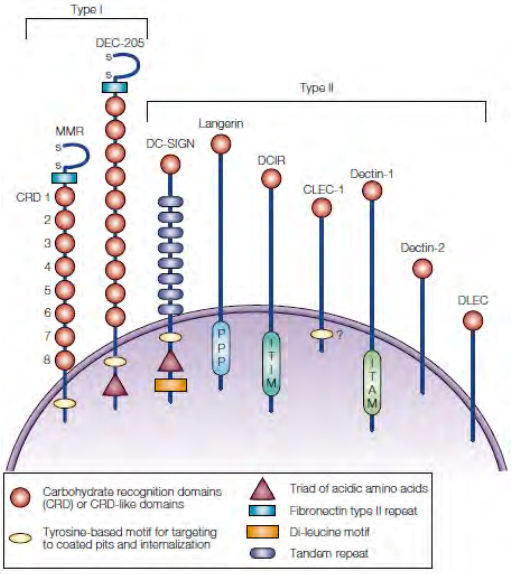


Figure 6 : Deux types de récepteurs de type lectine-C sont exprimés par les cellules dendritiques (Figdor et al., 2002) (CLEC-1) C-type lectin receptor 1 ; (DCIR) dendritic cell

immunoreceptor ; (DC-SIGN) dendritic-cell specific (ICAM-3) grabbing non-integrin ; (DLEC) dendritic cell lectin ; (ITAM) immunoreceptor tyrosine-based activation motif ; (ITIM) immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif ; (MMR) macrophage mannose receptor.

Les scavenger receptor (SR) reconnaissent et internalisent des lipides, des séquence ADN contenant des motifs CpG, des macromolécules et des lipoprotéines de faible densité (LDL) modifiées par oxydation ou acétylation. Il en existe plusieurs SR dont SR-A l/ll, SR-B (CD36), et Lox-1 (Doughty, 2011). En condition de stress, les cellules produisent des protéines chaperonnes qui aident les protéines néosynthétisées à acquérir leur conformation tridimensionnelle. Yves Delneste et Pascale Jeannin ont démontré qu'une de ces protéines chaperonnes (HSP70) est reconnue de manière spécifique par le récepteur scavenger Lox-1 (Delneste et al., 2002). La protéine chaperonne HSP70 permet ainsi aux peptides auxquels elle est associée d'être captés par les DC puis adressés dans la voie de présentation croisée.

D. La théorie du danger

Initialement, la reconnaissance du "non-soi" définissait le critère d'activation du système immunitaire. Cependant, sous différentes conditions, cette reconnaissance binaire par le système immunitaire du "soi" et du "non-soi" ne suffit pas à expliquer les modalités de son activation. Le système immunitaire peut s'activer contre des antigène du "soi" ; c'est le cas des maladies auto-immunes ou, à contrario, "tolérer" la présence de microorganismes ; c'est le cas de la flore commensale du tractus digestif. Un modèle plus complexe sous-tend l'activation du système immunitaire. En 1994, Polly Matzinger remet en cause le postulat selon lequel la reconnaissance du "non-soi" est le fondement de la réponse immunitaire et propose le modèle des signaux de danger (Matzinger, 1994). Elle propose ainsi que les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les DC, reconnaissent des signaux de danger produits par les cellules mourantes ayant subi un stress. Elle oppose à cette mort associée aux signaux de danger la mort cellulaire programmée : l'apoptose, qui n'est pas source de signaux de danger. Polly Matzinger développe l'idée que la réponse immunitaire orchestrée par les LT ne survient pas uniquement parce que ces Lymphocytes ont subi une sélection thymique néonatale qui a permis une définition du "soi", ni parce qu'ils seraient capables de reconnaître activement les pathogènes, mais qu'elle serait modulée par la réponse adaptée des cellules présentatrices d'antigènes aux signaux de danger, provenant de cellules mourantes ou infectées de leur envi-

ronnement, qu'elles intègrent en permanence. Cette théorie a conduit à l'identification de différentes formes de morts cellulaires immunogènes.

E. Mort cellulaire immunogène et "Damage Associated Molecular Patterns"

Dépendant du stimulus qui l'initie, la mort cellulaire peut être considérée comme immunogène, silencieuse ou tolérogène. La condition qui régit l'immunogénicité de la mort cellulaire est la libération concomitante de signaux de danger et d'antigènes. La mort cellulaire immunogène (MCI) implique des modifications dans la composition de la surface cellulaire ainsi que la libération de médiateurs solubles. L'ensemble de ces signaux est intégré par les PRR exprimés par les DC et stimule leurs propriétés de présentation des antigènes (Kroemer et al., 2013).

L'immunogénicité de la mort cellulaire est souvent associée au processus de nécrose provoqué par un traumatisme ou un dommage cellulaire induit par un agent chimique. La nécrose est caractérisée par une augmentation du volume cellulaire et la perte de l'intégrité de la membrane cytoplasmique, provoquant la libération d'une partie du contenu cellulaire. Certaines des molécules libérées par la cellule nécrotique peuvent être reconnues comme des signaux de danger par les cellules de l'immunité innée, notamment les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages, et induire l'inflammation.

La mort cellulaire par apoptose est caractérisée par la contraction du volume cellulaire, la condensation de la chromatine, la destruction du noyau puis la formation de corps apoptotiques. Classiquement, ce mode de mort cellulaire est considéré comme non immunogène, voir tolérogène, car il survient de façon contrôlé par le programme génétique et implique l'élimination rapide des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires, sans libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire. Cependant, l'apoptose peut, sous certaines conditions, recouvrir un caractère immunogène.

La MCI est caractérisée par les trois éléments suivants : 1) l'expression membranaire de calréticuline (CRT), une protéine du réticulum endoplasmique (RE) exposée à la membrane plasmique et qui constitue ainsi un signal de phagocytose ("eat me signal") pour les DC qui expriment son récepteur, la molécule CD91 (Gardai et al., 2005) ; 2) la libération de molécules d'ATP dans le milieu extracellulaire ce qui implique que la cellule possède des capacités d'autophagie (Michaud et al., 2011). En agissant sur le récepteur purinergique P_2X_7 exprimé par les DC, l'ATP induit l'activation d'un PRR de la famille des "NOD-Like Receptor" (NLRP3) conduisant à la formation de l'inflammasome responsable de la sécrétion d'IL-1β qui

favorise à son tour l'activation de lymphocytes T cytotoxiques anti-tumoraux (Ghiringhelli et al., 2009) ; 3) la libération dans le milieu extracellulaire de la protéine "high mobility group box 1" (HMGB-1), une protéine nucléaire non-histone associée à l'ADN (Kroemer et al., 2013). Les fonctions immuno-adjuvantes d'HMGB1 dépendent essentiellement de son interaction avec le TLR4 exprimé par les DC en augmentant l'expression de la pro-IL1β et en optimisant la présentation des antigènes en prévenant leur dégradation lysosomale (Apetoh et al., 2007). L'ensemble des signaux de danger qui caractérise le processus de MCI est regroupé sous l'appellation "Damage Associated Molecular Patterns" (DAMP).

En plus de ces signaux fondamentaux, les cellules mourantes et stressées peuvent libérer une collection de DAMP qui vont agir comme des adjuvants sur les cellules de l'immunité innée (**Tableau 2)** (Krysko et al., 2012). Par exemple, les protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins - HSP), qui participent en temps normal à la bonne conformation des protéines néo synthétisées, peuvent induire la maturation de cellules présentatrices d'antigènes optimisant ainsi leur capacité à moduler la réponse immunitaire, en sécrétant les cytokines appropriées (Srivastava, 2002). Les HSP libérées dans le milieu extracellulaire, lors de la mort cellulaire immunogène, facilitent l'adressage de peptides qu'elles contiennent dans les voies de présentations croisées des antigènes, en se fixant sur les récepteurs appropriés des cellules présentatrices d'antigènes (Delneste et al., 2002; Li et al., 2002)

Il est aujourd'hui évident que les DAMP libérés par les cellules subissant une MCI agissent comme des adjuvants responsables de l'activation la réponse immunitaire. Dès lors, de nombreuses stratégies anti-tumorales ont pour objectif l'induction d'une MCI dans le but de participer au rejet de la tumeur. Ainsi des cellules tumorales traitées *in vitro* par certaines chimiothérapies (anthracycline) puis implantées chez des souris syngéniques immunocompétentes ont permis de protéger ces animaux contre l'établissement d'une tumeur suite à la réinjection de cellules tumorales, vivantes cette fois-ci (Obeid et al., 2007). Aujourd'hui de nombreuses molécules sont répertoriées comme inducteur de mort cellulaire immunogène notamment la doxorubicine, l'oxaliplatine, la cyclophosphamide, le Bortezomib, les glycosides cardiaques, la Mitoxantrone,... mais également les UV-C, les irradiations γ et certains virus oncolytiques (Kroemer et al., 2013; Krysko et al., 2012). Les inducteurs de MCI partagent tous la propriété d'induire de manière concomitante la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et un stress du réticulum endoplasmique (RE). Ces conditions sont également regroupées lors des infections virales. La production de ROS perturbe l'homéostasie du RE et conduit à l'activation de la voie "Unfolded Protein Response" (UPR) qui, si le stress est trop important, aboutit à l'activation des mécanismes de l'apoptose mitochondriale (Krysko et al.,

2012). Ainsi, le virus oncolytique de la rougeole a démontré sa capacité à induire l'expression de différents DAMP tels que l'IL-6, HMGB1, la CRT, HSP70 et GP96 (Donnelly et al., 2013; Gauvrit et al., 2008).

Plusieurs observations récentes ont mis en évidence, chez l'Homme, le bénéfice d'induire une mort cellulaire immunogène dans le cadre de thérapies anticancéreuses par anthracyclines.

Il existe un polymorphisme du gène codant pour le récepteur purinergique P2X7 humain. La mutation (Glu496Ala) (~30% de la population caucasienne) est associée à une diminution de liaison à l'ATP et à une diminution de la sécrétion d'IL-1β par les monocytes humains (Sluyter et al., 2004). Une étude sur la survie sans progression de patientes porteuses de cancers du sein non métastatiques et traitées par anthracyclines a été réalisée et analysée en fonction de leur génotype P2X7. La survenue de métastases chez les patientes présentant la mutation (Glu496Ala) est significativement plus élevée que chez les patientes ne présentant pas cette mutation (Ghiringhelli et al., 2009). Ces résultats mettent en évidence le rôle bénéfique de libération d'ATP sur l'efficacité des traitements anticancéreux.

Il existe également un polymorphisme sur le gène codant le TLR4 (le récepteur d'HMGB1), notamment la substitution Asp299Gly (fréquence ~ 17.1%) qui affecte son domaine extracellulaire et diminue son affinité pour HMGB1. Une étude rétrospective a été réalisée sur une cohorte de 280 patientes atteintes de cancer du sein avec envahissement des ganglions lymphatiques et traitées par radiothérapie et chimiothérapie par anthracyclines. La survie sans métastase des femmes porteuses de la substitution Asp299Gly est significativement plus faible chez les patientes non mutées. Cette mutation du TLR4 a ainsi pu être identifiée comme un facteur prédictif du succès thérapeutique d'un traitement à base d'anthracyclines (Apetoh et al., 2007).

Ces études mettent en lumière le rôle bénéfique de la mort cellulaire immunogène dans la réponse aux traitements anticancéreux chez l'homme.

Tableau 2 : DAMP associés au processus de MCI et leurs fonctions (Krysko et al., 2012).

DAMP	Récepteur	Mort cellulaire	Fonctions
ATP	P_2X_7	Nécrose Apoptose immunogène	Induit l'activation de l'inflammasome dans les DC ce qui conduit à la sécrétion des cytokines IL-1β et IL-18.
Calréticuline	CD91	Nécrose secondaire Apoptose immunogène	Agit comme un signal de phagocytose "eat-me". La CRT est un médiateur crucial pour l'immunogénicité des cellules tumorales (Obeid et al., 2007).
F-actine	CLEC9A	Nécrose Nécrose secondaire	Aide à la reconnaissance des cellules mourrantes par les DC CD141+
Heat Shock Protein (HSP)	CD91, Lox1 TLR2/TLR4	Nécrose Apoptose Immunogène	Chimioattractant pour les monocytes et les neutrophiles. Active les cellules NK et les DC.
HMGB1	TLR2/TLR4 RAGE	Nécrose Apoptose Autophagie	Agit comme agent chimioattractant et de maturation sur les DC.
IL-1α	IL-1R	Nécrose	Cytokine pro-inflammatoire
IL-33	ST2	Nécrose	Agit sur les macrophage et LTH_2 en favorisant la sécrétion de cytokine pro-inflammatoires
IL-6	IL-6R et GP130	Nécroptose	Cytokine pro-inflammatoire
Monosodium Urate	Inconnu	Nécrose	Cristaux d'acide urique. Induit la maturation des DC et chimioattractant pour les neutrophiles.

F. Les Toll-Like Receptor (TLR) humains

Les TLR sont probablement les PRR les plus étudiés depuis la découverte de l'implication du récepteur Toll dans l'immunité anti-fongique chez la mouche Drosophile par l'équipe du prix Nobel 2011, le Pr. Jules Hoffmann en 1996 (Lemaitre et al., 1996), puis de son homologue chez l'homme nommé "Toll-Like Receptor" (TLR) (Rock et al., 1998). Les TLR constituent une famille de protéines transmembranaires phylogénétiquement conservées, caractérisées par un domaine extracellulaire comprenant des motifs Leucin Rich Repeat (LRR), qui jouent un rôle majeur dans la reconnaissance des agents pathogènes et un domaine intracellulaire de type Toll/IL-1R homology domain (TIR) responsable de la transduction du signal (Kawai and Akira, 2010). Treize membres de la famille des TLR ont été identifiés chez les

mammifères dont 10 chez l'homme. Les TLR1 à 9 sont exprimés chez l'homme et la souris. Chez la souris, le TLR10 est non fonctionnel et chez l'homme les TLR11, TLR12 et TLR13 ont été éliminés du génome (Kumar et al., 2011). Les TLR sont impliqués dans la reconnaissance des DAMP et reconnaissent également une grande variété de PAMP de natures différentes tels que des protéines, des lipoprotéines, des lipides et des acides nucléiques dérivés de virus, de parasites, de champignons ou de bactéries **(Tableau 3)** (Akira et al., 2006). Ils peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur localisation cellulaire. Les TLR exprimés à la surface de la membrane plasmique (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10) qui reconnaissent majoritairement les composants de surface des micro-organismes pathogènes et les TLR exprimés dans le compartiment intracellulaire endo/lysosomal (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) qui reconnaissent spécifiquement les acides nucléiques de ces micro-organismes (Kawai and Akira, 2010).

i. *Les TLR de surface*

Le TLR4 est un des membres les plus connus des TLR de surface. Complexé avec la molécule accessoire MD2, il est le senseur principal du lipopolysaccharide (LPS) composant de la paroi des bactéries Gram négatives. Le complexe TLR4/MD2 forme une poche hydrophobe capable d'interagir avec les lipides du LPS. Le LPS est délivré à ce complexe grâce à l'intervention de deux autres molécules : le CD14, associé avec la "LPS Binding Protein" (LBP) qui lie le LPS pour faciliter son chargement sur le complexe TLR4/MD2. Le complexe résultant TLR4/MD2/LPS recrute une molécule adaptatrice intracellulaire permettant la transduction du signal (Akashi-Takamura and Miyake, 2008).

Le TLR2 est impliqué dans la reconnaissance d'une large gamme de PAMP, notamment les lipopeptides et l'acide lipoteichoïque des bactéries Gram positives, le zymozan des champignons et l'hémagglutinine du virus de la rougeole (Akira et al., 2006). Le TLR2 peut former des hétérodimères, majoritairement avec TLR1 ou TLR6, pour augmenter l'affinité de la reconnaissance de certains PAMPs. L'hétérodimère TLR1/TLR2 est impliqué dans la reconnaissance des triacyl-lipopeptides des bactéries Gram négatives et l'hétérodimère TLR6/TLR2 reconnaît spécifiquement les diacyl-lipopeptides des bactéries Gram positives et des mycoplasmes.

En plus d'être sensibles à toute une variété de molécules issues du "non-soi", les TLR sont également impliqués dans la reconnaissance de motifs moléculaires du "soi" que j'ai décrit précédemment (DAMP) **(Tableau 3)**.

Tableau 3 : : Les motifs moléculaires du "non-soi" (PAMP) et du "soi" (DAMP) reconnus par les TLR. D'après (Akira et al., 2006; Kumar et al., 2011; Rosin and Okusa, 2011)

Ligands	TLR
Damage Associated Molecular Patterns	
HMGB1	TLR2/TLR4
Protéines S100	TLR4
Heat Shock Protein	TLR2/TLR4
Cristaux d'acide Urique	TLR2/TLR4
Défencines	TLR4
Protéines de la matrice extracellulaire: • **Hyaluronan** • **Biglycan**	TLR2/TLR4
Fibrinogen	TLR4
Histone	TLR9
Pathogen Associated Molecular Patterns	
D'origine Bactérienne:	
LPS	TLR4
Diacyl Lipopeptides	TLR6/TLR2
Triacyl Lipopeptides	TLR6/TLR1
Flagellin	TLR5
ADN (CpG npn méthylé)	TLR9
D'origine Fongique:	
Zymozan	TLR6/TLR2
D'origine Virale:	
ADN	TLR9
ARN double brin *(génomique et intermédiaires réplicatifs)*	TLR3
ARN simple brin	TLR7/TLR8
Hémagglutinine *(Virus de la Rougeole)*	TLR2

ii. *Les TLR intracellulaires*

Le TLR3 a initialement été décrit pour sa capacité à détecter un analogue structural d'un ARN viral double brin : l'acide polyinosinic-cytidylic (Poly(I:C)). La liaison de l'ARN double brin au domaine extracellulaire du TLR3 augmente sa stabilité, permettant la formation d'un homodimère. Ainsi, le TLR3 est capable de reconnaître l'ARN génomique du Réovi-

rus, mais également les ARN double brins des intermédiaires réplicatifs d'autres virus, comme le virus de la rougeole, le virus respiratoire syncitial ou certains petits ARN interférants (Akira et al., 2006). L'activation du TLR3 déclenche une réponse immunitaire antivirale régulée par la production d'interférons de type I et de cytokines inflammatoires. Il a d'ailleurs été observé qu'un défaut d'expression de TLR3 chez l'homme augmentait la susceptibilité à certaines affections virales notamment l'infection par le virus Herpes Simplex 1 (HSV-1) (Zhang et al., 2007).

Le TLR7 humain peut être spécifiquement activé par l'Imiquimod (R-837) ou par le resiquimod (R-848) qui active également le TLR8 (Gorden et al., 2005). De manière générale, le TLR7 est décrit comme ayant la capacité à détecter les ARN simple brin viraux (Virus de l'Immunodéficience Humain, Virus Influenza, ...) (Beignon et al., 2005; Hemmi et al., 2002; Wei et al., 2010). Le TLR8 est phylogénétiquement très proche du TLR7 et est activé également par les ARN viraux simple brin et le R-848 (Kawai and Akira, 2010), mais pas par le R-837.

Le TLR9 reconnaît le motif CpG non méthylé (2'-désoxyribo-cytidine-phosphate-guanosine) fréquent dans l'ADN bactérien et viral et rare dans l'ADN des mammifères. Les Oligo-Désoxy-Nucléotides (ODN) agissent comme des ligands synthétiques du TLR9. Le TLR9 permet la détection des infections virales et est principalement exprimé, chez l'homme, par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Hemont et al., 2013; Kadowaki et al., 2001) et les lymphocytes B (Bourke et al., 2003).

Les TLR7 et TLR9 sont initialement localisés dans la lumière du réticulum endoplasmique, puis exportés vers le compartiment endosomal sous le contrôle de la protéine UNC93B1 (Kim et al., 2008). L'activation des TLR7 et TLR9 requiert ensuite la présence d'acide nucléique et l'acidification de l'endosome.

iii. *Deux voies principales de signalisation régulées par les TLR*

Les voies de signalisation régulées par les TLR peuvent être subdivisées en deux grandes catégories : la voie dépendante de MyD88 responsable de l'induction des cytokines pro-inflammatoires et la voie dépendante de l'adaptateur TRIF, qui permet la synthèse d'IFN de type I.

1. *La voie "Myeloid differentiation primary response gene (88)" (MYD88)*

Le recrutement de l'adaptateur MyD88 par le domaine TIR du TLR induit l'activation en cascade de la voie des MAP kinases (MAPK) et aboutit à une forte activation du facteur de transcription NF-κB. L'activation de NF-κB a pour conséquence la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-12p40 (Yamamoto et al., 2004). Dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, l'activation des TLR7 et TLR9 conduit à la synthèse de grandes quantités d'IFN de type I. Les pDC expriment de manière constitutive le facteur de transcription "Interferon Regulatory Factor 7" (IRF7), qui est recruté par l'adaptateur MyD88 suite à l'engagement du TLR. L'activation d'IRF7 requiert sa phosphorylation par le complexe TRAF3/ IKKα/IRAK1 (Kawai and Akira, 2008).

2. *La voie "TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β" (TRIF)*

Elle concerne le TLR3 dont c'est la seule voie de transduction du signal et le TLR4, capable de recruter à la fois la voie MyD88 et la voie TRIF. Le recrutement de TRIF aboutit à l'activation du facteur de transcription IRF3, ce qui a pour conséquence la production d'interféron de type I (IFN-β) (Fitzgerald et al., 2003). Dans le cas du TLR4, l'activation de la voie TRIF peut également induire l'activation du facteur de transcription NF-κB par l'intermédiaire de l'activation de TAK1 (Chang et al., 2009).

G. Les populations de DC humaines

Chez l'homme il existe plusieurs populations de DC qui présentent chacune la capacité d'intégrer des signaux de danger différents grâce à l'expression d'une collection spécifique de PRR et particulièrement de TLR. La complexité des différentes sous-populations de DC et leurs propriétés individuelles ne sont pas encore totalement établies chez l'homme du fait de leur rareté (~ 1% des PBMC). Si l'origine, la différenciation et les propriétés fonctionnelles des DC murines ont été intensivement étudiées (Merad et al., 2013), les données concernant leurs homologues humaines sont moins abondantes et la comparaison directe entre les deux espèces n'est pas toujours évidente.

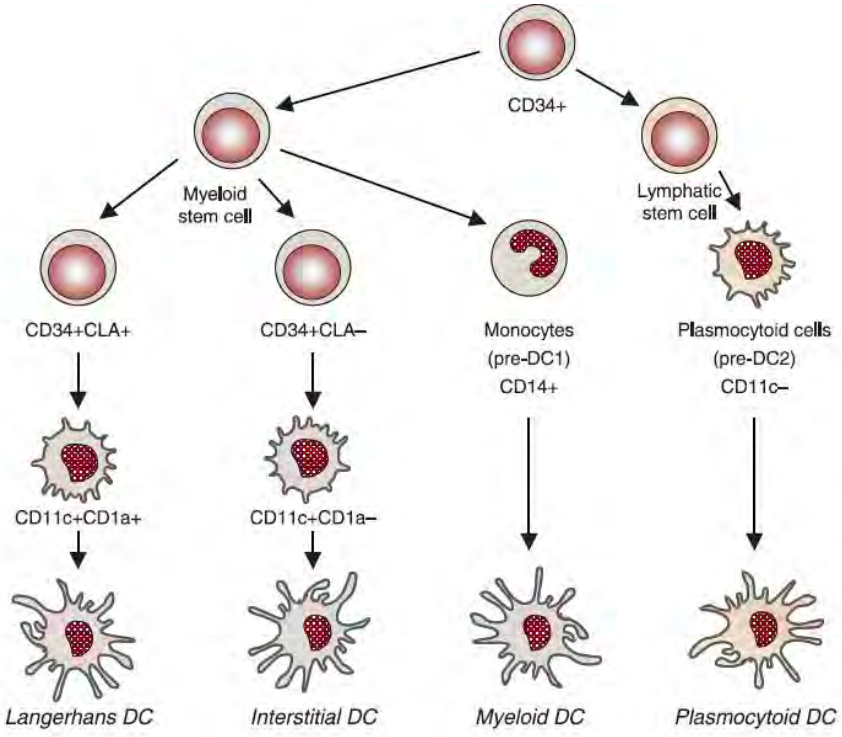


Figure 7 : Populations des cellules dendritiques chez l'homme. D'après (Schott, 2006). Il existe deux voies principales de différenciation des DC : la lignée myéloïde dont dérive les cellules de Langehrans retrouvées dans les épithélium stratifiés, les cellules dendritiques interstitielles retrouvées dans les autres tissus et les DC myéloïdes circulantes, et la lignée lymphoïde à partir de laquelle se différencieraient les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Liu, 2001). Toutefois il a été démontré, chez la souris, que les pDC peuvent également dériver d'un progéniteur de la lignée myéloïde (Shigematsu et al., 2004).

Les DC circulantes humaines sont décrites comme exprimant fortement les molécules de classe II du CMH et particulièrement le "Human Leukocyte Antigen" HLA-DR, et n'exprimant pas les marqueurs CD3 (Lymphocytes T), CD14 (monocytes), CD19/20 (Lymphocytes B), CD56 (Lymphocytes Natural Killer (NK)), la glycophorine-A (globules rouges), ni le CD34 (Progéniteur hématopoïétique) (MacDonald et al., 2002). Elles peuvent être divisées en deux grandes catégories : les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) **$CD11c^{-}CD123^{hi}$** et les cellules dendritiques conventionnelles ou myéloïdes (cDC / mDC) **$CD11c^{+}CD123^{neg}$ (Tableau 4)**. Dans les tissus, les mDC sont essentiellement représentées par les cellules de Langerhans qui sont retrouvées dans la peau, le tractus respiratoire et génital et par les DC interstitielles. Les pDC résident essentiellement dans les organes lymphoïdes et le sang (Banchereau and Palucka, 2005). Les pDC sont caractérisées par l'expression des marqueurs membranaires BDCA-2 (CD303) et BDCA-4 (CD304) et par leur capacité à produire de grandes quantités d'interféron de type I (Colonna et al., 2004; Liu, 2005). Les DC convention-

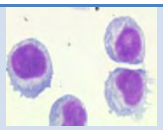
nelles peuvent être subdivisées en 3 groupes : $CD1c^+$ (BDCA-1^+), $CD16^+$ et $CD141^+$ (BDCA-3^+) (Lindstedt et al., 2005; MacDonald et al., 2002). Les DC CD141+ sont l'équivalent des DC CD8α+ chez la souris. Elles sont caractérisées par l'expression sélective du récepteur de type Lectine-C Clec9A (Poulin et al., 2010; Zhang et al., 2012a) et du récepteur XCR1 à la chimiokine XCL1 (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010). Les DC $CD1c^+$ et $CD141^+$ ont un profil d'expression génétique unique qui les différencie des monocytes et des cellules $CD11c^+CD16^+$ (Lindstedt et al., 2005). L'appartenance des cellules $CD11c^+CD16^+$ à la lignée des DC est discutée, et récemment elles ont été exclues de la nomenclature des DC (Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

Les différentes populations de DC conventionnelles et les pDC sont également caractérisées par leur profil d'expression des Toll-Like Receptors (TLR). Cette expression différentielle confère à chaque population de DC une capacité particulière à s'activer en réponse à différents signaux de danger. Ainsi, les DC CD1c+ expriment les TLR1, 2, 4, 5, 6, 8 et faiblement les TLR3 et 10. Elles présentent la particularité d'être les seules à exprimer fortement les TLR4 et 5 qui sont notamment impliqués dans la reconnaissance de composants bactériens tels que la flagelline et le LPS **(Tableau 3)**. Les DC CD141+ sont celles qui expriment le plus le TLR3 impliqué dans la reconnaissance des ARN double brins. Les pDC constituent une population unique de DC, éloignée des mDC génétiquement et expriment un répertoire de TLR qui les spécialisent dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux et bactériens (Lindstedt et al., 2005). Ce sont, en effet, les seules DC à exprimer les TLR7 et 9 respectivement impliqués dans la reconnaissance des ARN simple brin et des motifs CpG non-méthylés de l'ADN viral (Gilliet et al., 2008) **(Tableau 4)**. Toutefois, la restriction de l'expression du TLR7 aux pDC, parmi les différentes populations de DC, est controversée. Les travaux de Valladeau, Josien, Gilliet, Vasilakos et leurs collaborateurs montrent que le TLR7 serait exprimé faiblement par les DC myéloïdes CD11c et plus particulièrement par les DC CD1c+ (Flacher et al., 2006; Gorden et al., 2005; Hemont et al., 2013; Ito et al., 2002), alors que les travaux de Borrebaeck, Lanzavecchia, Liu et leurs collaborateurs montrent que le TLR7 serait exprimé uniquement par les pDC (Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001; Lindstedt et al., 2005). Le TLR7 est exprimé par d'autres types cellulaires que les DC, notamment les kératinocytes (Flacher et al., 2006) et les lymphocytes B (Hornung et al., 2002).

Ce répertoire unique de TLR exprimé par chaque population de DC contribue à leur fonction et l'engagement des TLR aboutit à la sécrétion de cytokines différentes par chaque population de DC. Les DC CD1c+ sécrètent ainsi un grand nombre de cytokines en réponse à l'engagement des TLR qu'elles expriment (IL-1α/β, IL-6, IL-8, TNF-α). Il est intéressant de

noter que ce sont les seules DC capables de synthétiser de l'IL-12p70 en grande quantité, et qu'elles le font en réponse à la stimulation du TLR3 qu'elles expriment pourtant faiblement (Hemont et al., 2013) ou à la stimulation par le cocktail (LPS + R-848) (Nizzoli et al., 2013). Les DC CD141+ présentent un profil de réponse à l'engagement des TLR plus restreint. Elles synthétisent de faibles quantités d'IL-6, d'IL-8 et d'IFN-β (Hemont et al., 2013). Les DC CD141+ peuvent produire de IL12p70 lorsqu'elles sont stimulées par le cocktail GM-CSF + IL-4 + CD40-L + IFN-γ (Mittag et al., 2011) ou par le cocktail poly I:C, IFN-γ, TNF-α, IFN-α, et IL-1β (Jongbloed et al., 2010). Elles se différencient des autres DC par leur capacité à synthétiser de grandes quantités d'interféron de type III (IFN-λ1 ou IL-28A et IFN-λ2 ou IL-29) en réponse à l'engagement du TLR3 par un ligand synthétique (Poly(I:C)) (Lauterbach et al., 2010), qui peuvent être augmentées en présence de R-848 et IFN-γ (Nizzoli et al., 2013). Les pDC, quant à elles, se caractérisent par leur capacité hors-norme de synthèse d'IFN de type I, notamment l'IFN-α dont la production peut atteindre de 3 à 10 pg/cellule (Liu, 2005).

Tableau 4 : Les DC du sang chez l'homme. Les TLR soulignés en noir sont les TLR les plus exprimés et en gris les moins exprimés. D'après (Bachem et al., 2010; Blum et al., 2006; Flacher et al., 2006; Hemont et al., 2013; Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2000; Kadowaki et al., 2001; Lauterbach et al., 2010; Nizzoli et al., 2013)

	mDC		pDC
Lineage	**Lin(CD3, CD14, CD16, CD19/20, CD34, CD56, glycophorine-A)^{neg} et HLA-DR^{pos}**		
Marqueurs Spécifiques	CD1c+	CD141+/Clec9A+	CD123+/BDCA-2+
Phénotype			
Fréquence dans les PBMC	0.31 ± 0.14%	0.04 ± 0.03%	0.29 ± 0.08%
TLR exprimés	TLR1, 2, 3, **4, 5**, 6,7? 8, 10	TLR1, 2, **3**, 6, 8, 10	TLR1, 6, **7**, 8, **9**, 10
Cytokines Majeures	IL-12p70 (TLR3)	IFN-λ (TLR3+/-TLR8)	IFN-α/β (TLR7/9)

Chaque tissu est infiltré par des cellules dendritiques ayant un phénotype particulier et adapté à leurs fonctions. Par exemple, les DC de la peau comprennent, dans des conditions non inflammatoires, deux populations distinctes : les DC interstitielles du derme caractérisées par l'expression des marqueurs DC-SIGN/CD208 et les cellules de Langerhans (LC) caractérisées par l'expression des marqueurs Langerine/CD207 (Valladeau et al., 1999). Les DC in-

terstitielles peuvent être subdivisées en 2 groupes : CD1a+ et CD14+. Ces dernières peuvent être différenciées des macrophages qui expriment le marqueur CD163 et le facteur XIII de coagulation (Merad et al., 2013). La peau contiendrait également une population de DC CD141+ et une population de DC CD1c+ (Haniffa et al., 2012; Merad et al., 2013).

Les LC représentent 2 à 4% des cellules de l'épiderme avec une densité qui varie de 200 à 1000 cellules par mm² (Valladeau and Saeland, 2005). Le TGF-β joue un rôle fondamental dans leur différenciation (Borkowski et al., 1996). Dans les conditions "normales", les LC sont maintenues dans la peau et sont renouvelées à partir d'un précurseur qui aurait colonisé la peau pendant la vie fœtale (Merad et al., 2002). Des études récentes suggèrent que le pool de LC contenu dans la peau à l'âge adulte dériverait en partie de progéniteurs venant de la vésicule vitelline (Schulz et al., 2012) et en majorité de monocytes issus du foie fœtal (Hoeffel et al., 2012). Toutefois, sous des conditions inflammatoires, les LC de la peau peuvent être remplacées par des LC dérivées d'un précurseur sanguin (Ginhoux et al., 2006).

Les LC ont la capacité d'internaliser des antigènes particulaires et des macromolécules grâce à l'expression de récepteurs de type lectine C (CLR), notamment la Langerine, Dectin-1, DEC-205 (Valladeau and Saeland, 2005) et DCIR (Klechevsky et al., 2010). Elles expriment également le récepteur aux IgE/CD32, ce qui met en évidence leur implication dans l'internalisation d'allergènes. Les LC présentent un organite intracellulaire unique identifié par le terme de granule de Birbeck (BG), présentant une forme caractéristique de raquette de tennis. La formation de ces vésicules est dépendante de l'expression et l'internalisation de la Langerine/CD207 (Valladeau et al., 2000).

Les LC expriment le TLR2 et sont donc particulièrement sensibles aux acides lipoteichoïques et aux peptidoglycanes (PGN) bactériens. Elles expriment également fortement le TLR6, un corécepteur pour les PGN. Les LC n'expriment pas les TLR7 et TLR9, mais expriment le TLR3 et maturent en présence de Poly(I:C) (Flacher et al., 2006). De plus, elles n'expriment pas le TLR4 et ne sont donc pas sensibles au LPS (Flacher et al., 2006).

Les LC disposent également de propriétés migratoires qui leur permettent de gagner les ganglions lymphatiques. Suite à une inflammation, les LC migrent hors du derme sous l'influence de l'IL-1β et du TNF-α (Cumberbatch et al., 2003). Cette propriété de migration dans le derme nécessite l'expression des Matrix Metalloproteinases (MMP)-9 et -2. Une fois dans la circulation sanguine, les LC migrent vers les ganglions lymphatiques grâce à l'expression du récepteur CCR7 suivant un gradient de chimiokines CCL19 (Robbiani et al., 2000). Dans les ganglions lymphatiques, les LC stimulent des lymphocytes T spécifiques d'antigènes

(Valladeau and Saeland, 2005). En effet, elles ont la capacité de réaliser la présentation croisée d'antigènes à des lymphocytes T CD8+ (Klechevsky et al., 2010).

H. Fonctions des DC

i. *Recrutement des DC dans la réponse immunitaire*

Les DC sont présentes dans tous les tissus de l'organisme et constituent ainsi un réseau sentinelle qui intègre en permanence les signaux de son environnement. Grâce à l'expression d'un répertoire spécifique de récepteurs aux signaux moléculaires de danger (PRR), les DC sont à même de maintenir la tolérance immunitaire dans les tissus sains ou de "briser " cette tolérance en présence d'un danger extérieur (PAMP) ou intérieur (DAMP). Les DC migrent rapidement sur les lieux de l'inflammation grâce à l'expression de récepteurs aux chimiokines libérées par le tissu lésé (McWilliam et al., 1994; Rollins, 1997). Pour migrer en réponse aux chimiokines libérées par le tissu lésé comme RANTES ou à certains signaux de danger comme le LPS, les DC expriment notamment MMP-9, une protéase de la famille des MatrixMetalloProteinases (MMP), qui permet la dégradation des fibres de collagène qui constituent une partie de la matrice extracellulaire (Chabot et al., 2006; Jotwani et al., 2010). Suite à l'engagement des PRR, les DC migrent rapidement vers les ganglions lymphatiques suivant un gradient de chimiokines (CCL19/CCL21) grâce à l'expression du récepteur CCR-7 (Hansson et al., 2006), où, dans leur état "mature" qui se caractérise par un niveau élevé d'expression des molécules HLA et de molécules de costimulation, elles réaliseront la présentation des antigènes aux LT.

ii. *Acquisition des antigènes*

Sur les lieux de l'inflammation, les DC pour jouer leur rôle sentinelle, doivent internaliser des échantillons de l'environnement du tissu lésé pour pouvoir transmettre l'information aux LT. On distingue plusieurs mécanismes d'internalisation.

1. La macropinocytose

La macropinocytose correspond à l'internalisation par les cellules de gouttelettes de liquide extracellulaire contenant des molécules d'une taille inférieure à 1µM. *In vitro*, cette propriété est utilisée pour le chargement des DC par des solutés contenant de grandes concentrations d'antigènes solubles, *in vivo* ce n'est probablement pas le mécanisme d'acquisition des

antigènes le plus représenté. En effet, les fluides sont peu abondants dans les tissus et beaucoup d'antigènes nécessitent d'être internalisés sous forme particulaire (Trombetta and Mellman, 2005). Toutefois, les modèles expérimentaux ont montré que la macropinocytose est le moyen privilégié d'acquisition des antigènes solubles injectés en intra péritonéal, intraveineux ou directement dans les ganglions lymphatiques (Aderem and Underhill, 1999; Silverstein et al., 1977). Ce mécanisme fait intervenir le réseau d'actine cellulaire et permet d'internaliser les antigènes dans des vésicules intracellulaires pour le chargement sur les molécules du CMH (Sallusto et al., 1995). La macropinocytose ne nécessite pas l'intervention de récepteur spécifique (Tel et al., 2012b).

2. La phagocytose

La phagocytose est un processus actif mettant en jeu le réseau d'actine cellulaire qui permet l'internalisation d'antigènes particulaires. *In vivo* c'est un processus majeur dans l'acquisition des antigènes (Trombetta and Mellman, 2005). Ce mode d'internalisation permet l'acquisition de tout ou d'une partie d'un micro-organisme (Gildea et al., 2001; Inaba et al., 1993) ou encore de fragments de cellules nécrotiques ou apoptotiques (Albert et al., 1998). Pour ces derniers, il a été montré que certaines molécules régulent ce processus, telles que les phosphatydilsérines (PS) (Fadok and Chimini, 2001) exprimées par les cellules apoptotiques ou encore la calréticuline exprimée lors de l'apoptose immunogène à la membrane des cellules mourantes (Gardai et al., 2005; Obeid et al., 2007). Ces signaux d'internalisation sont qualifiés de signal "eat-me" et trouvent respectivement comme récepteurs les stabilin-1, stabilin-2 et BAI1 (Brain-specific angiogenesis inhibitor 1) pour la PS et la Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1) ou CD91 pour la CRT à la surface des cellules phagocytaires (Brown and Neher, 2012). Il existe également des signaux qui régulent négativement la phagocytose : Signal "Don't eat-me". Ces signaux incluent les molécules CD47, CD200, CD31 et le "plasminogen activator inhibitor" (PAI)-1 . Le CD47 est le signal "don't eat-me" le plus répandu. Il est exprimé à la surface de presque toutes les cellules et bloque le processus de phagocytose en activant son récepteur "signal-regulatory protein-α" (SIRPα) (Blazar et al., 2001). CD47 se trouve surexprimé dans de nombreux cancers, et son niveau d'expression est corrélé avec l'agressivité de la tumeur et la mortalité (Jaiswal et al., 2009; Majeti et al., 2009). C'est donc la proportion entre les signaux "eat-me" et "don't eat-me" qui régule la phagocytose. La phagocytose permet également l'internalisation de complexes immuns (Fanger et al., 1996).

3. L'endocytose

L'endocytose est un mécanisme actif qui dépend de l'engagement de récepteurs spécifiques à la surface de la DC. Ce mode d'internalisation permet de concentrer l'antigène. Même présent en faible quantité dans l'environnement, l'antigène est concentré dans les vésicules d'internalisation et peut ainsi être présenté efficacement par les DC. L'endocytose fait intervenir différents récepteurs tels que les récepteurs de type Lectine C (C-Type Lectin) notamment DEC-205 (Bonifaz et al., 2002), le mannose récepteur, ou encore la Langerine exprimée par les cellules de Langerhans et responsable de la formation des granules de Birbeck qui pourrait jouer un rôle dans l'internalisation des antigènes (Valladeau et al., 2000).

4. Le "nibbling" ou grignotage

Le principe du "nibbling" propose que les CPA, et notamment les DC, sont capables de passer de cellules en cellules et de capturer un échantillon du contenu cellulaire par "grignotage", sans causer de dommage à la cellule prélevée, afin de présenter ce contenu aux LT après avoir migré dans les ganglions lymphatiques (Heath and Carbone, 2001). L'acquisition d'antigène par "nibbling" nécessite un contact entre cellules et implique la formation de vésicules à l'intérieur de la DC d'environ 1µM (Harshyne et al., 2003). Ce phénomène ne nécessite pas la formation de jonction Gap (Matheoud et al., 2010). L'acquisition d'antigène est souvent associée à l'internalisation de fragments de cellules apoptotiques ou nécrotiques (Albert et al., 1998). Toutefois, des travaux démontrent que les cellules vivantes peuvent être source d'antigènes pour la présentation croisée par les DC et que l'acquisition de matériel se fait par le processus de "nibbling" et est dépendante de l'expression du "Scavenger Receptor-A" (SR-A) par les DC (Harshyne et al., 2003; Maranon et al., 2004; Matheoud et al., 2010). L'acquisition d'antigènes à partir de cellules vivantes par "nibbling" pour la présentation croisée a été confirmée *in vivo,* dans un modèle murin (Matheoud et al., 2010).

5. Couplage immunologique régulé par les jonctions GAP : Gap-junction-mediated immunological coupling (GMIC)

Neijssen et ses collègues proposent, chez les CPA, le mécanisme d'acquisition des antigènes "Gap-junction-mediated immunological coupling" (GMIC). Ce modèle propose qu'en présence de certains signaux de danger, les CPA surexpriment Cx43, responsable de la formation des jonctions Gap (Eugenin et al., 2003). En établissant des jonctions Gap avec les cellules environnantes, les CPA sont ainsi capables d'importer des peptides antigéniques de ces cellules mourantes puis de les adresser dans la voie de présentation du CMH-I pour stimuler la réponse T CD8+ par le mécanisme de présentation croisée des antigènes. Lors des étapes précoces de l'apoptose, l'intégrité des jonctions Gap peut être maintenue temporairement et autorise le transfert d'antigènes vers une cellule saine ou une CPA **(Figure 8)**. L'efficacité du transfert est directement liée à la taille et à l'absence de structure secondaire dans le peptide transféré. Seuls les peptides linéaires sont transférés, et la concentration du peptide doit atteindre un certain seuil pour que l'antigène soit présenté efficacement par les CPA.

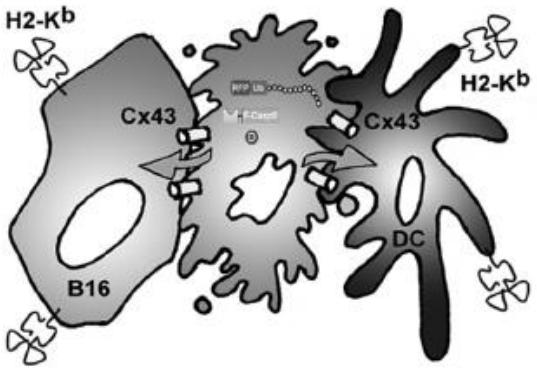


Figure 8: ***Gap-junction-mediated immunological coupling (GMIC).*** **D'après (Pang et al., 2009).**

6. "Cross-dressing"

Principe selon lequel les DC peuvent acquérir d'une autre cellule des complexes HLA/peptides préformés qui ne nécessiteront pas de "processing" supplémentaire pour être biologiquement actifs. L'acquisition des complexes HLA/peptides nécessite un échange de membranes qui fait intervenir le processus de trogocytose. Ce processus permettrait une présentation rapide des antigènes aux lymphocytes T mémoires, en éliminant les processus d'apprêtement par la DC. De plus, le "cross-dressing" permet aux DC de présenter les mêmes épitopes que ceux présentés par la cellule cible (Joffre et al., 2012; Wakim and Bevan, 2011).

I. La présentation des antigènes par les cellules dendritiques

i. *Les molécules de présentation : "Human Leukocytes Antigen"*

Les molécules "Human Leukocyte Antigen" ou HLA sont des glycoprotéines de la famille des immunoglobulines codées par une famille de gènes polymorphes.

1. HLA de classe I (HLA-I)

Les molécules HLA-I sont exprimées par toutes les cellules nucléées de l'organisme. Les molécules HLA-I sont constituées d'une chaîne lourde transmembranaire associée à la sous-unité β-2-microglobuline de façon non covalente (Germain, 1994). La chaîne lourde comprend 3 domaines de type immunoglobuline (α1, α2, α3). Les domaines α1 et α2 forment un sillon capable d'accueillir des peptides de 8 à 10 acides aminés qui seront présentés aux LT CD8+ (Germain, 1994). Dans la plupart des cas, l'ancrage du peptide au HLA-I se fait au niveau des acides aminés 2 et 9 ou 10 du peptide (Madden et al., 1993; Parham, 1992). L'allèle HLA-A*0201 est le plus représenté dans la population caucasienne (50% de la population). Dans le cas particulier du HLA-A*0201, il a été montré que les acides aminés donnant la meilleure stabilité au peptide étaient une leucine ou une méthionine en position 2 et une valine en position 9 (Ruppert et al., 1993).

2. HLA de classe II (HLA-II)

Les molécules HLA-II sont exprimées, de manière constitutive, uniquement par les CPA (monocyte, DC, macrophage, Lymphocytes B et T activés). Leur expression peut être induite sur les cellules "non-CPA" par l'IFN-γ. Elles sont formées de l'association de deux chaînes transmembranaires α1 et β1 (Germain, 1994). L'association de ces deux chaînes forme le sillon qui accepte les peptides pour présentation. Les peptides présentés dans le contexte HLA-II sont reconnus par les LT CD4+ et ont une taille comprise entre 12 et 24 acides aminés (Germain, 1994).

ii. *Voies de présentations classiques*

Les peptides présentés dans les molécules HLA de classe I (HLA-I), sont essentiellement des protéines endogènes dégradées dans le cytosol par le protéasome, alors que les peptides présentés par les molécules HLA-II sont essentiellement dérivés de protéines dégradées

dans les compartiments endocytiques par des enzymes hydrolytiques telles que les cathepsines (Villadangos and Schnorrer, 2007).

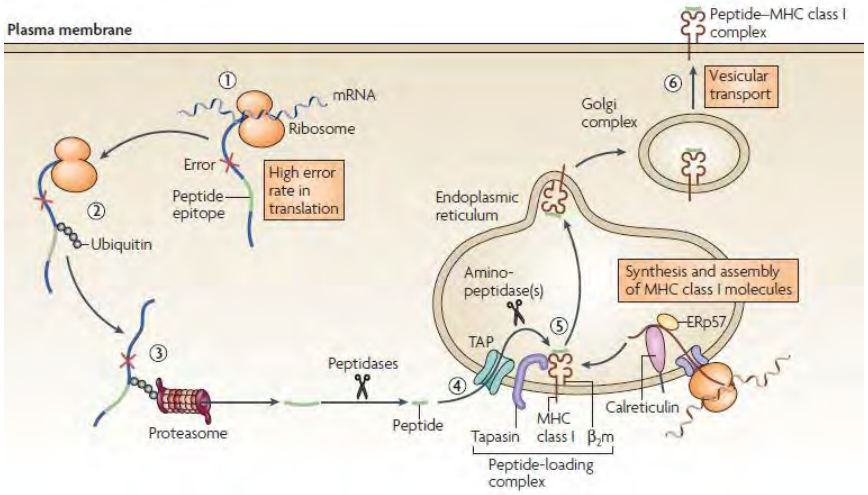


Figure 9 : Apprêtement et présentation des antigènes dans le contexte des molécules HLA de classe I. D'après (Vyas et al., 2008).

Tous les peptides qui se trouvent dans le cytoplasme, qu'ils soient fonctionnels ou non sont susceptibles d'être présentés dans les molécules HLA de classe I, y compris les protéines qui peuvent être sécrétées. Les peptides antigéniques, dérivés de protéines intracellulaires, sont découpés par le protéasome puis entrent dans le réticulum endoplasmique via les transporteurs TAP (Transporter Associated with antigen Processing) (Serwold et al., 2002). Ils y croisent la voie de biosynthèse des molécules HLA de classe I (**Figure 9**). Les peptides prédécoupés par le protéasome poursuivent leur dégradation, si nécessaire, sous l'action de protéases comme ERAAP (Endoplasmic reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing). Les peptides de 8 à 10 acides aminés sont chargés sur les molécules HLA-I, puis ce complexe transite par l'appareil de Golgi **(Figure 9)** avant d'être exprimé à la membrane cellulaire où ils seront présentés aux LT CD8+ (Vyas et al., 2008). Ainsi, les molécules HLA-I permettent aux lymphocytes T CD8+ effecteurs de détecter les cellules transformées ou infectées présentant respectivement des antigènes du "soi-modifé" ou du "non-soi".

Centré sur l'acquisition et la présentation d'antigènes exogènes, la voie de présentation des molécules HLA de classe II nécessite la formation de vésicules d'internalisation appelées phagosomes **(Figure 10)**. Une fois formés, les phagosomes qui contiennent les antigènes extracellulaires internalisés, fusionnent avec le compartiment lysosomal pour former les phago-

lysosomes. La formation de cette structure participe à la maturation des peptides qui seront présentés par les molécules HLA-II en diminuant le pH et favorisant l'action de protéases (Watts, 2001). Les phagolysosomes fusionnent ensuite avec les vésicules, issues du RE et de l'appareil de Golgi qui contiennent les molécules HLA-II néosynthétisées alors associées au peptide CLIP (Class II-associated invariant chain peptide). Lors de la fusion avec le phagolysosome, le peptide CLIP est dissocié de la molécule HLA-II pour permettre le chargement des antigènes. Une fois formés, les complexes HLA/peptides sont exportés à la membrane plasmique pour être présentés aux LT CD4+ dans les organes lymphoïdes secondaires (Inaba et al., 1997). Il apparaît également que la voie de présentation des molécules HLA-II permet la présentation d'antigènes endogènes au travers du processus d'autophagie. L'autophagie est un phénomène impliqué dans l'homéostasie cellulaire qui permet la synthèse de nutriments en cas de privation et qui contribue également à l'élimination d'organites intracellulaires endommagés. Les vésicules formées lors de ce processus et qui contiennent des auto-antigènes peuvent croiser la voie de biosynthèse des molécules HLA-II et ainsi être présentées aux LT CD4+.

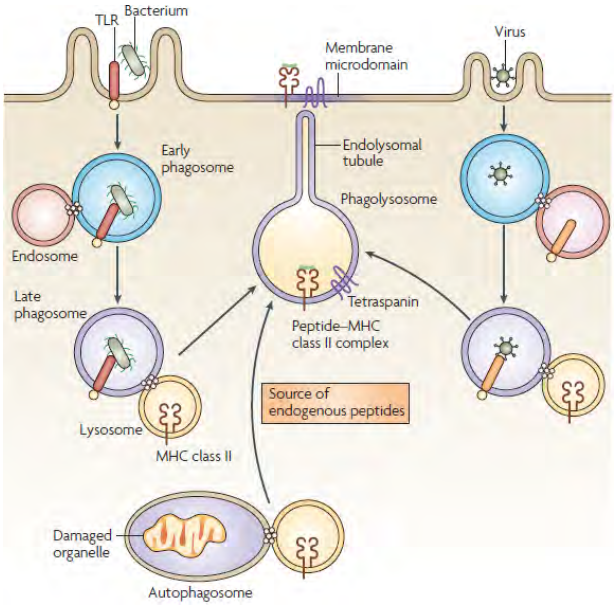


Figure 10 : Apprêtement et présentation des antigènes dans le contexte des molécules HLA de classe II. D'après (Vyas et al., 2008).

iii. *Présentation croisée des antigènes : "Cross-Presentation"*

Comme décrit précédemment, toutes les cellules de l'organisme expriment à leur surface des molécules HLA-I, ce qui leur permet de présenter des antigènes du "soi-modifié" ou des antigènes du "non-soi" aux LT CD8+ effecteurs cytotoxiques. Toutefois, pour devenir effecteurs cytotoxiques les lymphocytes T CD8+ naïfs doivent être d'abord activés, on parle

de "priming", par des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles capables de leur délivrer les signaux appropriés : les cellules dendritiques. Lorsqu'elles ne sont pas directement infectées ou lorsqu'elles doivent présenter des antigènes du "soi-modifié" issus d'une autre cellule, les DC sont obligées d'acquérir ces antigènes extracellulaires. Le mécanisme qui leur permet de présenter ces peptides extracellulaires dans le contexte des molécules de classe I du système HLA est nommé présentation croisée ou "cross-présentation". Il a été initialement décrit sur des splénocytes par Michael J. Bevan en 1976 chez la souris (Bevan, 1976). Il a fallu attendre la fin des années 90 pour démontrer que les DC excellent dans cet exercice (Albert et al., 1998; Regnault et al., 1999) et pour caractériser les voies intracellulaires qui régissent ce phénomène (Fonteneau et al., 2003; Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003; Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995).

1. Mécanismes

Deux voies intracellulaires sont décrites pour la présentation croisée des antigènes par les DC : la voie cytoplasmique et la voie des phagosomes **(Figure 11)**.

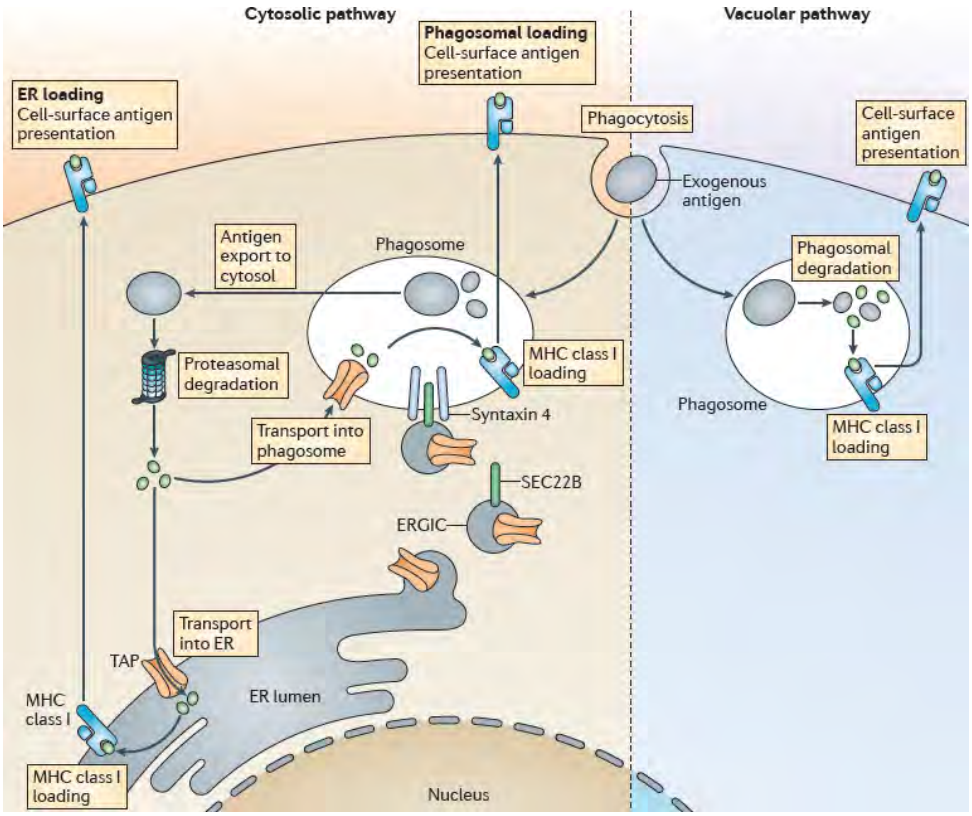


Figure 11 : **Les deux voies de présentation croisée des antigènes chez les DC.** D'après (Joffre et al., 2012).

La voie cytoplasmique est sensible aux inhibiteurs du protéasome ce qui reflète le passage des protéines internalisées des vésicules de phagocytose vers le cytoplasme. Ce transfert des antigènes internalisés a été mis en évidence en utilisant des molécules de cytochrome *c* et l'induction de l'apoptose des DC comme témoin (Lin et al., 2008). Seules les DC qui réalisent la présentation croisée exportent le cytochrome *c* des vésicules de phagocytose vers leur cytoplasme et subissent l'apoptose. Le mécanisme mis en jeu pour transférer les antigènes des vésicules de phagocytose vers le cytoplasme n'est pas totalement élucidé (Segura and Villadangos, 2011). Il est probable que ce passage se fasse de manière contrôlée au travers d'un transporteur dédié. La machinerie ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) impliquée dans la rétro-translocation des protéines mal conformées de la lumière du RE vers le cytoplasme est proposée comme système de transfert des antigènes exogènes de la lumière des vésicules de phagocytose vers le cytoplasme (Ackerman et al., 2006). Le canal multimérique Sec61, l'ATPase VCP/p97 et la molécule Derlin-1 réguleraient ce mécanisme de transfert. Les peptides exportés dans le cytoplasme sont dégradés par le protéasome puis transitent vers le RE au travers des transporteurs TAP 1 et 2 pour y achever leur maturation sous l'action des peptidases (ERAAP) avant d'être chargés sur les molécules HLA-I néosynthétisées.

La voie des phagosomes n'est pas sensible aux inhibiteurs du protéasome, ni aux inhibiteurs des transporteurs TAP, mais est sensible aux inhibiteurs des cathepsines, enzymes responsables de la maturation des peptides à charger dans les molécules HLA-I dans les endosomes (Shen et al., 2004). Dans cette voie, les antigènes sont donc internalisé, découpé et chargé sur les molécules HLA de classe I dans le compartiment endo-lysosomal. Il a été démontré que les DC possèdent des capacités de dégradation protéolytique phagosomale plus faibles que les autres cellules phagocytaires (Delamarre et al., 2005). Ce défaut de dégradation serait dû au pH plus élevé dans les compartiments endocytiques chez la DC que chez les autres phagocytes. Cette dégradation moins efficace préserverait les épitopes des antigènes à présenter et expliquerait leur meilleure présentation par les DC (Delamarre et al., 2005; Joffre et al., 2012). Il a d'ailleurs été démontré que ce retard dans l'acidification des compartiments endocytiques des DC pouvait être induit par l'IFN-α, ce qui expliquerait en partie son action positive sur le phénomène de présentation croisée (Spadaro et al., 2012).

2. Efficacité des différentes populations de DC à "cross-présenter"

La capacité des DC à réaliser la présentation croisée est dépendante de 2 propriétés : l'internalisation des antigènes dans une voie à faible potentiel de dégradation, et le transport des antigènes qui permet leur passage des phagosomes vers le cytosol, puis leur chargement dans les molécules HLA de classe I (Merad et al., 2013). Les données disponibles montrent que toutes les populations de DC humaines identifiées sont capables de réaliser efficacement la présentation croisée d'antigènes (Nierkens et al., 2013). Toutefois, le type d'antigène, la forme sous laquelle il est délivré aux DC, les signaux de danger et d'inflammation disponibles dans le microenvironnement semblent être les facteurs principaux qui régulent la capacité de chaque population de DC à réaliser la présentation croisée (Nierkens et al., 2013).

Par exemple, Delamarre et ses collaborateurs ont récemment démontré que les capacités de présentation croisée des DC BDCA3+ et BDCA1+ varient en fonction du compartiment protéolytique vers lequel l'antigène est adressé. Ainsi, lorsque les antigènes sont adressés vers l'endosome tardif grâce au couplage avec un anticorps anti-DEC205, les DC BDCA3+ présentent des capacités de cross-présentation supérieures aux DC BDCA1+. Cette propriété des DC BDCA3+ serait due à leur capacité à transférer rapidement l'antigène dans le cytoplasme évitant ainsi sa dégradation. Lorsque les antigènes sont adressés au compartiment endosomal précoce, au pH plus élevé, grâce à un couplage des antigènes avec un anticorps anti-CD40 ou anti-CD11c, les deux types de DC présentent la même capacité à réaliser la présentation croisée des antigènes. De nombreuses études ainsi ont été réalisées dans l'objectif d'identifier une population de DC spécialisée dans la présentation croisée.

Les DC CD141+ (BDCA3+) ont été identifiées comme les homologues des DC CD8α+ murines, et présentent des capacités de présentation croisée similaires. Elles ont été identifiées comme étant la population la plus efficace pour réaliser la présentation croisée (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010; Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010), puis des résultats contradictoires ont été rapportés (Cohn et al., 2013; Segura et al., 2013a; Tel et al., 2013b). Les DC humaines CD141+ ont la capacité de réaliser la présentation croisée à partir d'antigènes cellulaires (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010), de longs peptides (Segura et al., 2012), de protéines solubles (Bachem et al., 2010; Flinsenberg et al., 2012; Jongbloed et al., 2010; Mittag et al., 2011; Segura et al., 2013a) et de complexes immuns (Flinsenberg et al., 2012).

Les DC CD1c+ ont démontré leur capacité à présenter des antigènes dérivées de cellules (Bachem et al., 2010; Cohn et al., 2013; Crozat et al., 2010; Hoeffel et al., 2007; Schnurr

et al., 2005), des longs peptides (Segura et al., 2012), des antigènes solubles (Bachem et al., 2010; Flinsenberg et al., 2012; Jongbloed et al., 2010; Mittag et al., 2011; Nizzoli et al., 2013; Robson et al., 2010; Segura et al., 2013a) et des antigènes sous forme de complexes immuns (Flinsenberg et al., 2012; Schnurr et al., 2005).

Des travaux ont montré que les pDC ont également la capacité de réaliser la présentation croisée d'antigènes. Les travaux de l'équipe de Claude Leclerc ont démontré que les pDC murines sont capables de réaliser la présentation croisée de l'antigène OVA et d'activer des lymphocytes T CD8+ naïfs spécifiques de cet antigène *in vivo* chez la souris 129sv (Mouries et al., 2008). Ces propriétés de présentation croisée et d'activation des lymphocytes T CD8+ naïfs nécessitent la stimulation des pDC par des agonistes du TLR7 ou du TLR9. Sous ces conditions d'activation, les pDC présentent des capacités de stimulation des LT CD8+ spécifiques de l'antigène OVA similaires aux DC conventionnelles (cDC) CD8α+. Dominique Kaiserlian et ses collaborateurs ont démontré, dans un modèle murin, l'implication des pDC dans la tolérance orale à certains antigènes dérivés de l'alimentation (Goubier et al., 2008). Ce phénomène nécessite que les pDC acquièrent un antigène soluble apporté par l'alimentation et le présentent aux lymphocytes T CD8+ spécifiques de cette antigène pour induire leur délétion ou leur anergie. Cette étude démontre que les propriétés de présentation croisée des pDC sont également impliquées dans le phénomène de "cross-tolérance". Les pDC humaines ont également la capacité de réaliser la présentation croisée d'antigènes à partir de cellules (Crozat et al., 2010; Hoeffel et al., 2007; Lui et al., 2009; Tel et al., 2013b), d'antigènes solubles (Mittag et al., 2011; Segura et al., 2013a; Tel et al., 2013b) et à partir d'une préparation vaccinale de lipopeptide (Hoeffel et al., 2007). Les pDC ne cross-présenteraient pas les antigènes délivrés sous forme de complexes immuns (Schnurr et al., 2005), probablement parce qu'elles sont mal équipées pour les internaliser. Les pDC n'expriment pas les récepteurs CD16 (FcγRIII) et CD64 (FcγRI) aux fragments constants des immunoglobulines de type G, et seulement faiblement le récepteur CD32 (Lui et al., 2009). D'autres études montrent que les pDC seraient moins efficaces que les mDC à cross-présenter des antigènes solubles (Nizzoli et al., 2013), ou que les pDC issues des organes lymphoïdes secondaires ne cross-présenteraient pas d'antigène à partir de cellules nécrotiques à cause de capacité de phagocytose faible (Segura et al., 2013a).

Si toutes les DC humaines identifiées sont capables de réaliser la présentation croisée des antigènes, la comparaison directe des capacités de chacune des populations les unes par rapport aux autres semble difficile, comme en témoignent les résultats contradictoires rapportés dans la littérature.

3. Les facteurs qui influencent les capacités de présentation croisée

D'après Adema et ses collaborateurs, trois facteurs principaux régulent les capacités de présentation croisée des DC : le type d'antigène, la présence d'agents de maturation, et le temps nécessaire à l'apprêtement (Nierkens et al., 2013).

Les DC rencontrent des antigènes issus de multiples sources, de tailles et de formes différentes. La capacité des DC à prendre en charge ces antigènes est largement déterminée par leur profil d'expression des récepteurs nécessaires à l'internalisation de ces antigènes. Par exemple, la supériorité de présentation croisée des DC CD141+ semble être due à leur expression spécifique du récepteur de type Lectine C Clec9A responsable de la fixation de filaments d'actine F exposés à la surface des cellules nécrotiques (Brown, 2012; Zhang et al., 2012a). Cependant, lorsque les antigènes sont ciblés contre le récepteur de type Lectine C DCIR (Dendritic Cell ImmunoReceptor), toutes les DC humaines réalisent la présentation croisée de ces antigènes, y compris les cellules de Langherans de la peau, et les cellules dendritiques circulantes mDC et pDC (Klechevsky et al., 2010). Dans une autre étude, lorsque les antigènes sont adressés au compartiment endosomal précoce via un anticorps anti-CD40 ou anti-CD11c, les DC BDCA3+, BDCA1+ et pDC sont capables de réaliser la présentation croisée (Cohn et al., 2013). L'acquisition des antigènes et la voie de dégradation dans laquelle ils sont engagés sont donc des étapes limitantes de la présentation croisée.

Les agents de maturation modulent également la présentation croisée. Chaque population de DC exprime une collection restreinte de TLR leur permettant de reconnaître une gamme spécifique de PAMP et de DAMP. La reconnaissance de ces motifs moléculaires par les DC active la maturation des DC et augmente leur performance de présentation croisée (Kool et al., 2011; Mouries et al., 2008). Ce phénomène a notamment pu être mis en évidence chez la souris, où les pDC, dans leur état immature, sont incapables de réaliser la présentation croisée et acquièrent cette propriété après une stimulation adaptée des TLR7/9 (Mouries et al., 2008). Il semble que les ligands R-848 et Poly(I:C) des TLR8 et TLR3, respectivement, optimisent la présentation croisée par les DC CD141+ (Tel et al., 2013b). Le ligand TLR7/8 CL075 a également la capacité d'optimiser la cross-présentation des mDC mais également leur capacité de cross-priming (Klechevsky et al., 2010).

Le temps nécessaire à l'apprêtement influence également la cross-présentation. Les différentes populations de DC seraient efficaces pour activer la réponse immunitaire à des temps différents. Ainsi, chez la souris, il a pu être mis en évidence que les DC homologues

murines des DC CD141+, les DC CD8α+, sont efficaces pour réaliser la présentation croisée 18h après l'exposition à la source d'antigènes et ont perdu cette propriété au bout de 36h, alors qu'une population de DC migratoires est capable de réaliser la présentation croisée des antigènes jusqu'à 6 jours après l'exposition aux antigènes (Bedoui et al., 2009). Les pDC, quant à elles, pourraient posséder des capacités de cross-présentation plus faibles que les mDC, mais grâce à leur capacité hors-norme de synthèse d'IFN de type I, participeraient en première ligne en limitant la propagation des infections virales et en optimisant la capacité de présentation croisée des autres populations de DC (CD1c+ et CD141+) (Spadaro et al., 2012).

Le tissu dans lequel résident les DC influence également leurs propriétés de présentation croisée. Dans les conditions normales, les DC migrent par la circulation sanguine depuis la moelle hématopoïétique pour coloniser les organes lymphoïdes et les tissus périphériques où il se différencie en différentes populations de DC. Seules les LC sont maintenues dans la peau indépendamment d'un précurseur sanguin en l'absence d'inflammation. Les pDC, quant à elles, se différencient entièrement dans la moelle hématopoïétique avant de migrer pour coloniser les organes lymphoïdes. Les DC des organes non lymphoïdes migrent continuellement au travers de la lymphe jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants. Les DC des organes lymphoïdes ne migrent pas et y résident toute leur vie. En l'absence de stimulation par un agoniste TLR, les DC résidant dans les organes lymphoïdes secondaires peuvent acquérir et cross-présenter des antigènes (Segura et al., 2013a; Segura et al., 2012). Les DC du sang nécessitent, quant à elles, une activation appropriée pour acquérir cette propriété. D'après Amigorena et ses collaborateurs, les DC circulantes du sang ne seraient pas totalement différenciées et nécessiteraient un signal de maturation pour devenir pleinement fonctionnelles, alors que les DC des organes lymphoïdes, qui effectuent la présentation croisée *in vivo,* seraient pleinement fonctionnelles sans nécessité l'intervention d'un signal de maturation (Segura et al., 2012).

J. La synapse immunologique: Rôle des DC dans l'activation des Lymphocytes T

i. *Structure de la synapse immunologique*

Une fois activées, les DC migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter aux cellules T les complexes HLA/peptide qu'elles ont formés suite à leur activation dans les tissus. L'activation des cellules T naïves nécessitera la formation d'une structure stable entre la cellule dendritique et la cellule T : la synapse immunologique (**Figure 12**). L'interaction DC/LT débute par la stabilisation de ce contact grâce aux molécules d'adhésion ICAM1 et LFA-3 exprimées par les DC, et LFA1 et CD2 exprimées par les LT, respectivement. L'organisation de la synapse immunologique conduit à une réorganisation du cytosquelette des LT et des DC, qui permet de polariser l'accumulation de molécules d'adhésion, de présentation et de costimulation pour former un complexe supramoléculaire (Supramolecular Activation Cluster -SMAC). Le SMAC s'organise de façon concentrique et comprend une partie centrale qui contient une accumulation de TCR, le couple HLA/peptide et les molécules de costimulation ; une région périphérique qui concentre un anneau de molécules d'adhésion et une partie distale riche en actine et en molécules CD45 (Dustin and Depoil, 2011). L'accumulation des TCR à proximité des complexes HLA/peptide et l'interaction de faible affinité entre ces molécules permettent l'activation en série d'un nombre important de TCR : "serial triggering" (Valitutti et al., 1995).

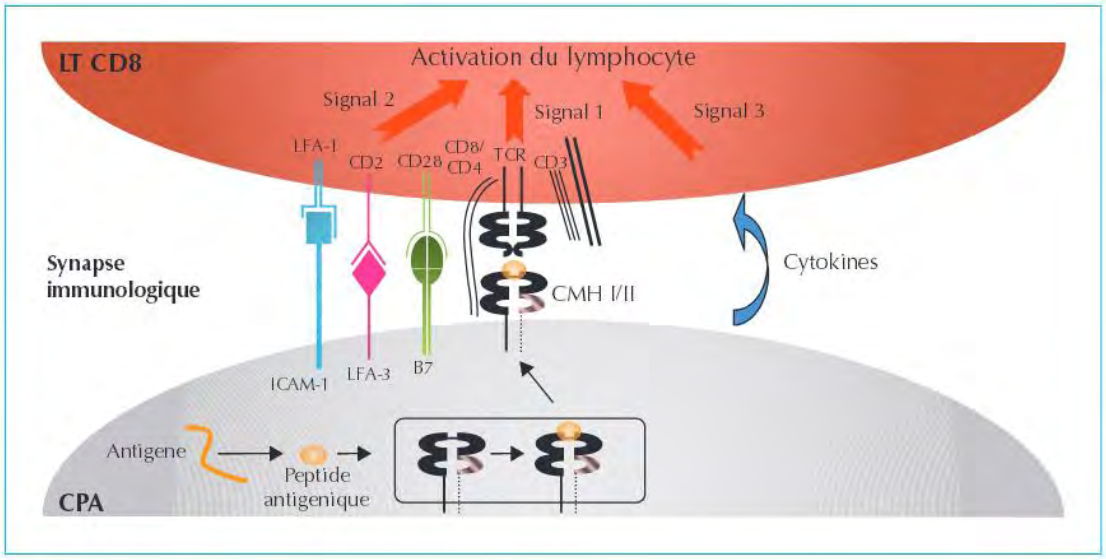


Figure 12 : Structure de la synapse immunologique. D'après (Tougeron et al., 2013).

ii. *Activation des lymphocytes T naïfs*

L'activation des lymphocytes T naïfs nécessite deux signaux. Le premier signal est donné par l'engagement du récepteur des cellules T (TCR) par le complexe HLA/peptide qui est stabilisé par l'interaction avec les molécules CD8 ou CD4. La transduction intracellulaire du signal nécessite la molécule CD3. Ce signal ne permet pas à lui seul d'activer un LT naïf, un second signal est nécessaire. Ce second signal d'activation est délivré par les molécules de costimulation dont l'expression est augmentée sur les DC lors de leur maturation. Ainsi, les molécules CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2), exprimées par les DC, interagissent avec la molécule activatrice CD28 exprimée par les LT naïfs, qui peuvent alors synthétiser l'interleukine-2 (IL-2) indispensable à leur expansion clonale (Bluestone, 1995).

iii. *Rôle des DC dans la polarisation de la réponse immunitaire*

En fonction de leur maturation, les DC secrètent, au contact des lymphocytes T CD4+, des cytokines qui vont agir sur le phénotype vers lequel ils vont se différencier. La sécrétion de ces cytokines constitue un troisième signal d'activation pour les lymphocytes T. Ainsi, Reis e Sousa propose qu'il existe de multiples types de DC effectrices qui, en fonction des signaux qui les ont activées, vont influencer le devenir des lymphocytes T CD4+ avec qui elles interagissent **(Figure 13)** (Reis e Sousa, 2006). Ainsi, les DC recevant un signal CD154 des lymphocytes T CD4+ activés sécrètent de L'IL-12p70 et polarisent la différenciation du LT CD4+ vers un phénotype effecteur "helper", de type T_H1, essentiel à l'établissement des réponses cellulaires cytotoxiques. Les DC inflammatoires synthétisent de l'IL-1, IL-6, IL-23 et TGF-β, et polarisent ainsi la différenciation du lymphocyte T CD4+ vers un phénotype effecteur T_H17 (Segura et al., 2013b), impliqués dans la pathogenèse de certaines maladies auto-immunes et inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme ou le psoriasis. La polarisation vers un phénotype de type T_H2 est régulée par la synthèse d'IL-4 et promeut la réponse humorale. Les cytokines IL-10 et TGF-β induisent la différenciation des lymphocytes T CD4+ vers un phénotype "régulateur" (Treg) impliqué dans le phénomène de tolérance (Zou and Restifo, 2010).

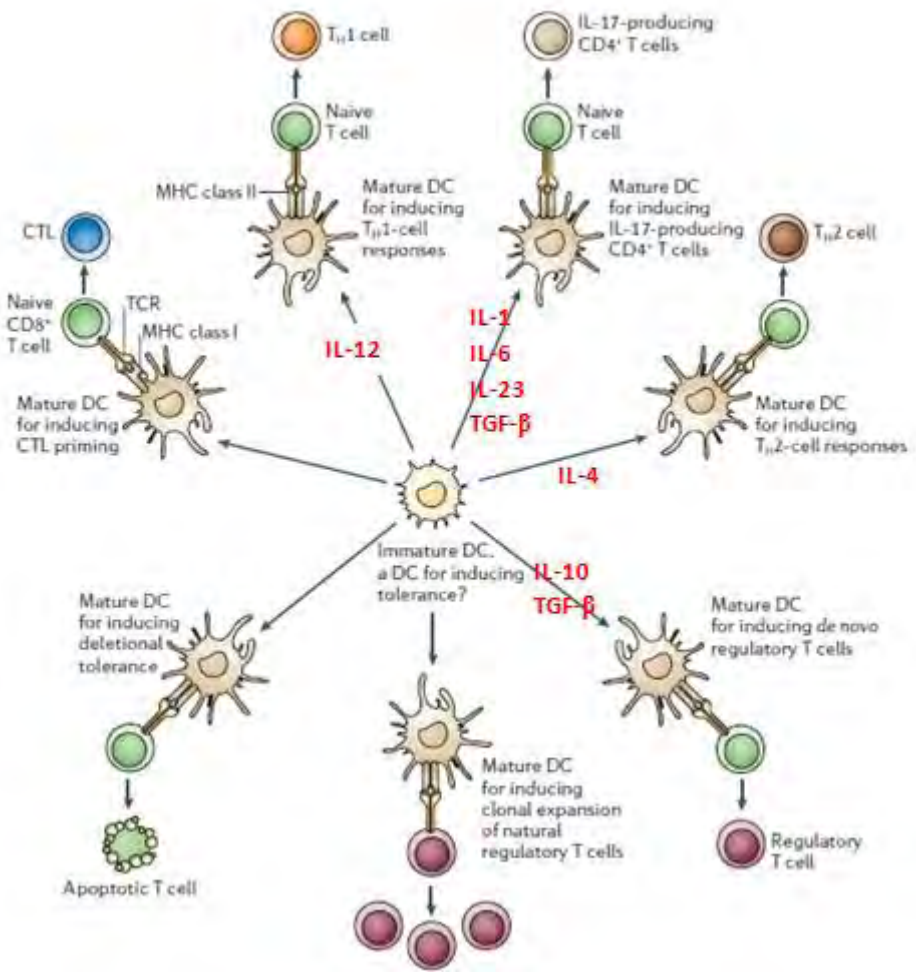


Figure 13 : Les fonctions effectrices des DC dans la polarisation du phénotype des LT CD4+. D'après (Reis e Sousa, 2006).

iv. *Le "Cross-Priming": Activation des lymphocytes T CD8+ naïfs.*

Pour induire l'activation des lymphocytes T CD8+ naïfs, les lymphocytes T CD4+ sont généralement nécessaires **(Figure 14)**. Dans les ganglions, une fois activé par une DC, les lymphocytes T CD4+ expriment la molécule CD154 (CD40L) qui donne à la DC, en retour, un signal qui lui permet de parachever sa maturation (Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998; Simon et al., 2012). Ce signal a été nommé "licence to kill" (Lanzavecchia, 1998). L'engagement du CD40, dont l'expression est renforcée au cours de la maturation, confère à la DC la capacité de sécréter des cytokines et notamment l'IL-12 essentielle dans l'activation des fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8+ (Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998; Simon et al., 2012). Le signal ainsi délivré par le LT_H (LT Helper) est considéré comme une seconde opinion avant de conférer aux

LT CD8+ leurs fonctions cytotoxiques. Même si la fréquence des lymphocytes T auto-réactifs est faible, du fait de leur délétion suite au phénomène de tolérance centrale, le fait que l'activation des fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8+ requiert que l'antigène soit présenté dans le contexte des HLA de classes I et II et soit reconnu simultanément par un lymphocyte T CD4+ (LT_H) et par un lymphocyte T CD8+ limite la probabilité d'activer un lymphocyte T CD8+ auto-réactif.

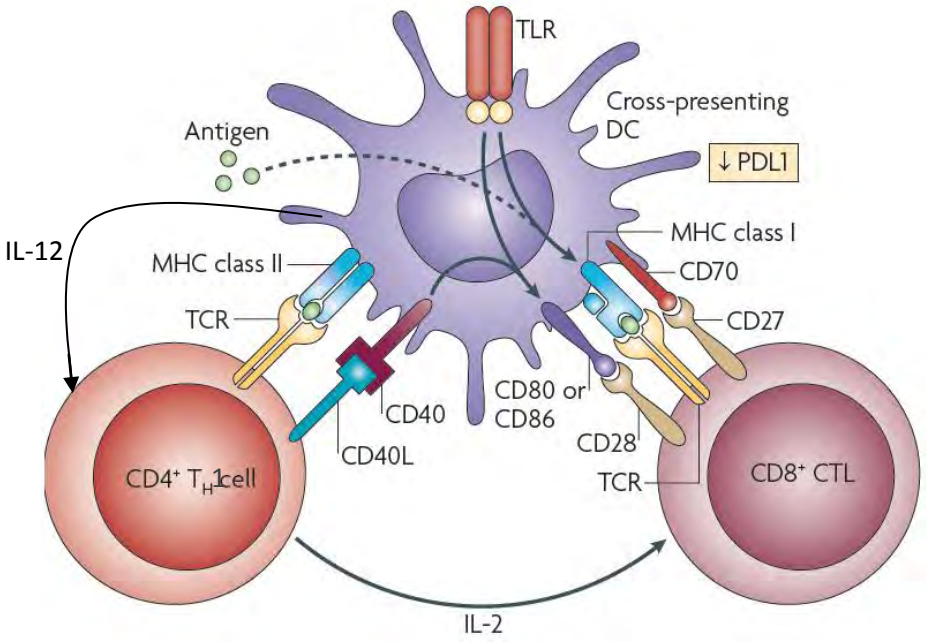


Figure 14 : "Cross-Priming" : Mécanisme moléculaire de l'activation classique des LT CD8+ cytotoxiques. D'après (Kurts et al., 2010).

IV. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans le cancer

A. Découverte des pDC

En 1958, K. Lennert et W. Remmele rapportent l'observation histologique de cellules morphologiquement proches des plasmocytes dans la zone T des ganglions lymphatiques humains et les nomment "T-associated plasma cells" (Lennert and Remmele, 1958). En 1983, A.C. Feller et ses collaborateurs démontrent que ces cellules expriment la molécule CD4, un marqueur associé aux lymphocytes T helper, mais n'expriment pas de marqueur des lymphocytes B. Ils proposent de renommer ces cellules "plasmacytoid T cells" (Feller et al., 1983). Ce terme est remis en question par le Dr F. Facchetti qui montre que ces cellules n'expriment pas les composants du récepteur des cellules T (TCR), mais expriment les molécules HLA-II et certains marqueurs des cellules myéloïdes. Il propose alors le terme de "plasmacytoid monocytes" (Facchetti et al., 1988). Parallèlement, l'équipe de Y.J Liu découvre des cellules $CD4^+CD11c^-CD3^-$, qui présentent une morphologie proche des lymphocytes T, localisées dans la région riche en cellules T autour des hautes veinules endothéliales des ganglions lymphatiques (Liu, 2005). En 1996, en collaboration avec le Dr Luis Filgueira, l'équipe de Y.J Liu démontre que les cellules $CD4^+CD11c^-CD3^-$ et les "plasmacytoid T cells" découvertes par le Dr F. Facchetti sont la même population cellulaire. En 1997, l'équipe de Y.J Liu démontre également que ces cellules n'expriment pas de TCR ni de récepteur de type immunoglobuline, qu'elles peuvent se différencier en cellules dendritiques matures sous l'influence de l'IL-3 et du CD40 ligand, qu'elles sont différentes des monocytes et propose qu'elles dérivent de la lignée lymphoïde (Grouard et al., 1997). Le terme de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) est alors proposé pour nommer cette population. En 1999, Liu et ses collaborateurs démontrent que les pDC sont également les mêmes cellules que les "Natural Type Interferon Producer Cells" (IPC). En effet, les pDC sont capables de produire 100 à 1000 fois plus d'IFN de type I (α, β, ω) que les autres cellules du sang, suite à une stimulation par le virus HSV (Siegal et al., 1999).

Les pDC représentent 0,2% à 0,8% des cellules mononucléées du sang chez l'homme (Liu, 2005). Grâce à l'expression des TLR7/9, les pDC sont spécialisées dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux et bactériens. L'équipe du Dr Michel Gilliet a également démontré que les pDC peuvent reconnaître des séquences ADN du "soi", lorsqu'elles sont associées au peptide antimicrobien LL37 (Lande et al., 2007). Les pDC seraient ainsi impli-

quées dans certaines maladies auto-immunes telles que le psoriasis. Les travaux de Butcher, et de ses collaborateurs ont démontré, dans un modèle murin, que les pDC sont également impliquées dans le processus de tolérance centrale (Hadeiba et al., 2012). En effet, les pDC captent des antigènes en périphérie de l'organisme puis, en l'absence de signaux de danger, migrent par la circulation sanguine jusqu'au thymus suivant le gradient de la cytokine CCL25 grâce à l'expression du récepteur CCR9. Dans le thymus, elles participent ainsi à la délétion des thymocytes réactifs contre des antigènes spécifiques de tissus, contre des éléments de la flore commensale ou contre certains nutriments que les cellules épithéliales médullaires thymiques ne peuvent pas éliminer. Les pDC, sous leur forme immature, peuvent également participer au processus de tolérance périphérique en induisant la formation de lymphocytes T régulateurs (Morelli and Thomson, 2007).

L'engagement des TLR7/9 conduit à la synthèse de grandes quantités d'IFN de type I et permet aux pDC d'acquérir un phénotype mature/activé (Liu, 2005). En plus de l'IFN de type I, les pDC peuvent également synthétiser d'autres cytokines comme le TNF-α , l'IL-6, le CXCL8 (Decalf et al., 2007; Liu, 2005) et des chimiokines pro-inflammatoires comme CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, et CCL5 (Penna et al., 2002a). Suite à leur activation les pDC ont la capacité d'activer des lymphocytes T CD4+ et de réaliser la présentation croisée d'antigènes aux LT CD8+ (voir § Efficacité des différentes populations de DC à "cross-présenter"). Les pDC activées participent, notamment au travers de leur synthèse d'IFN de type I, à la polarisation de la réponse immunitaire vers le phénotype T_H1, favorisant ainsi la survie des cellules T effectrices et leur activité cytotoxique ainsi que la sécrétion d'IFN-γ (Swiecki and Colonna, 2010). Les pDC, grâce à leurs fonctions, représentent une population de cellules présentatrices d'antigènes à part entière et complémentaire des cellules dendritiques myéloïdes.

B. Les pDC sont recrutées dans les tumeurs

Ces dernières années, les données expérimentales démontrant le rôle critique des pDC dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale se sont accumulées. Toutefois, à l'instar des DC myéloïdes, les fonctions des pDC peuvent être détournées par le microenvironnement de la tumeur de sorte à promouvoir le développement de celle-ci. De tels dysfonctionnements peuvent avoir un impact important sur l'efficacité des stratégies d'immunothérapie anti-tumorales qui ciblent l'activation des pDC.

Les pDC ont été retrouvées associées à un grand nombre de tumeurs primaires du sein, des ovaires, de la tête et du cou, de la peau, des poumons, du col de l'utérus, du foie, de la prostate et dans les ganglions drainant les tumeurs (Vermi et al., 2011). Elles représenteraient une minorité de l'infiltrat immunitaire (<10%) et se localiseraient en périphérie de la tumeur. Les pDC expriment plusieurs récepteurs aux chimiokines qui peuvent expliquer leur localisation dans les tumeurs, notamment CXCR4, CCR6 et CCR2. Le ligand de CXCR4, CXCL12, est notamment sécrété par les cellules tumorales de mélanomes et de carcinomes ovariens (Vermi et al., 2003; Zou et al., 2001). Les pDC expriment également le récepteur CXCR3, qui ne permet pas la migration directe des pDC mais les sensibilise à la chimiokine CXCL12. Suite à leur activation, les pDC peuvent sécréter deux chimiokines inductibles par l'IFN-α, CXCL9 et CXCL10, qui se lient à CXCR3 et sensibilisent les pDC au chimiotactisme régulé par CXCL12 (Vanbervliet et al., 2003). Dans le mélanome, il a également été mis en évidence le rôle de la chimiokine CCL20, ligand de CCR6 exprimé par les pDC, dans l'accumulation des pDC au niveau des lésions tumorales (Charles et al., 2010). Enfin, les pDC expriment CCR2 le récepteur à la chimiokine CCL2, fréquemment sécrétée par les tumeurs et qui promeut le recrutement de monocytes inflammatoires, de macrophages associés aux tumeurs (TAM) et aux métastases (MAM) (Penna et al., 2002b). Le CCL2 sécrété par les tumeurs est considéré comme un facteur associé à un mauvais pronostic de survie (Saji et al., 2001; Ueno et al., 2000). Sous certaines conditions d'activation, les mastocytes infiltrant la tumeur pourraient également sécréter cette cytokine et participer au recrutement des pDC dans la tumeur (Drobits et al., 2012).

C. Subversion des fonctions des pDC par le microenvironnement tumoral

Les pDC recrutées par le microenvironnement tumoral présentent souvent un phénotype non activé caractérisé par une dysfonction dans la production d'IFN-α en réponse à la stimulation de leur TLR et par leur incapacité à générer une réponse T efficace. L'infiltration de pDC dans les tumeurs mammaires est un facteur associé à un mauvais pronostic de survie (Treilleux et al., 2004). Plusieurs mécanismes sont développés par les cellules tumorales et leur environnement sont responsables de ces dysfonctions et conduisent les pDC associées aux tumeurs (TApDC) à acquérir un phénotype tolérogène (Demoulin et al., 2013).

i. *Suppression des fonctions immunostimulatrices des TApDC*

La suppression des fonctions immuno-activatrices des pDC peut être induite par des médiateurs sécrétés par la tumeur ou l'infiltrat immunitaire qui y réside. La prostaglandine E-2 (PGE_2), sécrétée par les cellules tumorales, associée au transforming growth factor (TGF-β), sécrété par l'infiltrat immunitaire intra-tumoral, sont impliqués dans la suppression de la fonction de sécrétion de l'IFN-α par les pDC en réponse à l'engagement des TLR7/9. Cette inhibition pourrait être due à une diminution de l'expression de ces TLR ou du facteur de transcription IRF7, qui régule la synthèse d'IFN-α, par les pDC exposées au microenvironnement tumoral (Bekeredjian-Ding et al., 2009).

La molécule HMGB1 est libérée par les cellules tumorales nécrotiques et est décrite comme DAMP et puissant activateur de la réponse inflammatoire. Cependant, sous certaines conditions, cette molécule pourrait participer à l'inhibition des fonctions immunostimulatrices des TApDC. En liant le récepteur inhibiteur "T cell immunoglobulin mucin-3" (TIM-3) exprimé par les TApDC, HMGB1 inhiberait le transport des acides nucléiques dans les endosomes et par conséquence la synthèse d'IFN de type I qui en résulte (Chiba et al., 2012).

Pour échapper à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale régulée par les pDC, les cellules tumorales peuvent exprimer également des ligands de récepteurs inhibiteurs exprimés par les pDC. Le "Bone marrow stromal antigen 2" (BST2), aussi connu sous le nom de "tetherin" ou CD137, est exprimé de manière constitutive par un grand nombre de lignées de cellules tumorales et constitue un ligand du récepteur "immunoglobulin-like transcript 7" (ILT7) exprimé par les pDC. ILT7 est associé au récepteur FcγRII qui assure la transduction intracellulaire du signal (Cao and Bover, 2010; Cao et al., 2006). La liaison BST2/ILT7 inhibe la synthèse de l'IFN-α et du TNF-α par les pDC exposées à des ligands des TLR7/9 (Tsukamoto et al., 2009). La molécule BDCA2 "Blood Dendritic Cell Antigen 2", spécifiquement exprimée par les pDC, associée au récepteur spécifique des IgE FcεRI, constitue également un récepteur inhibiteur. L'existence d'un ligand naturel de BDCA2, exprimé par la tumeur, n'est pas formellement établie, mais pourrait contribuer à l'inhibition des fonctions immunostimulatrices des pDC. En effet, l'engagement de BDCA2 conduit à une inhibition de la maturation des pDC et de leur capacité de synthèse d'IFN-α et les conditionne de sorte qu'elles polarisent la réponse T helper vers un phénotype T_H2 (Cao et al., 2007).

ii. *Acquisition de fonctions suppressives par les TApDC*

L'acquisition de fonctions suppressives par des TApDC a pu être observée chez l'homme et dans des modèles murins. Le facteur de transcription *Foxo3* a été identifié, dans le cancer de la prostate chez l'homme et dans un modèle murin, comme responsable de l'acquisition de ce phénotype immunosuppresseur par les TApDC caractérisé par la sécrétion d'Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), d'arginase et de TGF-β (Watkins et al., 2011). L'IDO est une enzyme qui catabolise le tryptophane en kynurénine. En dégradant le tryptophane, essentiel à la prolifération des cellules T, IDO agit comme un agent immunosuppresseur puissant. Ces pDC IDO+ ont été détectées dans les ganglions drainant la tumeur de patients atteints de mélanome (Gerlini et al., 2010).

Les fonctions suppressives des TApDC passent également par l'expression du ligand "Inducible T-cell costimulator" ICOSL, dont l'expression sur les TApDC pourrait être induite par le microenvironnement tumoral. La liaison de ICOSL au récepteur ICOS, naturellement exprimé par les LT CD4+ naïfs, polarise la différenciation de ces derniers vers un phénotype Treg (Ito et al., 2007). De telles fonctions suppressives ont été observées chez des patientes atteintes de cancers ovariens où les TApDC sont responsables de la génération de lymphocytes Treg FoxP3+ producteurs d'IL-10, suite à la signalisation ICOSL/ICOS (Conrad et al., 2012).

D. Intérêt de stimuler les pDC pour la réponse immunitaire anti-tumorale

i. *Récupération des fonctions immunostimulatrices des TApDC par une stimulation TLR7*

Si les TApDC acquièrent des fonctions immunosuppressives sous l'influence du microenvironnement tumoral, il semble néanmoins que sous certaines conditions d'activation, elles peuvent être reprogrammées pour devenir des acteurs efficaces, voire indispensables à l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

Très récemment, Goutagny et ses collaborateurs ont démontré dans un modèle de cancer du sein chez la souris que les TApDC s'accumulent sous une forme immature dans la tumeur et participent à la progression tumorale (Le Mercier et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs ont notamment démontré que les TApDC conservent leur capacité à internaliser des antigènes, mais présentent une incapacité à sécréter de l'IFN-α en réponse à la stimulation du

TLR9 par les CpG-A/ODN-2336 et CpG-B/ODN-1826, mais conservaient leur capacité à synthétiser du TNF-α en réponse à ces mêmes ligands. Cette perte de sensibilité aux ligands de TLR9 n'est pas due à une diminution de l'expression du TLR9. La déplétion des TApDC provoque un retard dans la progression tumorale, attestant de l'implication des TApDC dans la croissance tumorale. De façon surprenante, les TApDC conservent leur capacité à sécréter de l'IFN-α en réponse à une stimulation du TLR7 *in vitro* et particulièrement suite à l'exposition au virus Influenza, alors que d'autres ligands de TLR7 ne sont pas aussi efficaces. Enfin, les auteurs ont démontré *in vivo* que l'injection intra-tumorale ou controlatérale de ligand TLR7 induit une sécrétion robuste d'IFN-α par les pDC des souris traitées. Par contre, seule l'injection intra-tumorale du ligand TLR7 induit une régression tumorale significative, suggérant que seul le recrutement des pDC intra-tumorales permet une réponse efficace. La déplétion des TApDC ou l'injection d'anticorps bloquant le récepteur à l'IFN-α (IFNAR1) abroge l'effet anti-tumoral des ligands de TLR7 (Le Mercier et al., 2013). Ces résultats démontrent que les TApDC peuvent récupérer des fonctions anti-tumorales sous certaines conditions d'activation et que l'effet anti-tumoral régulé par les ligands de TLR7 est strictement dépendant des TApDC et de l'IFN-α qu'elles produisent.

ii. *Engagement des TLR7/9 et synthèse d'IFN-α : dichotomie NF-κB/IRF7*

La capacité des pDC à sécréter de grandes quantités d'IFN-α en réponse à l'engagement des TLR7/9 semble largement contribuer à leurs propriétés anti tumorales. Toutefois, il apparaît que les pDC ne répondent pas de la même manière à tous les ligands TLR.

En fonction de la nature du ligand TLR utilisé, deux voies d'activation peuvent être engagées dans les pDC humaines. Cette dichotomie fut rapportée pour la première fois par Hartmann et ses collaborateurs qui démontrèrent que deux agonistes du TLR9 n'induisaient pas le même type de maturation des pDC (Kerkmann et al., 2003). Le CpG de type A, qui contient un seul motif CpG et une queue poly(G), induit une forte sécrétion d'IFN-α par les pDC car il est retenu stablement dans l'endosome précoce, ce qui favorise le recrutement du facteur de transcription IRF7 et permet une synthèse de grandes quantités d'IFN-α (Honda et al., 2005). A l'inverse, le CpG de type B, qui contient plusieurs motifs CpG et ne possède pas de queue poly(G), transite rapidement vers l'endosome tardif. Il en résulte une faible activation du facteur de transcription IRF7 et donc une faible synthèse d'IFN-α (Kawai and Akira, 2010). Par contre, l'engagement du TLR9 par le CpG-B permet à la pDC d'acquérir un phénotype mature complet et de synthétiser des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-

8 et le TNF-α grâce au recrutement du facteur NF-κB (Jaehn et al., 2008). Plus récemment, l'existence de cette dichotomie a été démontrée pour le TLR7 (O'Brien et al., 2011). Dans cette étude, le VIH se comporte comme le CpG-A, en recrutant le TLR7 dans l'endosome précoce. Il induit une maturation incomplète des pDC et leur permet de synthétiser de grandes quantités d'IFN-α, alors que le R-848 recrute le TLR7 dans l'endosome tardif et favorise l'activation de la voie NF-κB conduisant à une maturation complète des pDC, une synthèse de cytokines pro-inflammatoires mais de faibles quantités d'IFN-α.

La qualité du ligand de TLR utilisé pour recruter les pDC dans la réponse anti-tumorale doit être adapté à la fonction des pDC que l'on souhaite mobiliser : la sécrétion d'IFN-α ou l'expression des molécules de costimulation.

iii. *Fonctions de l'IFN de type I dans le rejet des tumeurs*

L'IFN a initialement été décrit pour ses propriétés antivirales lorsque Lindenmann et ses collaborateurs ont mis en évidence que le virus Influenza, inactivé par la chaleur et injecté chez des embryons de poulets, inhibait la prolifération du virus vivant (Isaacs and Lindenmann, 1957). Aujourd'hui 3 types d'interférons sont décrits : l'interféron de type I qui comprend les IFN-α/β/ϵ/κ/ω, l'interféron de type II ou IFN-γ et le plus récemment décrit, l'interféron de type III ou IFN-λ. Ce dernier est également produit en réponse aux infections virales. Il est actuellement testé dans le contrôle des infections par le virus de l'hépatite C. Ils se lient respectivement aux récepteurs IFNAR1/2, IFNAG1/2 et IFNLR1/IL10R2 (Tarhini et al., 2012).

L'IFN de type I présente des propriétés anti-tumorales. L'IFN-α inhibe directement la croissance des cellules tumorales en agissant comme un agent anti-angiogénique et cytostatique. Il peut également induire l'expression de gènes suppresseurs de tumeur et inhiber l'expression d'oncogènes. En plus de son action directe sur le tissu tumoral, l'IFN-α agit sur les cellules immunitaires en liant l'immunité innée et l'immunité adaptative (Ferrantini et al., 2007; Tarhini et al., 2012). L'IFN-α et l'IFN-β sont des agents immuno-modulateurs puissants qui augmentent les propriétés cytotoxiques des cellules NK (Biron et al., 1999). Liu et ses collaborateurs ont également démontré, dans un modèle murin, que les pDC stimulées par un ligand de TLR9 permettent le recrutement des cellules NK dans la tumeur et leur activation, qui fournissent en retour la matrice nécessaire aux DC myéloïdes pour réaliser la présentation croisée d'antigènes de tumeurs (Liu et al., 2008b). Le traitement des lymphocytes T par l'IFN-

α, *in vitro*, prolonge leur survie (Marrack et al., 1999), améliore leur expansion clonale et leur différenciation en cellules effectrices (Curtsinger et al., 2005). De même, *in vivo*, l'IFN-α est indispensable pour l'expansion clonale des LT CD4+ et CD8+ spécifiques d'antigènes pendant une infection virale, et est nécessaire à l'activation (priming) de LT CD8+ naïfs (Le Bon et al., 2006). Les IFN-α et -β induisent également la maturation des cellules dendritiques et potentialisent leur capacité à réaliser la présentation croisée d'antigènes.

Enfin, plusieurs études récentes ont démontré, dans des modèles murins, la nécessité de l'IFN de type I à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace (Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011). Cette réponse efficace est la résultante de l'action de l'IFN de type I, et particulièrement de l'IFN-β selon Gajewski et ses collaborateurs, des cellules dendritiques murines CD8α+, homologues des DC CD141+ humaines, et des lymphocytes T CD8+ spécifiques d'antigènes de tumeurs. Dans ces études, les auteurs démontrent que l'effet anti-tumoral de l'IFN de type I ne requiert pas la présence des lymphocytes NK, ni des granulocytes ou macrophages, mais que les DC CD8α+ sont la cible principale de l'IFN de type I. Les auteurs ont également pu mettre en évidence que l'effet de l'IFN de type I n'est pas redondant avec celui de l'IFN-γ. En inhibant de manière sélective l'expression du récepteur IFNAR de l'IFN-α/-β, ils ont pu démontrer que le développement de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques dirigés contre des antigènes de tumeurs requiert la signalisation de l'IFN-α/-β dans les DC CD8α+ pour potentialiser leur capacité de présentation croisée.

L'ensemble de ces travaux atteste du rôle central joué par l'IFN de type I et les cellules dendritiques dans la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale. L'effet de l'IFN de type I sur le recrutement des DC CD141+ humaines reste à évaluer.

iv. *Les pDC sont équipées pour acquérir des antigènes, réaliser la présentation croisée des antigènes*

Les pDC sont capables d'internaliser des formes variées d'antigènes, grâce à différents mécanismes, notamment la phagocytose et l'endocytose régulée par des récepteurs. Elles semblent toutefois internaliser les antigènes solubles moins efficacement que les mDC, probablement à cause d'une activité de macropinocytose plus faible. Cependant, il a été démontré qu'elles sont quand même capables de réaliser la présentation croisée à partir de cette source d'antigènes (Segura et al., 2013a; Tel et al., 2013b; Tel et al., 2012b). Les pDC ont également la capacité d'internaliser des antigènes à partir de cellules nécrotiques ou apoptotiques, et à réaliser la présentation croisée d'antigènes viraux (Hoeffel et al., 2007) et d'antigènes de tumeur (Tel et al., 2013b). Comme je l'ai évoqué dans le paragraphe dédié à la présentation

croisée, le mode d'acquisition des antigènes est une étape déterminante dans le processus de présentation croisée et détermine l'efficacité de ce processus. Les pDC sont équipées de nombreux récepteurs pouvant être utilisés pour l'internalisation par endocytose d'antigènes particulaires dérivés de cellules.

Les pDC expriment également certains récepteurs de la famille des Lectines de type C (C-type Lectin - CLR) qui reconnaissent des antigènes "décorés" par certains motifs glycosylés. BDCA2 (CD303) est un CLR exprimé de manière spécifique par les pDC (Dzionek et al., 2002). L'internalisation d'antigènes présentant des motifs glycosylés reconnus par BDCA2 conduit à leur présentation dans les molécules HLA-II. Toutefois, l'engagement du BDCA2 abolit la sécrétion d'IFN-α par stimulation TLR9, et l'engagement des TLR diminue l'expression de BDCA2 (Cao et al., 2007). Les pDC expriment d'autres CLR tels que DEC-205 et DCIR. L'engagement de ces deux récepteurs diminue la synthèse d'IFN-α par stimulation du TLR9 sans l'inhiber complètement. L'engagement des TLR diminue l'expression de DCIR, mais augmente l'expression de DEC-205. L'implication de ces récepteurs dans la présentation croisée par les mDC laisse à penser qu'ils pourraient avoir la même fonction sur les pDC.

L'équipe du Dr De Vries souhaite exploiter l'expression de ces récepteurs d'endocytose par les pDC pour développer une stratégie de ciblage *in vivo* des pDC. Le récepteur DCIR semble être une cible idéale puisqu'il permet l'internalisation des antigènes pour présentation sans abroger la sécrétion de cytokines par les pDC. De plus, Banchereau et ses collaborateurs ont démontré que toutes les populations de DC (mDC et pDC) "cross-présentent" les antigènes internalisés via DCIR. Ces propriétés seraient augmentées en présence d'un agoniste TLR7/8 (Klechevsky et al., 2010). Le ciblage de DCIR pour délivrer des antigènes et des agonistes TLR permettraient de recruter *in vivo* toutes les populations de DC du sang.

v. *Les pDC activées présentent des propriétés cytotoxiques*

En 2006, Plumas et ses collaborateurs ont démontré que les pDC peuvent, sous certaines conditions d'activation, acquérir des fonctions cytotoxiques et participer de manière directe à la lyse des cellules tumorales (Chaperot et al., 2006). Dans cette étude, les auteurs démontrent que les pDC, stimulées par des ligands synthétiques (R-848 et CpG-A) ou par le virus Influenza inactivé par la chaleur, expriment TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand). La molécule TRAIL induit l'apoptose des cellules cibles qui expriment les récepteurs DR4 et DR5 (Death Receptor 4 et 5). L'expression de TRAIL est induite par une sécrétion autocrine et paracrine d'IFN de type I par les pDC stimulées par les agonistes

TLR. L'IFN-α/-β est impliqué dans l'expression de TRAIL. En revanche, l'IFN-γ n'est pas impliqué dans l'expression de cette molécule. Les pDC TRAIL+ induisent la lyse des cellules tumorales cibles DR4/5 positives à parti d'un ratio (E:T) 15:1. L'IFN de type I stimule l'expression de DR4 et DR5 sur les cellules cibles et les sensibilise à la lyse par les pDC TRAIL+.

Depuis, d'autres équipes ont rapporté l'acquisition de fonctions cytotoxiques par les pDC activées par des agonistes TLR. De Vries et ses collaborateurs ont récemment démontré que les pDC humaines présentent des propriétés lytiques directes contre les cellules tumorales suite à leur activation par un ligand naturel du TLR7, le virus vaccinal de l'encéphalite à tique (Früh Sommer Meningo-Enzephalitis -FSME). Les auteurs mettent en évidence l'expression, par les pDC exposées au FSME, des molécules cytotoxiques TRAIL et Granzyme B, ainsi que l'expression du marqueur des cellules NK CD56. En coculture, ces pDC cytotoxiques induisent la lyse spécifique de cellules tumorales cibles pour un ratio (E:T) de 20:1 au bout de 18h, et de 10:1 au bout de 66h de coculture. De manière étonnante, dans cette étude, l'inhibition des molécules cytotoxiques par des anticorps bloquants anti-TRAIL et anti-Granzyme B ne permet pas d'inhiber la lyse des cellules cibles par les pDC (Tel et al., 2012a).

Enfin, dans un modèle murin de mélanome, Sibilia et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'application locale d'une crème formulée à 5% d'Imiquimod permet non seulement l'acquisition de propriétés cytotoxiques par les pDC mais participe également au recrutement des pDC dans la tumeur (Drobits et al., 2012). L'engagement du TLR7 des mastocytes infiltrés dans la tumeur cutanée induit une forte sécrétion de la chimiokine CCL2, qui conduit au recrutement des pDC exprimant le récepteur spécifique CCR2. Sur place, les pDC sont à leur tour exposées à l'agoniste TLR7 qui les active, stimule la synthèse d'IFN de type I et induit l'expression des molécules cytotoxiques TRAIL et Granzyme-B. L'IFN de type I agit également sur les cellules de mélanome en stimulant l'expression des récepteurs DR4 et DR5, les rendant ainsi plus sensibles à la lyse par TRAIL. Dans cette étude, les auteurs démontrent que l'effet anti-tumoral de l'Imiquimod est lié à l'activation des propriétés cytotoxiques des pDC, plutôt qu'à l'activation d'autres cellules de l'immunité innée ou adaptative par l'IFN de type I sécrété par les pDC ou à l'effet cytotoxique direct de l'IFN de type I sur la croissance tumorale (Drobits et al., 2012). La cytokine CCL2 produite par un grand nombre de cellules tumorales, impliquée dans le recrutement de cellules suppressives (TAM) et associée à un mauvais pronostic (voir § Les pDC sont recrutées dans les tumeurs), pourrait jouer paradoxalement un rôle central dans le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale impliquant les pDC. En effet, le CCL2 pourrait induire leur recrutement dans la tumeur et permettre l'activa-

tion, sur site, de leurs propriétés anti-tumorales par un agoniste du TLR7 (Jimenez-Baranda et al., 2012).

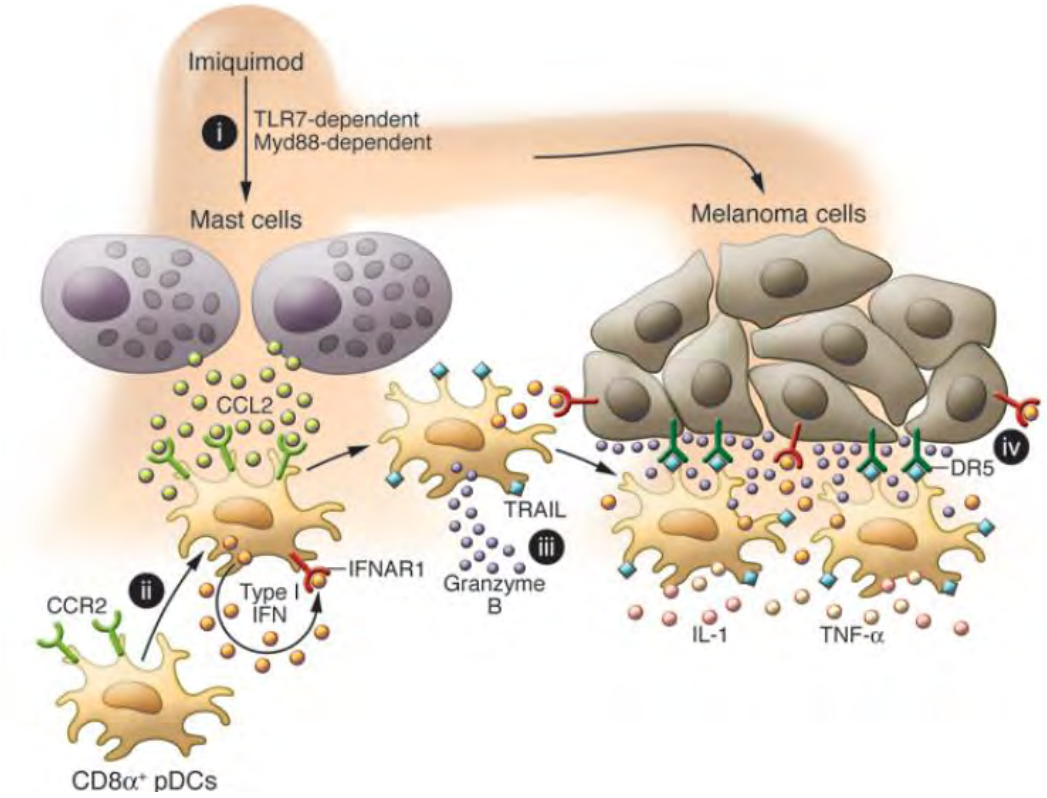


Figure 15 : Acquisition de fonctions cytotoxiques par les pDC exposées à l'Imiquimod (Jimenez-Baranda et al., 2012). (i) L'application locale d'Imiquimod stimule la production TLR7 dépendante de la chimiokine CCL2 par les mastocytes. (ii) Les pDC migrent dans la tumeur suivant le gradient de CCL2 et sont exposées à l'Imiquimod dans la tumeur. (iii) Les pDC activées synthétisent de grandes quantités d'IFN-α/-β qui permet l'expression des molécules cytotoxiques TRAIL et Granzyme-B par une boucle autocrine/paracrine. (iv) L'IFN-α/-β synthétisé par les pDC induit l'expression des récepteurs de TRAIL sur les cellules tumorales (DR4 et DR5) et les sensibilisent à la lyse par les pDC TRAIL+.

vi. *Utilisation clinique des pDC*

Des stratégies de traitement du cancer visant à stimuler les pDC se développent. La crème formulée à 5% d'Imiquimod (ligand de TLR7) a reçu une autorisation de mise sur le marché et est commercialisée sous le nom d'Aldara. Son application est indiquée dans le traitement de carcinomes basocellulaires superficiels, de carcinomes à cellules squameuses et de kératoses actiniques (Smits et al., 2008). Georg Stary et ses collaborateurs ont confirmé chez des patients atteints de carcinomes basocellulaires traités par applications locales de crème formulée à 5% d'Imiquimod, les données obtenues chez la souris (Stary et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs observent une forte infiltration de pDC entourant les cellules tumorales suite au traitement. Les pDC dans les lésions tumorales présentent un marquage positif pour la

molécule cytotoxique TRAIL, mais ne présentent pas de marquage pour la molécule Granzyme-B alors que leurs homologues circulantes expriment cette molécule. L'infiltrat immunitaire intra-tumoral suite à l'application de la crème comprend également des LT CD8+ et des cellules NK. De manière surprenante, ces cellules n'expriment pas de molécules cytotoxiques Granzyme B ou perforine. L'absence de marquage Granzyme B ou perforine peut être dû au fait que les analyses sur coupe de tumeur ont été réalisées 15 jours après traitement. Ces cellules ont peut-être déjà libéré le contenu de leurs granules cytotoxiques au moment de l'analyse. Dans cette étude, les auteurs démontrent également que les mDC peuvent acquérir des fonctions cytotoxiques après avoir été stimulées par un agoniste des TLR7/8 en exprimant le Granzyme B et la perforine.

Très récemment, les résultats du premier essai clinique de phase I, réalisé par l'équipe du Dr De Vries et utilisant les pDC dans une stratégie de vaccination anti-tumorale, ont été publiés (Tel et al., 2013a). Dans cette étude, les auteurs ont réalisé au moins trois injections à 15 jours d'intervalle de 0.3 à 3 millions de pDC autologues activées et chargées avec différents épitopes des antigènes de tumeur de différenciation mélanocytaire gp100 et tyrosinase, à 15 patients HLA-A*0201 présentant un mélanome métastatique. Les pDC ont été activées pendant 6 heures en présence du FSME, un ligand naturel du TLR7, et l'injection des pDC a été réalisée directement dans un ganglion lymphatique afin d'optimiser les chances de "priming" de LT CD8+ spécifiques. Quarante-huit heures après l'injection des pDC, les auteurs ont observé la migration des pDC dans des ganglions distants, ce qui contraste avec les essais cliniques réalisés avec des DC dérivées de monocytes qui ont tendance à rester au site d'injection. Les pDC injectées sécrètent de l'IFN-α et induisent l'expression de gènes dépendants de l'IFN par les PBMC tels que PKR et IRF7. Les auteurs ont mis en évidence la synthèse d'anticorps anti-FSME et une prolifération de LT CD4+ FMSE-dépendant, démontrant le priming de Lymphocytes B et de T CD4+ spécifiques par les pDC injectées. Enfin, les auteurs ont mis en évidence, grâce à une restimulation *in vitro* et un test d'hypersensibilité retardée cutanée (DTH skin), le développement d'une réponse LT CD8+ spécifique de l'antigène de tumeur gp100. La vaccination utilisant des pDC activées et chargées par des antigènes de tumeur a permis une amélioration statistiquement significative de la survie globale des patients traités (22 mois) par rapport au traitement conventionnel par Dacarbazine (7,2 mois). Deux ans après le début du traitement, 7 des 15 patients vaccinés avec les pDC étaient en vie contre 6 patients sur 72 dans le groupe traité par Dacarbazine.

Actuellement, une autre stratégie de vaccination anti-tumorale dans le mélanome utilisant des pDC est développée dans un essai de phase I/II conduit par l'Etablissement Français

du Sang et le CHU de Grenoble, France. Cette stratégie comprend l'injection d'une lignée HLA-A*0201 de pDC (GeniusVac-Mel4) irradiée et pulsée avec différents antigènes de tumeurs (MelanA/MART-1, gp100/pmel17, tyrosinase, et MAGE-A3). Les patients HLA-A*0201+ recevront des doses de 4, 20 ou 60 millions de pDC pulsées, injectées en sous-cutané. Trois patients seront recrutés pour chaque groupe de dose. Les objectifs de cet essai clinique, dont les résultats ne sont pas publiés, sont l'évaluation de la tolérance aux injections (Dose maximale tolérée), et l'évaluation de la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment l'étude de la fréquence et de la fonctionnalité des LT CD8+ spécifiques de chacun des antigènes pulsés sur les pDC (http://clinicaltrials.gov).

V. Objectifs de la thèse

Les travaux de notre équipe, dirigée par le Dr Marc Grégoire, se concentrent sur le développement de stratégies visant à déclencher une mort immunogène des cellules tumorales en utilisant notamment les propriétés oncolytiques du virus de la rougeole. Cette étude est réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr Frédéric Tangy de l'unité "Génomique Virale et Vaccination" de l'Institut Pasteur de Paris.

Les travaux précédents de notre équipe ont démontré l'efficacité cytotoxique de la souche vaccinale Schwarz du virus de la rougeole sur des lignées de cellules tumorales de Mésothéliome Pleural Malin (MPM), une pathologie qui se développe au niveau de la plèvre suite à une exposition aux fibres d'amiante et pour laquelle il n'existe pas de traitement efficace (Gauvrit et al., 2008). Les travaux du Dr Anne Gauvrit ont également démontré que l'infection des cellules tumorales par le MV induit la libération de motifs moléculaires associés au danger (DAMP) par les cellules tumorales, responsables de l'activation des programmes de maturation et de présentation d'antigènes des cellules dendritiques dérivées de monocytes (Mo-DC).

Ces dernières années, les preuves expérimentales et cliniques démontrant que les pDC peuvent participer à l'établissement d'une réponse immunitaire spécifique d'antigènes de tumeur s'accumulent. L'ensemble des propriétés anti-tumorales des pDC repose sur leur capacité à être activées fortement par des agonistes des TLR7 et TLR9 naturels (acides nucléiques viraux) ou synthétiques. Les travaux que j'ai effectués dans le cadre de mon doctorat portent sur l'étude des propriétés oncolytiques du virus atténué de la rougeole vis-à-vis des cellules tumorales, et l'étude de ses propriétés immuno-adjuvantes sur les pDC. Les objectifs de mon travail de thèse ont donc été de :

1) Caractériser les propriétés oncolytiques du MV sur des lignées cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires et colorectaux en analysant l'expression des récepteurs d'entrée connus, la cinétique d'infection et l'induction de la mort des cellules infectées *in vitro*, et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffes de tumeurs humaines.

2) Étudier les propriétés adjuvantes du MV sur les pDC, en analysant l'effet des cellules tumorales infectées sur la maturation des pDC, leur sécrétion d'IFN-α, et en déterminant le ou les récepteurs impliqués dans ces événements. De plus, après la mise au point d'un modèle de présentation croisée de l'antigène de tumeur NY-ESO-1, l'étude des capacités des pDC

à "cross-présenter" cet antigène à partir de cellules tumorales infectées ou induites en apoptose par irradiation UV-B a pu être réalisée.

RÉSULTATS

VI. Article n°1 : "Natural Oncolytic Activity of Live-Attenuated Measles Virus against Human Lung and Colorectal Adenocarcinomas"

A. Résultats principaux

Le virus atténué de la rougeole est proposé comme agent oncolytique pour infecter et lyser les cellules tumorales sans affecter les cellules saines. Les travaux précédents de l'équipe ont mis en évidence les propriétés oncolytiques du virus atténué (souche Schwarz) de la rougeole (MV) contre des lignées de cellules tumorales de mésothéliome pleural malin. Par ailleurs, l'action oncolytique du MV a été démontrée contre d'autres types de tumeurs dont les lymphomes, glioblastomes, le myélome multiple, les cancers ovariens ou le mélanome. Dans cette étude, nous avons étudié *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe tumorale, l'activité oncolytique du MV contre des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires et colorectaux.

Nous avons mis en évidence que les cellules de ces deux types de cancers expriment toutes la molécule CD46, le récepteur principal du MV, et que son niveau d'expression est hétérogène entre les lignées cellulaires. Les lignées étudiées sont efficacement infectées à 72h post-infection *in vitro.* L'infection conduit à la mort des cellules tumorales, caractérisée par une augmentation du marquage Annexine-V. Afin de confirmer, *in vivo,* les résultats obtenus *in vitro,* nous avons développé un modèle de xénogreffe de cellules tumorales humaines sur des souris *nude.* Une injection intra-tumorale unique de $1{,}5.10^7$ $TCDID_{50}$ de MV a permis de contenir l'augmentation du volume de tumeurs colorectales (Caco-2) largement établies (100 à 200 mm^3), chez les animaux traités pendant 31 jours. Trois injections intra-tumorales de $1{,}5.10^7$ $TCDID_{50}$ de MV ont permis de contrôler la croissance du volume des xénogreffes de cellules tumorales humaines A549 pendant 42 jours. Enfin, l'effet anti-tumoral du MV *in vivo,* sur les xénogreffes de cellules humaines colorectales Caco-2, est associé à une forte activation de la caspase-3 dans les tumeurs des animaux traités, alors que l'effet anti-tumoral du MV sur les xénogreffes de cellules tumorales humaines d'adénocarcinome pulmonaire A549 n'est pas associé à l'expression de la caspase-3 dans les tumeurs traitées.

Nos résultats démontrent que le virus atténué de la rougeole permet de contrôler le développement de carcinomes pulmonaires et colorectaux largement établis dans un modèle de xénogreffes de tumeurs humaines. Ces résultats fournissent de nouveaux arguments en

faveur de l'utilisation du virus atténué de la rougeole en tant qu'agent oncolytique dans le traitement de cancers agressifs.

B. Article

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2013, Article ID 387362, 11 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2013/387362

Research Article

Natural Oncolytic Activity of Live-Attenuated Measles Virus against Human Lung and Colorectal Adenocarcinomas

Nicolas Boisgerault,[1,2,3] Jean-Baptiste Guillerme,[1,2,3] Daniel Pouliquen,[1,2,3] Mariana Mesel-Lemoine,[4] Carole Achard,[1,2,3] Chantal Combredet,[4] Jean-François Fonteneau,[1,2,3] Frédéric Tangy,[4] and Marc Grégoire[1,2,3]

[1] INSERM, UMR892, 44000 Nantes, France
[2] CNRS, UMR6299, 44000 Nantes, France
[3] Université de Nantes, 44000 Nantes, France
[4] Unité de Génomique Virale et Vaccination, CNRS-URA 3015, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

Correspondence should be addressed to Marc Grégoire; marc.gregoire@nantes.inserm.fr

Received 11 October 2012; Revised 30 December 2012; Accepted 14 January 2013

Academic Editor: Changqing Su

Copyright © 2013 Nicolas Boisgerault et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Lung and colorectal cancers are responsible for approximately 2 million deaths each year worldwide. Despite continual improvements, clinical management of these diseases remains challenging and development of novel therapies with increased efficacy is critical to address these major public health issues. Oncolytic viruses have shown promising results against cancers that are resistant to conventional anticancer therapies. Vaccine strains of measles virus (MV) exhibit such natural antitumor properties by preferentially targeting cancer cells. We tested the ability of live-attenuated Schwarz strain of MV to specifically infect tumor cells derived from human lung and colorectal adenocarcinomas and demonstrated that live-attenuated MV exhibits oncolytic properties against these two aggressive neoplasms. We also showed that Schwarz MV was able to prevent uncontrollable growth of large, established lung and colorectal adenocarcinoma xenografts in nude mice. Moreover, MV oncolysis is associated with in vivo activation of caspase-3 in colorectal cancer model, as shown by immunohistochemical staining. Our results provide new arguments for the use of MV as an antitumor therapy against aggressive human malignancies.

1. Introduction

Lung and colorectal cancers are leading causes of death worldwide with approximately 1.6 million and 1.2 million new cases per year resulting in 1.4 million and 610,000 estimated deaths, respectively [1]. In developed countries, lung cancers rank first for males and second for females in overall cancer-related deaths while colorectal cancers rank second for male and third for female. These cancers are found to be extremely resistant to conventional therapies including surgery, chemotherapy, and radiotherapy with a 5-year survival of only 15% and 50%, respectively.

Difficult clinical management of these two malignancies makes them ideal candidates for development of alternative approaches such as cancer virotherapy [2–5]. Live-attenuated vaccinal strains of measles virus (MV) are of particular interest due to their ability to specifically target different types of human tumors [6, 7] through recognition of the CD46 membrane complement regulatory molecule [8, 9] which is frequently overexpressed on cancer cells [10]. Oncolytic viruses are also powerful inducers of tumor cell death and thus could help to cure cancers that are refractory to conventional treatments. Furthermore, in addition to inducing cell death, the infection of tumor cells by MV is able to activate components of the antitumor immune response, such as myeloid and plasmacytoid dendritic cells, that may play a role in the efficacy of cancer virotherapy [6, 11].

Several Phase I clinical trials targeting different cancers with MV virotherapy are in progress and two of them have been published. In the initial Phase I clinical trial, intratumoral injection of low doses of MV into five patients with cutaneous-T-cell-lymphoma, patients induced stabilization

of the disease in two patients and a partial response in one [12]. The authors of the second published Phase I clinical trial, carried out in patients with refractory ovarian cancers [13], noticed a dose-dependent biological activity of oncolytic MV. They also reported that the treatment was well tolerated, thus confirming previous reports that demonstrated the safety of using live-attenuated vaccinal strains of MV in the clinical setting.

Sparse data from the literature show that wild-type MV is able to infect some human lung and colorectal adenocarcinoma cells [14, 15]. MV fusogenic membrane glycoproteins by themselves were also demonstrated to improve treatment of human colorectal cancer xenografts when used in combination with chemotherapy or virotherapy [16]. Moreover, urokinase receptor-retargeted MV was shown to display oncolytic activity against murine colorectal cancer cells in vivo [17]. However, whereas MV virotherapy has been tested against a wide variety of human cancers, no comprehensive work has been achieved until now to investigate how oncolytic strains of MV target human lung and colorectal adenocarcinomas.

To our knowledge, we demonstrate here for the first time that live-attenuated Schwarz vaccinal strain of MV is able to specifically infect and kill tumor cells derived from human lung and colorectal adenocarcinomas, both in vitro and in vivo against large tumor burdens. Specifically, these oncolytic properties are associated with in vivo activation of caspase-3. Altogether, our results confirm the ability of oncolytic MV to target aggressive neoplasms and thus provide new perspectives for the treatment of two major malignancies.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture. ADK3, ADK117, and ADK153 lung adenocarcinoma cell lines were established in our laboratory from pleural effusions collected by thoracocentesis of cancer patients, with their informed consent, and genetically characterized [18]. The A549 lung adenocarcinoma, Caco-2, HT29, SW480, and SW620 colorectal adenocarcinoma cell lines were purchased from ATCC. All cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin (all purchased from Gibco). Normal bronchial epithelial cells (BEC) were obtained from a healthy lung graft (Dr Magnan, INSERM UMR 915, Nantes) and cultured in CnT-17 medium (CELLnTEC, Switzerland). Cells were cultured at 37°C in a humidified, 5% CO_2 atmosphere and were routinely checked for Mycoplasma contamination by PCR.

2.2. In Vitro Measles Virus Infection. Live-attenuated Schwarz vaccinal strain of measles virus recombinant for enhanced green fluorescent protein (MV-eGFP) was produced as previously described [19] and titered on Vero cells ($TCID_{50}$/mL). In vitro infections were performed at MOI = 1.0 $TCID_{50}$ for 2 h at 37°C. Viral inoculum was then replaced by fresh culture medium with no further renewal during the experiments.

2.3. Time-Lapse Microscopy. All experiments were performed at the Cellular and Tissular Imaging Core Facility (MicroPICell, IFR26, Nantes, France) using a Leica DMI6000B station. Images were acquired every 15 min for 72 hours with MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis Software (Molecular Devices) and further treated with ImageJ (National Institute of Health).

2.4. Cell Death Analysis. Percentages of dying cells were determined 3 days after infection using the Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences) following manufacturer's instructions. Briefly, cells were double stained with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) for 15 min and analyzed by flow cytometry within 1 hour.

2.5. Flow Cytometry. Cells were incubated for 30 min with FITC-conjugated anti-CD46, PE-conjugated anti-CD150/SLAM (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), or PE-conjugated anti-Nectin-4 (R&D Systems Europe, Lille, France) antibodies in PBS/0.1% BSA for extracellular staining. Cells were then washed 3 times with PBS before analysis by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences).

2.6. Animal Model and In Vivo Experiments. All in vivo experiments complied with European Union regulations on the welfare and use of animals in cancer research. Six-week-old female RjNMRi-nu nude mice were purchased from Centre d'Élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were challenged subcutaneously with 10^6 tumor cells in the left flank. When volumes reached approximately 150–200 mm^3 for Caco-2 or 100 mm^3 for A549, MV-eGFP (1.5×10^7 $TCID_{50}$) or saline buffer (PBS) was injected intratumorally (50 μL). Tumors were measured twice weekly with a microcaliper and tumor volumes were calculated using the (length^2 × breadth)/2 formula. Animals were sacrificed when tumors reached 1-2 cm^3 in volume. Tumors were then harvested, fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) and embedded in paraffin wax.

2.7. Immunohistochemistry. Immunohistochemical stainings were performed by the MicroPICell core facility with a Bond Max automaton (Menarini, Rungis, France). Briefly, paraffin-embedded tumor slides were incubated in a demasking citrate buffer (pH = 6.0) before blocking of endogenous peroxidase for 5 min. Slides were then incubated for 1 h with a polyclonal, rabbit anti-active-caspase-3 antibody (Abcam, Paris, France) diluted to 1:50 and subsequently with Histofine Rabbit-to-Mouse secondary antibody (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan). After 10 min 3,3′-Diaminobenzidine (DAB) incubation, tumors were counterstained with hematoxylin. Slides were analyzed using a Leica DM2500 microscope coupled to a Leica DCF295 camera. Images were acquired with Leica Application Suite Version 3 software.

2.8. Statistical Analyses. One-sided, unpaired Mann-Whitney t-test was used to compare groups in the in vivo

experiments. Differences were considered significant when $^{*}p < 0.05$ or $^{**}p < 0.01$. All data are presented as mean ± SEM.

3. Results

3.1. Human Adenocarcinoma Cells Are Efficiently Infected by MV. Cancer cells derived from human lung and colorectal adenocarcinomas were first infected with live-attenuated Schwarz strain of MV recombinant for EGFP (MV-eGFP) to test their sensitivity to oncolytic MV. We infected four different colorectal adenocarcinoma cell lines and showed that they were all susceptible to MV infection (Figure 1(a)). Whereas SW480 and metastatic SW620 cells showed high infection yield after 3 days with 87% and 93% of cells infected, respectively, we observed less $EGFP^+$ HT29 (51%) and Caco-2 (37%) cells at the same time point. To determine how MV infection spreads in these two cell lines, we further analyzed MV infection by time-lapse microscopy. In Caco-2 culture, infection progressed slowly despite tight cell interactions and typical syncytia formation resulting from fusion of infected tumor cells with neighboring cells (Figures 1(b) and S1). On the other hand, HT29 cells underwent a rapid oncolytic process with infected cells dying shortly after infection (not shown). We observed with fluorescent microscopy that HT29 cell death resulted in the release of EGFP in the extracellular medium, especially at 72 h, thus lowering the amount of $EGFP^+$ cells determined by flow cytometry (not shown).

We also tested oncolytic properties of MV against one commercial (A549) and three (ADK3, ADK117, and ADK153) lung adenocarcinoma cell lines obtained in our laboratory. These cell lines exhibited heterogeneous infection rates following exposure to MV-eGFP. While A549 and ADK153 cells were efficiently infected with 88% and 65% $EGFP^+$ cells after 72 h, respectively, infection spread slowly in ADK3 cells with only 29% of infected cells at the same time (Figure 1(a)). ADK117 cells were found to be resistant to infection with only 6% of infected cells at 72 h after infection. Time-lapse experiments confirmed efficient infection of A549 cells by MV, even though only minimal syncytia formation was observed (Figures 1(b) and S2). On the contrary, normal bronchial epithelial cells (BEC) were not infected by MV (0.4% at 72 h, MOI = 1, data not shown). Thus, our results show that 4 out of 4 colorectal and 3 out of 4 lung adenocarcinoma tested cell lines, but not normal epithelial cells, are sensitive to live-attenuated MV infection.

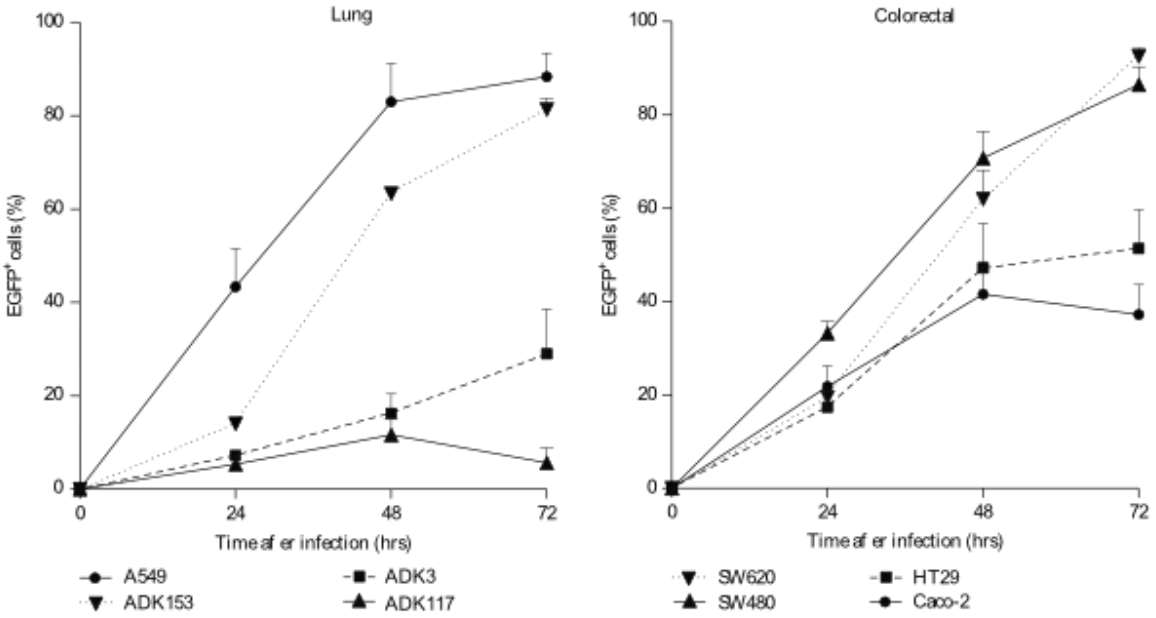
3.2. MV Induces Cell Death of Infected Lung and Colorectal Cancer Cells. To further investigate oncolytic properties of MV against lung and colorectal cancer cells, we studied the ability of the virus to induce death of the infected cells. We initially characterized MV-related cytopathic effects by fluorescence microscopy. As expected, MV infection induced the formation of giant, multinucleated cells, namely, syncytia, in colorectal adenocarcinoma cells (Figures 1(b) and S1). Ultimately, MV infection caused detachment of MV-induced syncytia from the plate support, thereby demonstrating the induction of tumor cell death by MV infection. Infected A549 lung adenocarcinoma cells only formed small syncytia resulting from fusion of two to five tumor cells, though these cells were eventually driven to apoptotic-like cell death, as shown by consistent observations of plasma membrane blebbing (Figures 1(b) and S2).

To better characterize the cell death induced after MV infection, we performed annexin-V/propidium iodide double staining (Figure 1(c)). Oncolytic MV infection efficiently induced cell death in A549, ADK153, Caco-2, HT29, SW480, and metastatic SW620 cells as shown by a substantial increase of annexin-V^+ cell percentages compared to uninfected cells. Conversely, death induction in ADK3 and ADK117 cells was minimal, consistent with the relatively low infection rates observed in previous experiments (Figure 1(a)). Thus, analysis of cell death induction demonstrates that oncolytic MV effectively kills infected cancer cells derived from human lung and colorectal adenocarcinomas through an apoptotic-like process.

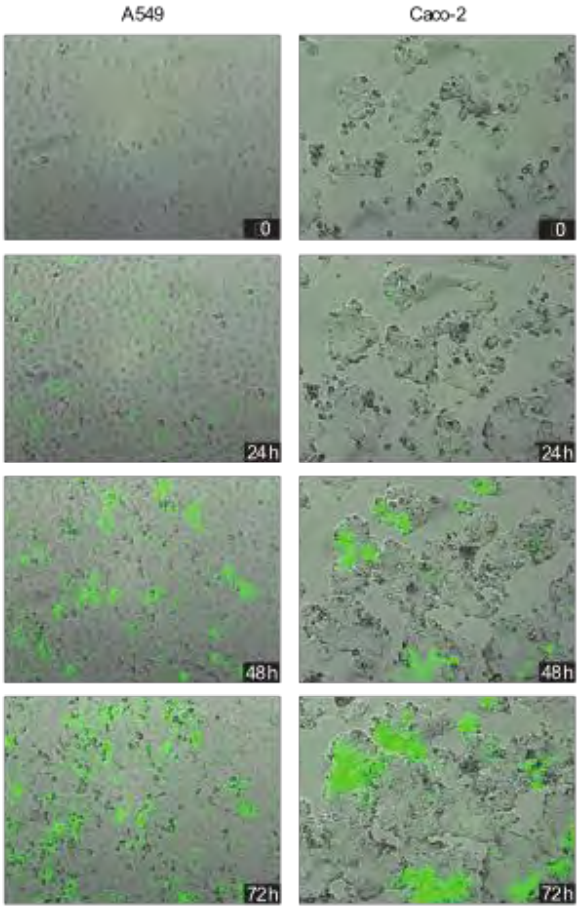
3.3. CD46 Is Highly Expressed in Lung and Colorectal Cancer Cell Lines. Despite recent advances in the identification of MV cellular receptors [14, 20], CD46 is still considered to be critical in determining the sensitivity of tumor cells to oncolytic strains of MV. As expected, a majority of efficiently infected tumor cells exhibited a high CD46 surface level (Figures 2(a) and 2(b)). Indeed, A549 (MFI = 159), Caco-2 (115), HT29 (255), SW480 (227), and SW620 (219) were efficiently infected and killed, which is consistent with their high expression of the CD46 receptor. Interestingly, CD46 expression analysis was not sufficient to predict the infection levels of some lung adenocarcinoma cell lines. For instance, fairly high levels of CD46 were expressed on ADK3 (MFI = 66) and ADK117 (68) but these cells were less efficiently infected than ADK153 cells which exhibit low CD46 expression (MFI = 45). Consistent with their resistance to infection, normal bronchial epithelial cells barely expressed CD46 (MFI = 21).

To better determine which receptor(s) were involved in the infection of these lung adenocarcinoma cell lines, we subsequently screened them for expression of CD150/SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) and Nectin-4 receptors. CD150/SLAM is known to be involved in the infection of immune cells by wild-type MV [21] while Nectin-4 has been recently described as essential for host-to-host spread of MV [20, 22]. None of the tumor cell lines studied in our experiments exhibited CD150/SLAM expression (Figure 2(a)) and Nectin-4 was only found to be weakly expressed on HT29 cells (Figures 2(a) and 2(c)) as determined by flow cytometry.

3.4. In Vivo Oncolytic Activity of MV. To confirm our in vitro results regarding oncolytic properties of live-attenuated MV, we studied the ability of the virus to efficiently target and kill human lung and colorectal adenocarcinoma subcutaneous xenografts in vivo in nude mice (Figure 3). As our ultimate goal is to develop therapy against aggressive established tumors, we decided to treat large (100 to 200 mm^3) A549 and Caco-2 tumors.



(a)



(b)

Figure 1: Continued.

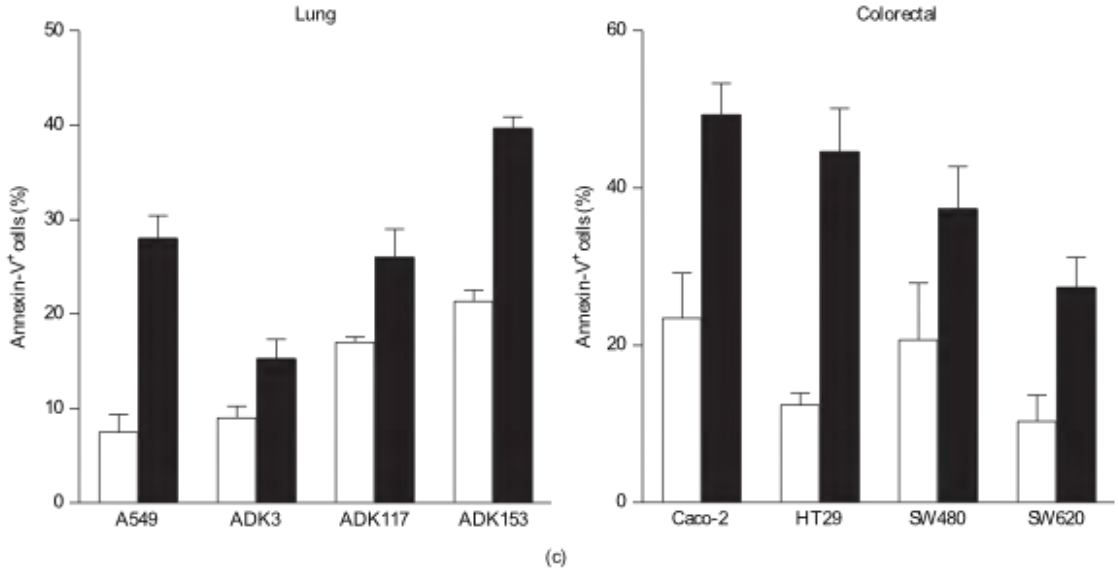


Figure 1: In vitro oncolytic properties of measles virus against human adenocarcinomas. (a) One million human lung or colorectal adenocarcinoma cells were infected in vitro with a live-attenuated strain of MV recombinant for EGFP (MV-eGFP; MOI = 1). Percentages of infected cells ($EGFP^+$) were determined by flow cytometry at 24, 48, and 72 h after infection. Data are presented as mean ± SEM, ($n = 3$). (b) Infected cells were observed for 72 h by time-lapse microscopy to study cytopathic effects of MV infection. Complete experiments are presented in Figures S1 (Caco-2) and S2 (A549) in Supplementary Material available online at http://dx.doi.org/10.1155/2013/387362. (c) Human lung and colorectal adenocarcinoma cells were either infected with live-attenuated MV (MOI = 1, black bars) as described above or left uninfected (white bars). Cells were cultured for 72 h without medium renewal. Cells were then double stained with annexin V/propidium Iodide and analyzed by flow cytometry.

Human Caco-2 colorectal adenocarcinomas xenografts were treated by a single intratumoral injection of oncolytic MV (1.5×10^7 $TCID_{50}$). Whereas we previously observed slow transmission of the virus in vitro for this cell line (Figure 1), a single injection of the virus resulted in growth arrest of the tumor for up to 31 days (Figure 3(a)). Conversely, tumor growth was constant in mice treated with control saline buffer (PBS). After 31 days, significant differences were observed between control and MV-treated mice regarding either tumor volumes ($1434 \pm 246\,mm^3$ versus $403 \pm 86\,mm^3$; $p < 0.05$; Figure 3(a)) or tumor weights (960 ± 211 mg versus 347 ± 89 mg; $p < 0.05$; Figure 3(b)).

Treatment of human A549 lung adenocarcinoma xenografts using identical experimental settings was not found to be effective. Indeed, even though MV induced a delayed tumor growth, we did not obtain any significant difference between PBS- ($668 \pm 147\,mm^3$) and MV-treated ($484 \pm 154\,mm^3$) mice (Figure 3(a)). This could be explained by the higher proliferation capacities of A549 cells as observed previously by time-lapse microscopy (Figure S2). Considering that steady proliferation of A549 cells could result in reduced viral particles/cells ratio into the tumor, we decided to carry out multiple injections of oncolytic MV by performing three extra intratumoral MV injections at days 22, 28, and 35 after the initial injection. This treatment schedule efficiently stopped tumor growth, as shown by the differences in tumor volumes between control animals ($668 \pm 147\,mm^3$) and multiple-injections group ($231 \pm 36\,mm^3$; $p < 0.05$) at day 42 (Figure 3(a)). At this point, tumors were weighed and tumor masses were found to be significantly different between control and MV-treated mice (350 ± 67 mg versus 169 ± 11 mg; $p < 0.01$; Figure 3(b)).

3.5. MV Infection Induces Caspase-3 Activation in Colorectal Tumor Cells. Cell death triggered by MV infection has been previously described to be apoptosis [23]. Our results above are consistent with these observations as we found increased percentages of annexin-V^+/PI^- lung and colorectal carcinoma cells following MV infection (Figure 1(c)). To investigate induction of apoptotic tumor cell death in vivo, we analyzed activation of caspase-3 in MV-treated and PBS-injected tumors by immunohistochemistry (Figure 4). Caspase-3 is involved in late events of apoptosis and thus can be activated by both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways.

Caco-2 colorectal tumors grew in a specific way by forming round structures as shown by microscopy (Figures 1(b) and S1). In control mice, we observed minimal caspase-3 activation in the centers of these structures, which could be related to hypoxia or nutrient deprivation (Figure 4). In contrast, we observed strong activation of caspase-3 in MV-treated tumors, likely as a result of in vivo oncolytic activity of MV against Caco-2 colorectal adenocarcinoma cells. This

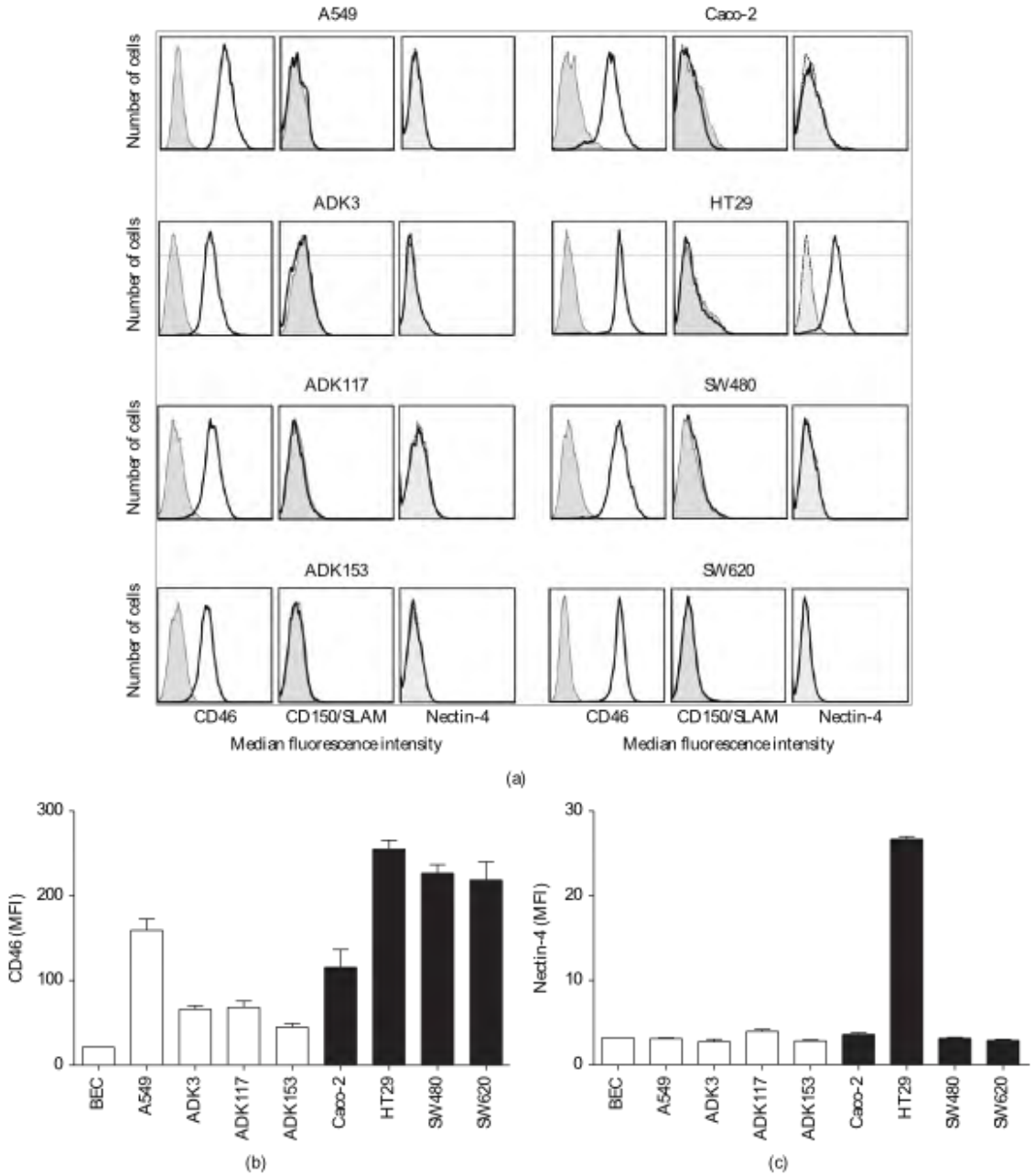


Figure 2: Expression of CD46 and CD150/SLAM receptors on human adenocarcinoma cells. (a) Lung (left) and colorectal (right) tumor cell lines were stained with anti-CD46-FITC, anti-CD150/SLAM-PE, and anti-Nectin-4-PE antibodies (thick black lines) in PBS/0.1% BSA for 30 min before analysis by flow cytometry. Isotypic stainings are shown as grey filled curves. (b)-(c) CD46 (b) and Nectin-4 (c) expression levels were determined for each lung (white bars) or colorectal (black bars) tumor cell line in three independent experiments. Expression levels of CD46 and Nectin-4 for normal bronchial epithelial cells (BEC) are indicated. MFI: median fluorescence intensity.

strong and extended activation of caspase-3 throughout the tumor correlates with significant tumor growth arrest (Figure 3(a)). We did not observe any activation of caspase-3 in control and MV-infected A549 tumors (not shown).

4. Discussion

We report here that Schwarz live-attenuated vaccinal strain of measles virus (MV) exhibits both in vitro and in vivo

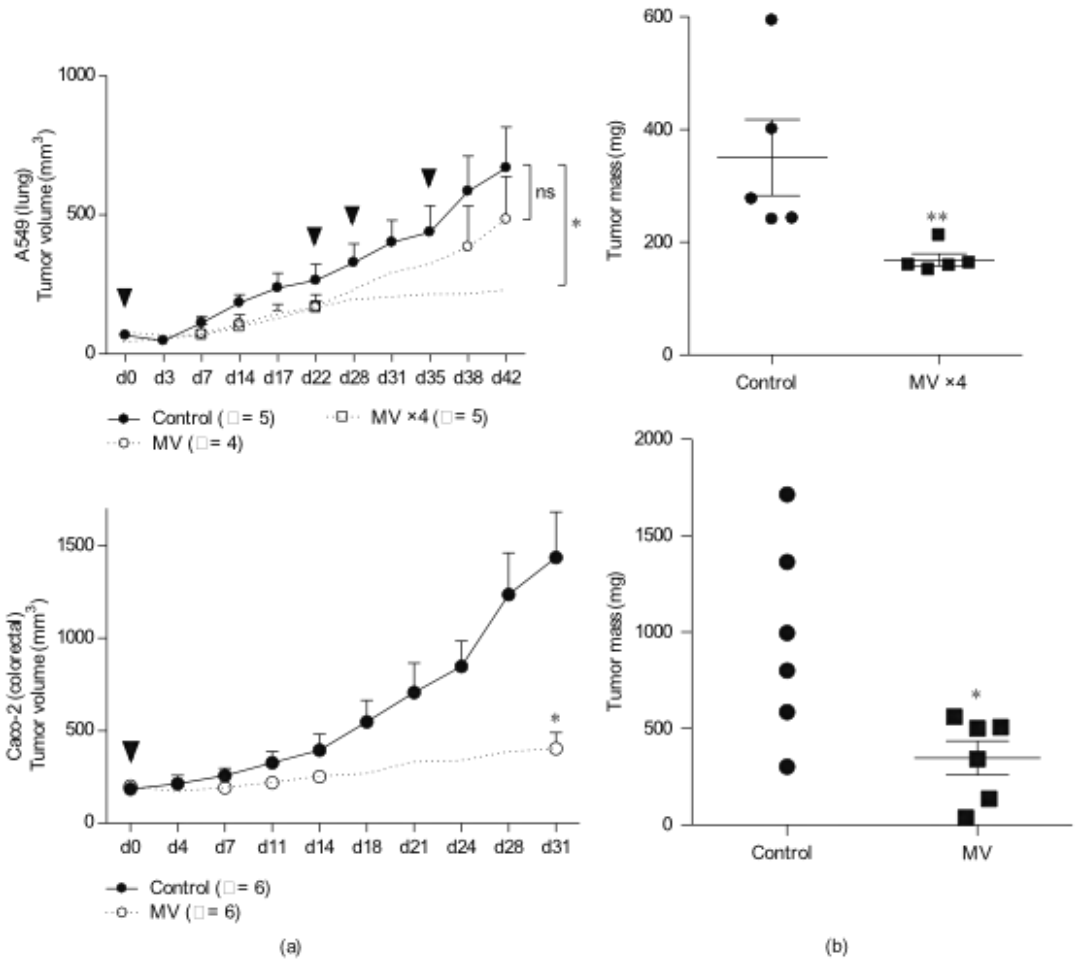


Figure 3: Measles virus exhibits oncolytic properties against human adenocarcinomas in vivo. (a) Nude mice were challenged subcutaneously with 1 million A549 (lung) or Caco-2 (colorectal) human adenocarcinoma cells. When tumors reached a volume of 100 mm^3 for A549 or 150–200 mm^3 for Caco-2, MV-eGFP or PBS was injected intratumorally (day 0, 1.5 × 10^7 $TCID_{50}$). Tumor volumes were measured twice weekly. Additional intratumoral MV injections were performed with A549 mice at days 22, 28, and 35 after initial injection as indicated by arrowheads. (b) When tumors reach 1–1.5 cm^3 or after 31 (Caco-2 tumor) or 42 (A549 tumors) days, animals were sacrificed and tumors were harvested and weighed. (*□ < 0.05; **□ < 0.01).

antitumor activity against human lung and colorectal adenocarcinomas. MV was able to infect and efficiently induce cell death in different cell lines derived from these two types of cancers. Significantly, our in vivo experiments showed that MV is able to control the growth of large, established tumors derived from these human malignancies. These findings are of particular interest as lung and colorectal cancers are widespread aggressive diseases which are still in need of innovative antitumor treatments [24, 25]. Our work supports previous studies where oncolytic properties of MV vaccinal strains, derived from Edmonston lineage, have been demonstrated against a wide range of human cancers including lymphoma [26], glioblastoma multiforme [27], multiple myeloma [28], ovarian [29] and breast [30] carcinomas, prostate cancer [31], leukemia [32], and more recently melanoma [33].

MV-induced cell death has been characterized as apoptosis [23] and we regularly observed common features of apoptotic cell death, for example blebbing and early exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of plasma membrane. However, we also repeatedly observed atypical events that could possibly challenge the "apoptosis model", at least when using live-attenuated MV against malignant cells. Indeed, we previously showed how mesothelioma cells infected with MV were able to induce spontaneous maturation of human monocyte-derived and plasmacytoid dendritic cells and, subsequently, the cross-presentation of tumor antigen to specific $CD8^+$ T cells [6, 11]. Here, we observed that some of the infected cells undergoing cell death after syncytia formation showed rapid release of intracellular content into the culture medium, as shown by rapid leakage of cytoplasmic GFP. This could partially explain the

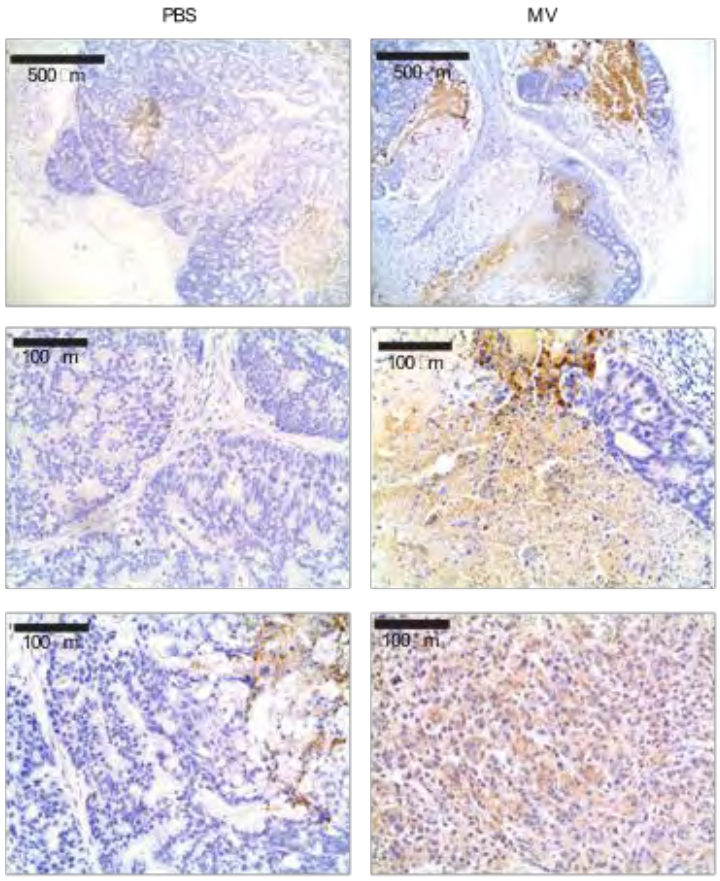


Figure 4: Caspase-3 activation in MV-treated colorectal adenocarcinomas. Representative sections of Caco-2 human tumor xenografts, 31 days after PBS or MV treatment. Tumors were analyzed for caspase-3 activation (brown staining) by immunohistochemistry as described in Section 2. Tumors were counterstained with hematoxylin to mark nuclei (blue staining).

immunogenicity of "apoptosis" that we harnessed in our previous work [6]. Recent advances in the characterization of tumor cell death pathways [34]—for instance description of necroptosis—could help to improve our comprehension of oncolytic MV-related cell death. Altered apoptotic pathways in tumor cells could also impact this process, as we observed divergent mechanisms in Caco-2 and A549 regarding syncytia formation in vitro and cleavage of caspase-3 in vivo. However, the fact that we did not observe activated caspase 3 in A549 tumor in mice could be due to the rapid growth of this cell line compared to Caco-2. It is thus possible that rapidly dividing A549 cells outgrow activated caspase-3 apoptotic tumor cell and are thus more difficult to detect in histologic samples. Since more and more groups now focus on improving proapoptotic capacities of oncolytic viruses to circumvent resistance of tumor cells to cancer therapies [35], such information would be of great interest for clinical utility. Even if viruses are potent inducers of cell death and are often able to demonstrate cytotoxicity even in unfavorable conditions, it has been shown recently, for instance, that overexpression of antiapoptotic molecules from Bcl-2 protein family can impair MV-induced cell death in leukemia cells [32].

Better understanding of the features of MV-induced cell death will help to design appropriate clinical strategies for targeting aggressive human neoplasms. Antitumor effects of virotherapy have been shown to be enhanced by combination with other antitumor treatments in different models [36]. Combination with chemotherapy, the use of histone deacetylase inhibitors, for example, was found to improve the oncolytic properties of both vesicular stomatitis virus [37] and herpes virus [38]. Combinations with radiotherapy are also now widely described [39, 40]. Associations with immunotherapy, to combine direct oncolysis with an adaptive, antitumor immune response, is also an interesting alternative, with some groups demonstrating a critical role for the immune system in the therapeutic effects of oncolytic viruses [6, 41, 42]. Others have used engineered oncolytic viruses expressing proimmune molecules [5, 43]. Synergistic action of virotherapy and antitumor immune response in vivo has been extensively shown for oncolytic VSV [44] and reovirus [45, 46]. In vitro studies with MV tend to confirm

this trend even though a suitable immunocompetent model to study interactions between the virus and the immune system is lacking [47]. For example, we (manuscript in preparation) and others [33] have observed the release of danger signals by MV-infected cells in vitro, although the in vivo consequences remain largely unknown.

Recent identification of Nectin-4 as a new receptor for measles virus has been a major step forward for a better understanding of MV biology [14, 20]. Nonetheless, CD46 membrane complement regulatory protein expression still remains the key determinant for cancer cell sensitivity (i) to primary infection by MV and subsequently (ii) to the efficient transmission of new viruses to neighboring cells by formation of multinucleated syncytia [48]. Overexpression of CD46 had been previously described in human lung and colorectal adenocarcinomas [10, 14] and we were able to confirm these observations in several cell lines derived from these two malignancies. Moreover, we showed that cell lines exhibiting high CD46 expression also displayed high infection rates by oncolytic MV. The virus was also able to induce substantial regressions of these human adenocarcinomas engrafted in nude mice. Surprisingly, one of our lung adenocarcinoma cell lines (ADK153) was found to be efficiently infected by MV while displaying a lower expression level of CD46 receptor (Figures 1 and 2). This unexpected observation supports preliminary experiments in melanoma where low expression of CD46 and the absence of SLAM and Nectin-4 receptors do not correlate with efficient infection by live-attenuated vaccinal MV (manuscript in preparation). This indicates that additional parameters have to be taken into account when tumor cells are screened for their susceptibility to oncolytic MV. Sensitivity to innate antiviral mechanisms—such as the ability to respond to Type-I interferon signaling—should be considered, even if one cannot exclude that, out of CD46, CD150/SLAM, and Nectin-4 receptors, other unidentified surface molecules could play a role in MV infection mechanisms. Nevertheless, the majority of the tumor cell lines we studied showed increase in sensitivity to oncolytic MV infection when overexpressing CD46, thereby showing that lung and colorectal cancers, which are highly resistant to conventional treatments, are suitable targets for MV cancer virotherapy.

5. Conclusions

Our experiments demonstrate that live-attenuated oncolytic MV is able to efficiently target human lung and colorectal carcinomas, thus highlighting novel options for the treatment of these aggressive malignancies. Further studies to better characterize cell death pathways activated by MV infection and parameters involved in MV susceptibility would again reinforce the interest in development of live-attenuated MV for cancer therapy.

Conflict of Interests

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

This project was supported by Grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), La Ligue contre le Cancer, and ARSMESO44. N. Boisgerault was personally supported by a Grant from the ARC. The author thank Philippe Hulin, Myriam Robard, and Cécile Deleine from the MicroPICell core facility for microscopic and immunohistochemical analyses and Virginie Maurier for animal experiments. The author also thank Kate Vassaux and Diana Rommelfanger for English editing.

References

[1] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, "Global cancer statistics," CA Cancer Journal for Clinicians, vol. 61, no. 2, pp. 69–90, 2011.

[2] V. Beljanski and J. Hiscott, "The use of oncolytic viruses to overcome lung cancer drug resistance," Current Opinion in Virology, vol. 2, no. 5, pp. 629–635, 2012.

[3] S. Miyamoto, H. Inoue, T. Nakamura et al., "Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma," Cancer Research, vol. 72, no. 10, pp. 2609–2621, 2012.

[4] K. B. Stephenson, N. G. Barra, E. Davies, A. A. Ashkar, and B. D. Lichty, "Expressing human interleukin-15 from oncolytic vesicular stomatitis virus improves survival in a murine metastatic colon adenocarcinoma model through the enhancement of anti-tumor immunity," Cancer Gene Therapy, vol. 19, no. 4, pp. 238–246, 2012.

[5] N. Boisgerault, F. Tangy, and M. Gregoire, "New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play," Immunotherapy, vol. 2, no. 2, pp. 185–199, 2010.

[6] A. Gauvrit, S. Brandler, C. Sapede-Peroz, N. Boisgerault, F. Tangy, and M. Gregoire, "Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response," Cancer Research, vol. 68, no. 12, pp. 4882–4892, 2008.

[7] P. J. Lech and S. J. Russell, "Use of attenuated paramyxoviruses for cancer therapy," Expert Review of Vaccines, vol. 9, no. 11, pp. 1275–1302, 2010.

[8] R. E. Dorig, A. Marcil, A. Chopra, and C. D. Richardson, "The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain)," Cell, vol. 75, no. 2, pp. 295–305, 1993.

[9] D. Naniche, G. Varior-Krishnan, F. Cervoni et al., "Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus," Journal of Virology, vol. 67, no. 10, pp. 6025–6032, 1993.

[10] Z. Fishelson, N. Donin, S. Zell, S. Schultz, and M. Kirschfink, "Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors," Molecular Immunology, vol. 40, no. 2–4, pp. 109–123, 2003.

[11] J. Guillerme, N. Boisgerault, D. Roulois et al., "Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoïd dendritic cells," Clinical Cancer Research. In press.

[12] L. Heinzerling, V. Künzi, P. A. Oberholzer, T. Kündig, H. Naim, and R. Dummer, "Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells," Blood, vol. 106, no. 7, pp. 2287–2294, 2005.

[13] E. Galanis, L. C. Hartmann, W. A. Cliby et al., "Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer," Cancer Research, vol. 70, no. 3, pp. 875–882, 2010.

[14] R. S. Noyce, D. G. Bondre, M. N. Ha et al., "Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus," PLoS Pathogens, vol. 7, no. 8, Article ID e1002240, 2011.

[15] Y. Shirogane, M. Takeda, M. Tahara, S. Ikegame, T. Nakamura, and Y. Yanagi, "Epithelial-mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus," Journal of Biological Chemistry, vol. 285, no. 27, pp. 20882–20890, 2010.

[16] D. Hof mann, J. M. Bangen, W. Bayer, and O. Wildner, "Synergy between expression of fusogenic membrane proteins, chemotherapy and facultative virotherapy in colorectal cancer," Gene T erapy, vol. 13, no. 21, pp. 1534–1544, 2006.

[17] Y. Jng, C. Tong, J. Zhang et al., "Tumor and vascular targeting of a novel oncolytic measles virus retargeted against the urokinase receptor," Cancer Research, vol. 69, no. 4, pp. 1459–1468, 2009.

[18] F. Gueugnon, S. Leclercq, C. Blanquart et al., "Identif cation of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma," American Journal of Pathology, vol. 178, no. 3, pp. 1033–1042, 2011.

[19] C. Combredet, V. Labrousse, L. Mollet et al., "A Molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice," Journal of Virology, vol. 77, no. 21, pp. 11546–11554, 2003.

[20] M. D. Muhlebach, M. Mateo, P. L. Sinn et al., "Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus," Nature, vol. 480, no. 7378, pp. 530–533, 2011.

[21] G. G. Welstead, C. Iorio, R. Draker et al., "Measles virus replication in lymphatic cells and organs of CD150 (SLAM) transgenic mice," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, no. 45, pp. 16415–16420, 2005.

[22] V. Racaniello, "Virology. An exit strategy for measles virus," Science, vol. 334, no. 6063, pp. 1650–1651, 2011.

[23] L. M. Esolen, S. W. Park, J. M. Hardwick, and D. E. Grif n, "Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cells," Journal of Virology, vol. 69, no. 6, pp. 3955–3958, 1995.

[24] M. A. Bareschino, C. Schettino, A. Rossi et al., "Treatment of advanced non small cell lung cancer," Journal of T oracic Disease, vol. 3, no. 2, pp. 122–133, 2011.

[25] S. Leong, W. A. Messersmith, A. C. Tan, and S. G. Eckhardt, "Novel agents in the treatment of metastatic colorectal cancer," Cancer Journal, vol. 16, no. 3, pp. 273–282, 2010.

[26] D. Grote, S. J. Russell, T. I. Cornu et al., "Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenograf s in immunodef cient mice," Blood, vol. 97, no. 12, pp. 3746–3754, 2001.

[27] L. K. Phuong, C. Allen, K. W. Peng et al., "Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme," Cancer Research, vol. 63, no. 10, pp. 2462–2469, 2003.

[28] K. W. Peng, G. J. Ahmann, L. Pham, P. R. Greipp, R. Cattaneo, and S. J. Russell, "Systemic therapy of myeloma xenograf s by an attenuated measles virus," Blood, vol. 98, no. 7, pp. 2002–2007, 2001.

[29] K. W. Peng, C. J. TenEyck, E. Galanis, K. R. Kalli, L. C. Hartmann, and S. J. Russell, "Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus," Cancer Research, vol. 62, no. 16, pp. 4656–4662, 2002.

[30] C. J. McDonald, C. Erlichman, J. N. Ingle et al., "A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer," Breast Cancer Research and Treatment, vol. 99, no. 2, pp. 177–184, 2006.

[31] P. Msaouel, I. D. Iankov, C. Allen et al., "Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer," Prostate, vol. 69, no. 1, pp. 82–91, 2009.

[32] B. Patel, A. Dey, E. Ghorani et al., "Dif erential cytopathology and kinetics of measles oncolysis in two primary B-cell malignancies provides mechanistic insights," Molecular T erapy, vol. 19, no. 6, pp. 1034–1040, 2011.

[33] O. G. Donnelly, F. Errington-Mais, L. Steele et al., "Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma," Gene T erapy, vol. 20, no. 1, pp. 7–15, 2011.

[34] P. Kreuzaler and C. J. Watson, "Killing a cancer: what are the alternatives?" Nature Reviews Cancer, no. 6, pp. 411–424, 201212.

[35] T. C. Liu and D. Kirn, "Viruses with deletions in antiapoptotic genes as potential oncolytic agents," Oncogene, vol. 24, no. 40, pp. 6069–6079, 2005.

[36] T. L. A. Nguyen, V. F. Tumilasci, D. Singhroy, M. Arguello, and J. Hiscott, "T e emergence of combinatorial strategies in the development of RNA oncolytic virus therapies," Cellular Microbiology, vol. 11, no. 6, pp. 889–897, 2009.

[37] T. L. A. Nguyên, H. Abdelbary, M. Arguello et al., "Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 105, no. 39, pp. 14981–14986, 2008.

[38] A. Otsuki, A. Patel, K. Kasai et al., "Histone deacetylase inhibitors augment antitumor ef cacy of herpes-based oncolytic viruses," Molecular T erapy, vol. 16, no. 9, pp. 1546–1555, 2008.

[39] M. H. Dai, D. Zamarin, S. P. Gao et al., "Synergistic action of oncolytic herpes simplex virus and radiotherapy in pancreatic cancer cell lines," British Journal of Surgery, vol. 97, no. 9, pp. 1385–1394, 2010.

[40] S. Kuroda, T. Fujiwara, Y. Shirakawa et al., "Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery," Cancer Research, vol. 70, no. 22, pp. 9339–9348, 2010.

[41] F. Errington, L. Steele, R. Prestwich et al., "Reovirus activates human dendritic cells to promote innate antitumor immunity," Journal of Immunology, vol. 180, no. 9, pp. 6018–6026, 2008.

[42] Z. G. Fridlender, J. Sun, S. Singhal et al., "Chemotherapy delivered af er viral immunogene therapy augments antitumor ef cacy via multiple immune-mediated mechanisms," Molecular T erapy, vol. 18, no. 11, pp. 1947–1959, 2010.

[43] I. D. Iankov, C. Allen, M. J. Federspiel et al., "Expression of immunomodulatory neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori enhances the antitumor activity of oncolytic measles virus," Molecular T erapy, vol. 20, no. 6, pp. 1139–1147, 2012.

[44] P. Wongthida, R. M. Diaz, F. Galivo et al., "VSV oncolytic virotherapy in the B16 model depends upon intact MyD88 signaling," Molecular T erapy, vol. 19, no. 1, pp. 150–158, 2011.

[45] S. A. Gujar, P. Marcato, D. Pan, and P. W. K. Lee, "Reovirus virotherapy overrides tumor antigen presentation evasion and promotes protective antitumor immunity," Molecular Cancer T erapeutics, vol. 9, no. 11, pp. 2924–2933, 2010.

[46] R. J. Prestwich, E. J. Ilett, F. Errington et al., "Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication," Clinical Cancer Research, vol. 15, no. 13, pp. 4374–4381, 2009.

[47] G. Ungerechts, C. Springfeld, M. E. Frenzke et al., "An immunocompetent murine model for oncolysis with an armed and targeted measles virus," Molecular Therapy, vol. 15, no. 11, pp. 1991–1997, 2007.

[48] B. D. Anderson, T. Nakamura, S. J. Russell, and K. W. Peng, "High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus," Cancer Research, vol. 64, no. 14, pp. 4919–4926, 2004.

VII. Article n°2 : "Measles Virus Vaccine–Infected Tumor Cells Induce Tumor Antigen Cross-Presentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells"

A. Résultats principaux

La souche atténuée (souche Schwarz) du virus de la rougeole (MV) est proposée comme agent anti-tumoral pour infecter et tuer spécifiquement les cellules tumorales en épargnant les cellules saines. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont spécialisées dans la synthèse d'interféron alpha (IFN-α) et jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire antivirale. Dans cette étude, nous avons analysé, *in vitro*, les effets de cellules tumorales infectées par le MV sur le phénotype et la fonction des pDC humaines.

Nous avons étudié la maturation et la présentation croisée d'un antigène de tumeur par les pDC co-cultivées soit avec des cellules tumorales infectées, soit avec des cellules tumorales exposées aux UV. Nous démontrons que seules les cellules tumorales infectées par le MV induisent la maturation des pDC, caractérisée par une production importante d'IFN-α. La production d'IFN-α est déclenchée suite à l'engagement du TLR7 des pDC probablement par l'ARN simple-brin du MV. Nous avons également observé, par microscopie confocale, que les cellules tumorales infectées sont phagocytées par les pDC. Enfin, nous observons la présentation croisée de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 à un clone de lymphocytes T CD8+ spécifique du complexe HLA-A*0201/NY-ESO-1(157-165), uniquement lorsque les pDC sont co-cultivées avec les cellules tumorales NY-ESO-1^+ infectées par le MV. Le niveau d'activation du clone par les pDC est comparable à celui obtenu avec des Mo-DC co-cultivées avec ces cellules tumorales infectées.

L'ensemble de nos résultats suggère que l'utilisation de la souche Schwarz du virus de la rougeole comme agent de virothérapie anti-tumorale induit une mort cellulaire immunogène qui permet, en plus de l'activation des mDC, la maturation des pDC humaines, caractérisée par la production d'une grande quantité d'IFN-α et la présentation croisée d'antigènes de tumeur. La virothérapie anti-tumorale utilisant la souche Schwarz du virus de la rougeole représente ainsi un moyen de libérer des antigènes de tumeur pour la présentation croisée et de recruter ces cellules présentatrices d'antigènes dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

B. Article

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

Clinical Cancer Research

Cancer Therapy: Preclinical

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

Jean-Baptiste Guillerme[1,2,3], Nicolas Boisgerault[1,2,3], David Roulois[1,2,3], Jeremie Menager[1,2,3], Chantal Combredet[4], Frederic Tangy[4], 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-a, whereas UV-irradiated tumor cells were unable to activate pDC. This IFN-a 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 $CD8^{b}$ 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-a, 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. Ó2012 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: [1]Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale (INSERM), UMR892; [2]Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR6299; [3]Université de Nantes, Nantes; and [4]Unité de Genomique 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 Medicale (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

Ó2012 American Association for Cancer Research.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

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-a, -b, -w). 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-a 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-a 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 NY-ESO-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 Medicale (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% CO_2 atmosphere in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/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

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

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/m^2, 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 Â 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 mg/mL). pDC were also cocultured with measles virus vaccine alone, measles virus vaccine, and IL-3 (MOI ¼ 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 mmol/L (Eurofins). As a control, we used CpG-A at 5 mg/mL to induce a TLR-9–dependent IFN-a 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^b/HLA-DR^b 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 carbocyanine 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-a (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^b 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 mmol/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-g and CD8-specific antibodies (BD Biosciences), as previously described (30). IFN-g production was analyzed by flow cytometry with a gate on CD8^b 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 RT^2 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

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

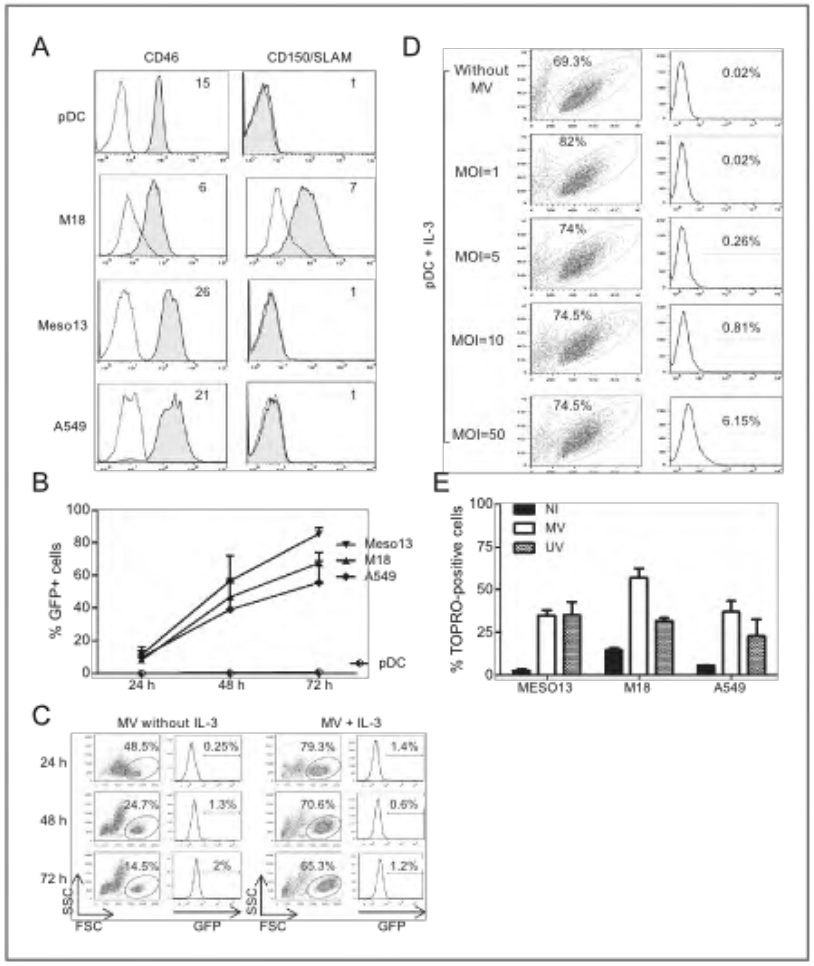


Figure 1. Measles virus vaccine receptor expression, measles virus vaccine infection sensitivity, and survival of tumor cells and pDC. A, expression of CD46 and CD150/SLAM on the surface of tumor cell lines (M18, Meso13, and A549) and pDC [monoclonal antibody (mAb) staining, gray histogram; isotype control, white histogram; the values on histograms are the R-MFI, 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 ¼ 1). C, infection of pDC by MV-eGFP (MOI ¼ 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 ¼ 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 ¼ 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 ¼ 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 ¼ 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^{þ} 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.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

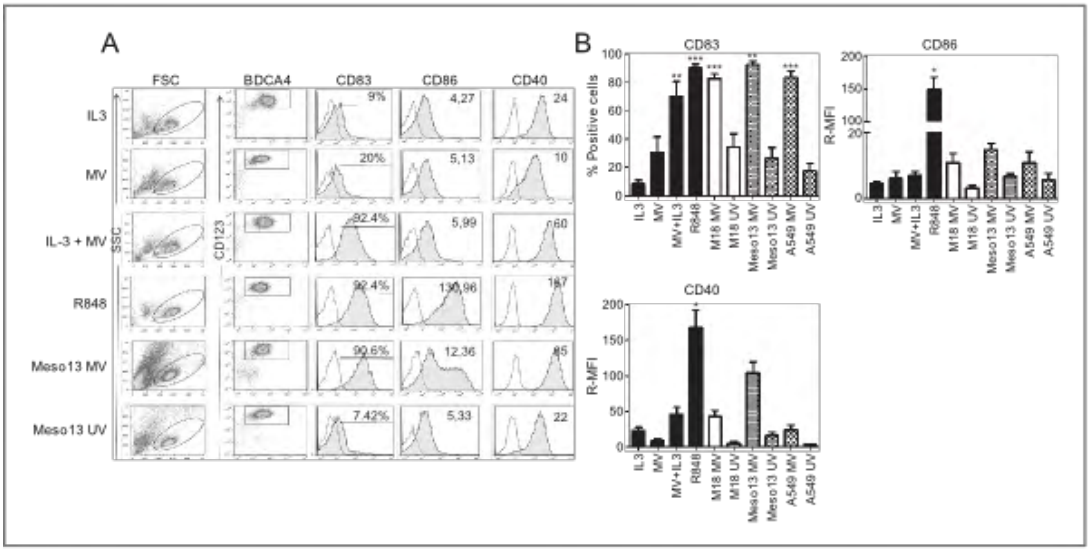


Figure 2. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce pDC maturation. pDC were cultured for 18 hours with either IL-3, measles virus vaccine (MOI ¼ 1), measles virus vaccine and IL-3, R848, UV-irradiated- or measles virus vaccine-infected tumor cells. A, expression of CD83, CD86, and CD40 by pDC was measured by flow cytometry with a gate on $CD123^{b}$ /$BDCA\text{-}4^{b}$ 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 (^{A}, $P < 0.05$; ^{AA}, $P < 0.01$; ^{AAA}, $P < 0.001$).

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, althought 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 Duhen 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 Schlender 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 ¼ 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 IL3-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 ¼ 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^{A}), which is unable to replicate, and we observed a similar level of maturation (CD83, CD80, and CD86 expressions) and IFN-a 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

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

(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-a 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).

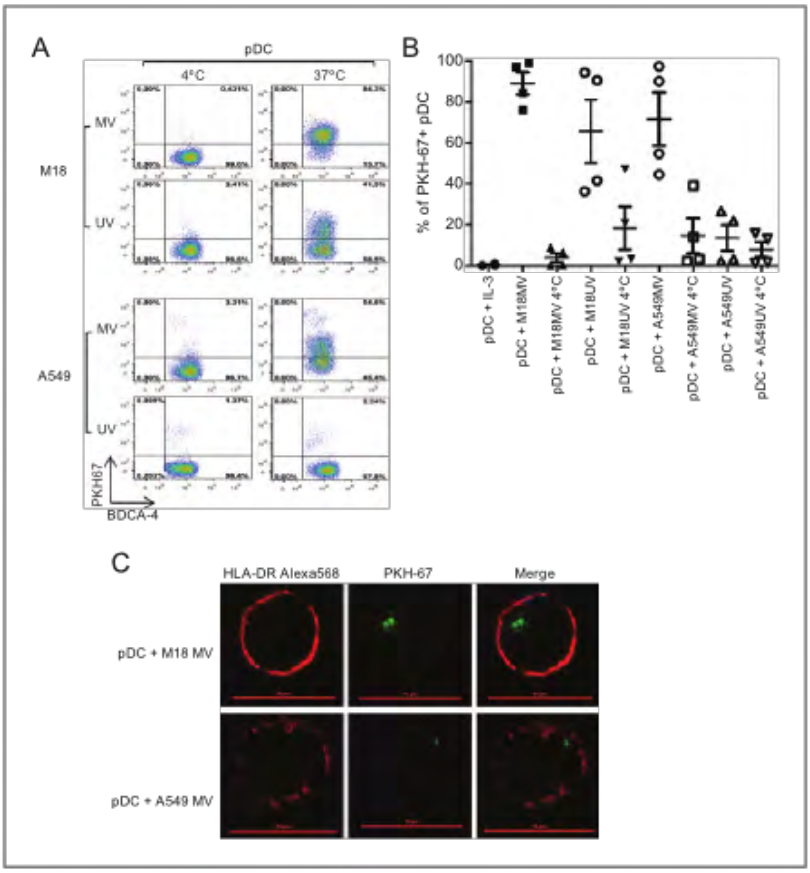


Figure 3. Phagocytosis of measles virus vaccine–infected or UV-irradiated tumor cells by pDC. A, measles virus vaccine–infected and UV-irradiated tumor cells were stained with PKH-67 and cocultured with pDC for 18 hours at 4°C or 37°C (1 dendritic cell:1 tumor cell). Cells were stained with HLA-DR–specific 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.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

(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-a 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).

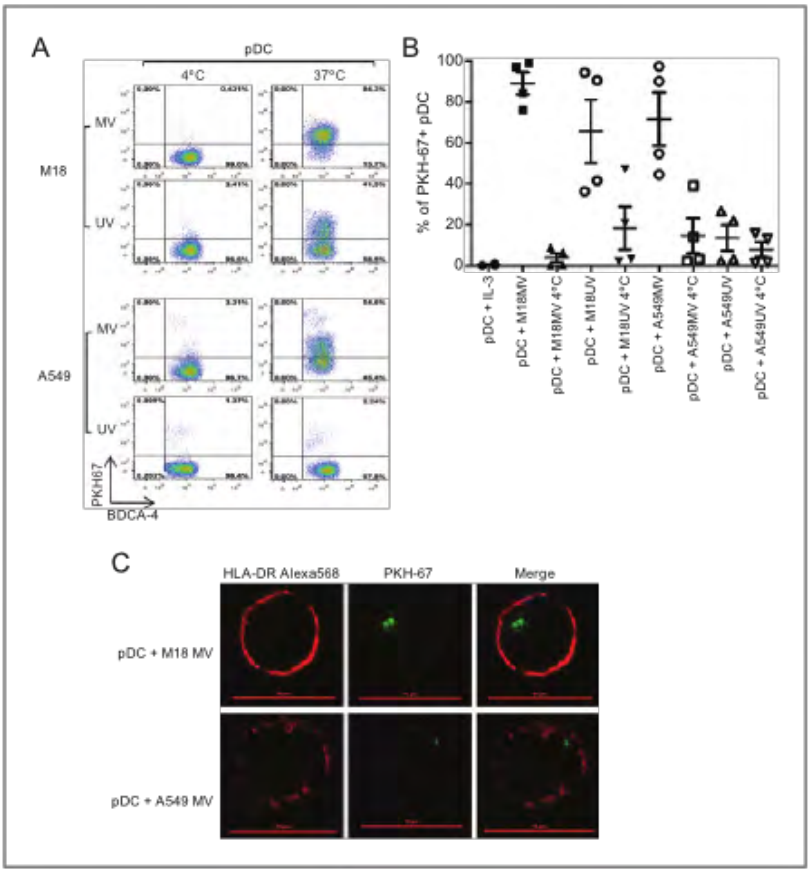


Figure 3. Phagocytosis of measles virus vaccine–infected or UV-irradiated tumor cells by pDC. A, measles virus vaccine–infected and UV-irradiated tumor cells were stained with PKH-67 and cocultured with pDC for 18 hours at 4°C or 37°C (1 dendritic cell:1 tumor cell). Cells were stained with HLA-DR–specific 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.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

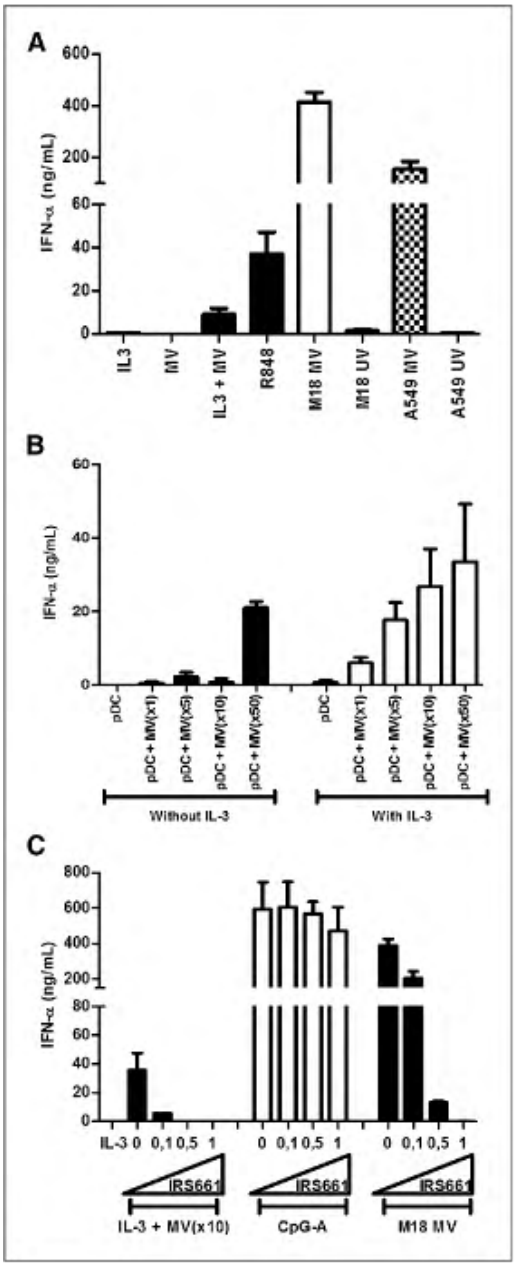


Figure 4. Production of IFN-a by pDC in response to measles virus vaccine is TLR7 dependent. A, pDC were cultured for 18 hours with IL-3, measles virus vaccine (MOI ¼ 1), measles virus vaccine and IL-3, R848, UV-irradiated- or measles virus vaccine–infected M18 or A549 tumor cells. IFN-a production was 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-a production was measured by ELISA in the culture supernatants. C, pDC were cultured for 18 hours with IL-3 and measles virus vaccine (MOI ¼ 10), CpG-A or measles virus vaccine–infected M18, in the absence or presence of different concentrations of IRS661 (TLR7 inhibitor). IFN-a production was measured by ELISA in the culture supernatants. Results were obtained from 3 independent experiments.

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 syncitia 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 TLR7 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-a 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-a secretion by pDC only in the presence of IL-3, matching the cell maturation observed earlier in Fig. 2. The amount of IFN-a 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-a 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-a were produced by the pDC, as tumor cells did not produce IFN-a 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-a production by pDC. These results show that measles virus vaccine–infected tumor cells are able to trigger the production of high levels of IFN-a 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 Å 10^8 $TCID_{50}$/mL corresponding to an MOI greater than 100 from a starting dose of virus of 1 Å 10^6 $TCID_{50}$/mL, corresponding to an MOI ¼ 1 (7). It is thus likely that the huge quantity of IFN-a 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-a production by pDC increased with the MOI. On the contrary, pDC did not produce IFN-a in the absence of IL-3, except for the highest MOI (MOI ¼ 50).

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

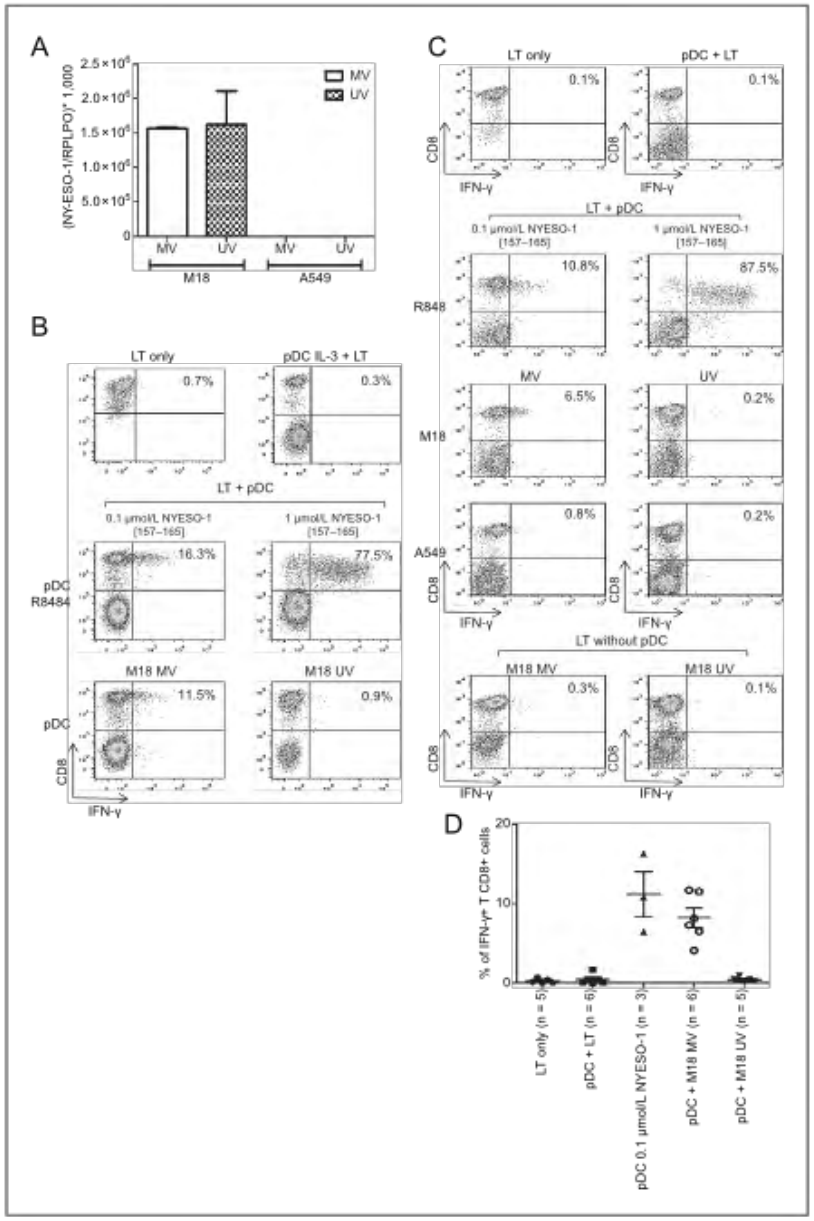


Figure 5. Cross-presentation of NYESO-1 by HLA-A*0201^{b} pDC after coculture with NYESO-1^{b}/HLA-A*0201-M18 tumor cells infected with measles virus vaccine. A, expression of NYESO-1 by M18 and A549 tumor cell lines determined by real-time PCR (n ¼ 3). B, pDC were cultured for 18 hours with IL-3, R848, 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^{b} T-cell clone specific for HLA-A*0201/NYESO-1(157–165; defined as LT) in the presence of brefeldin A. Production of IFN-g by the M117.167 T-cell clone was analyzed by flow cytometry after staining with CD8 and IFN-g–specific mAb. C, pDC were cultured for 18 hours with R848, or UV-irradiated- or measles virus vaccine–infected M18 (NYESO-1^{b}/HLA-A*0201^{A}) or A549 (NYESO-1^{A}/HLA-A*0201^{A}) 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^{b} T-cell clone specific for HLA-A*0201/NYESO-1(157–165) in the presence of brefeldin A. The production of IFN-g by the M117.167 T-cell clone was analyzed by flow cytometry after staining with CD8- and IFN-g–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-a 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-a 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-a 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-a expression mediated by TLR-7 (IRS661; ref. 33). We showed that IFN-a 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-a inhibition when IRS661 was added to pDC exposed to measles virus vaccine–infected tumor cells. As a control, we showed that IRS661 did not

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

inhibit the CpG-A–induced IFN-a production by pDC, which is TLR9-dependent. Altogether, these results show that IFN-a 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-g, 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 mmol/L peptide was loaded onto pDC (16.3% IFN-g^{+} cells) and was more intensely activated by pDC pulsed with 1 mmol/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-g 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-g production profile comparable with that observed in response to pDC pulsed with 0.1 mmol/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-g 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-g 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-g in response to pDC cocultured with measles virus vaccine–infected M18 (6.5% IFN-g^{+} cells), a production rate close to the one observed in response to pDC pulsed with 0.1 mmol/L NYESO-1(157–165) peptide (10.8% IFN-g^{+} 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-a 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-a 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-a, 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 ¼ 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

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

maturation was observed (low IFN-a 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 ¼ 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-a by pDC cultured in the absence of IL-3 (30), and to Duhen and colleagues who claimed that measles virus vaccine Schwarz induces high quantities of IFN-a 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-a production by pDC (30), as pDC produce IFN-a 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-a 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-a. Our results show that the maturation induced by MVþ 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 $CD8^{þ}$ 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 $CD11c^{þ}$ 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 $CD8^{þ}$ 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-a 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 $CD11c^{þ}$

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

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-a 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-a 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-a 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.

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. Guillerme, N. Boisgerault, J. Menager, C. Combredet, J-F. Fonteneau, M. Gregoire
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): J-B. Guillerme, 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. Guillerme, J. Menager, J-F. Fonteneau, M. Gregoire
Writing, review, and/or revision of the manuscript: J-B. Guillerme, J-F. Fonteneau, M. Gregoire
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): J. Menager, 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 Desfrançois 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 regionale 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.

References

1. Blechacz B, Russell SJ. Measles virus as an oncolytic vector platform. Curr Gene Ther 2008;8:162–75.
2. Boisgerault N, Tangy F, Gregoire M. New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play. Immunotherapy 2010;2:185–99.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Gauvrit A, Brandler S, Sapede-Peroz 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Msaouel P, Iankov ID, Dispenzieri A, Galanis E. Attenuated oncolytic measles virus strains as cancer therapeutics. Curr Pharm Biotechnol 2012;13:1732–41.

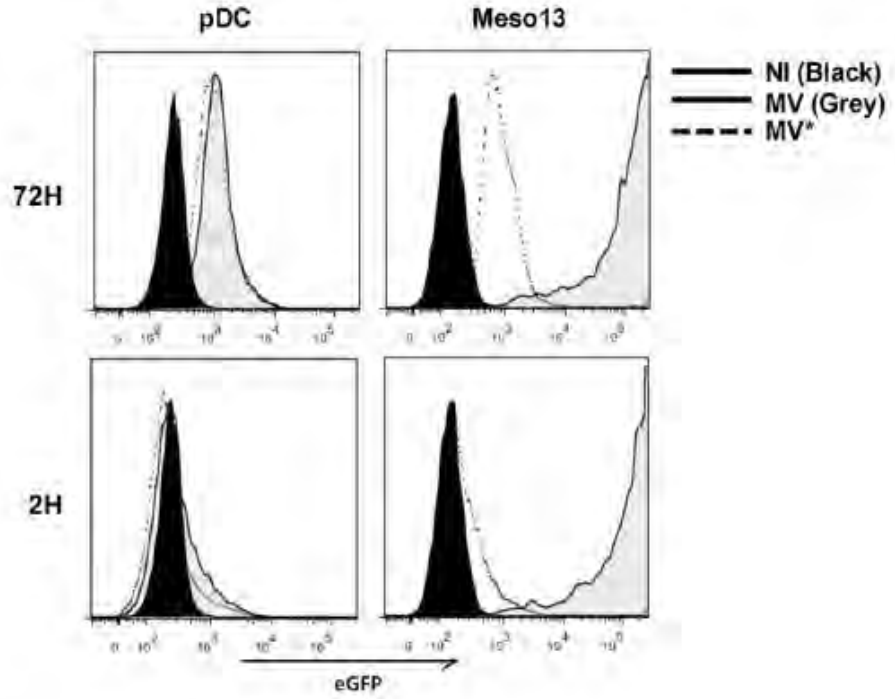
Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst January 21, 2013; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

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 $CD4^{þ}$ and $CD8^{þ}$ 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, Holcmann 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, Pantome 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 $CD4^{þ}$ and $CD8^{þ}$ 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. Duhen 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, Holcmann M, Luhrs P, Stingl G, Sibilia 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, Zhivotovsky 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 $CD8^{þ}$ T cell responses through CD8{alpha}þ 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.

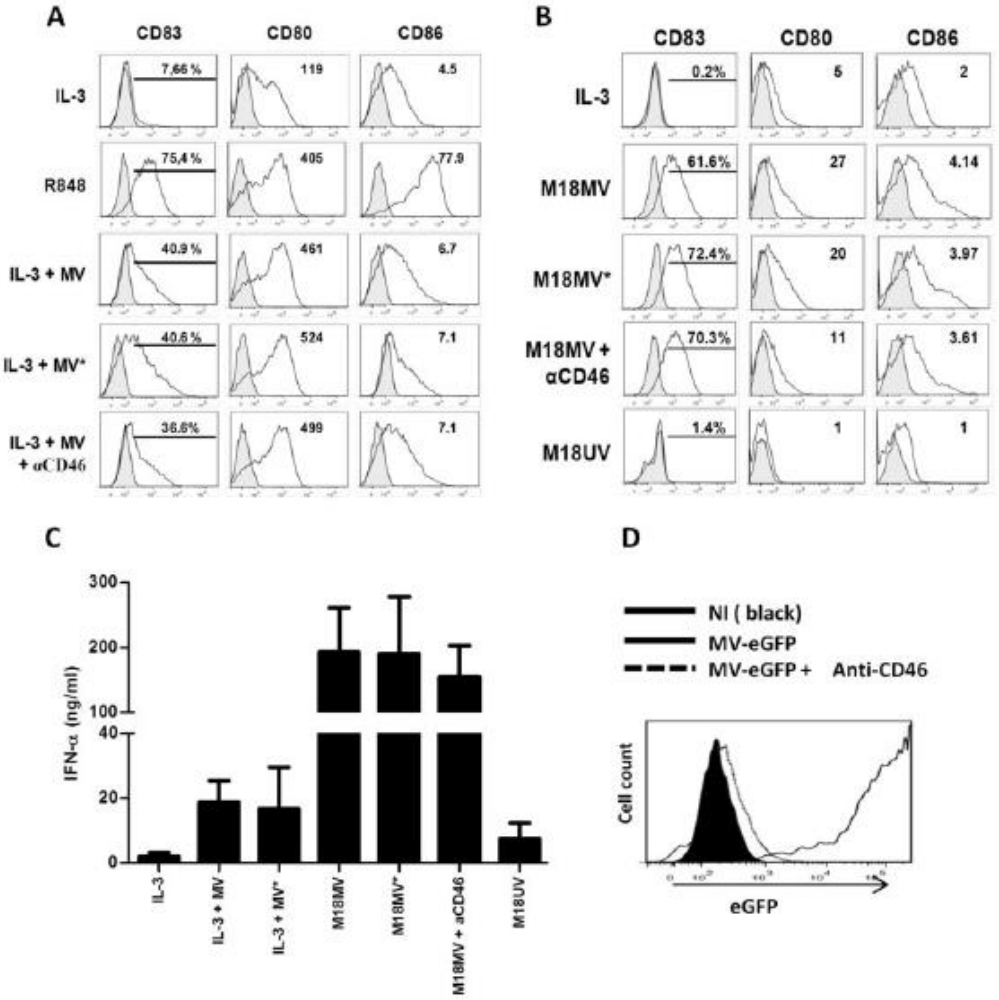
Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on March 15, 2013
Copyright © 2013 American Association for Cancer Research

Supplemental Figure 3



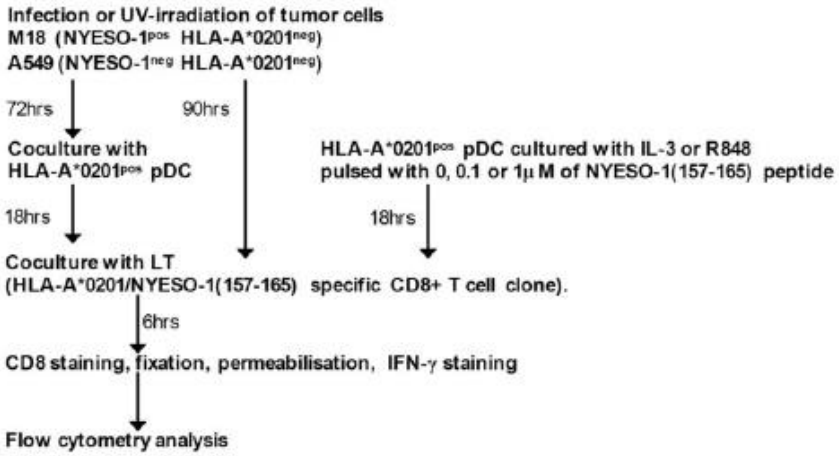
Supplemental figure 3: Infection of pDC by MV-eGFP or UV-irradiated MV-eGFP:
pDC in presence of IL-3 or Meso13 cells were cultured alone (NI) or with MV-eGFP (MV) or UV-irradiated (312nm – 100kj/m²) MV-eGFP (MV*) at MOI=50 during 72hrs (upper panel) or during 2hrs and then cultured during 70hrs (lower panel). Fluorescence was analyzed by flow cytometry.

Supplemental Figure 4



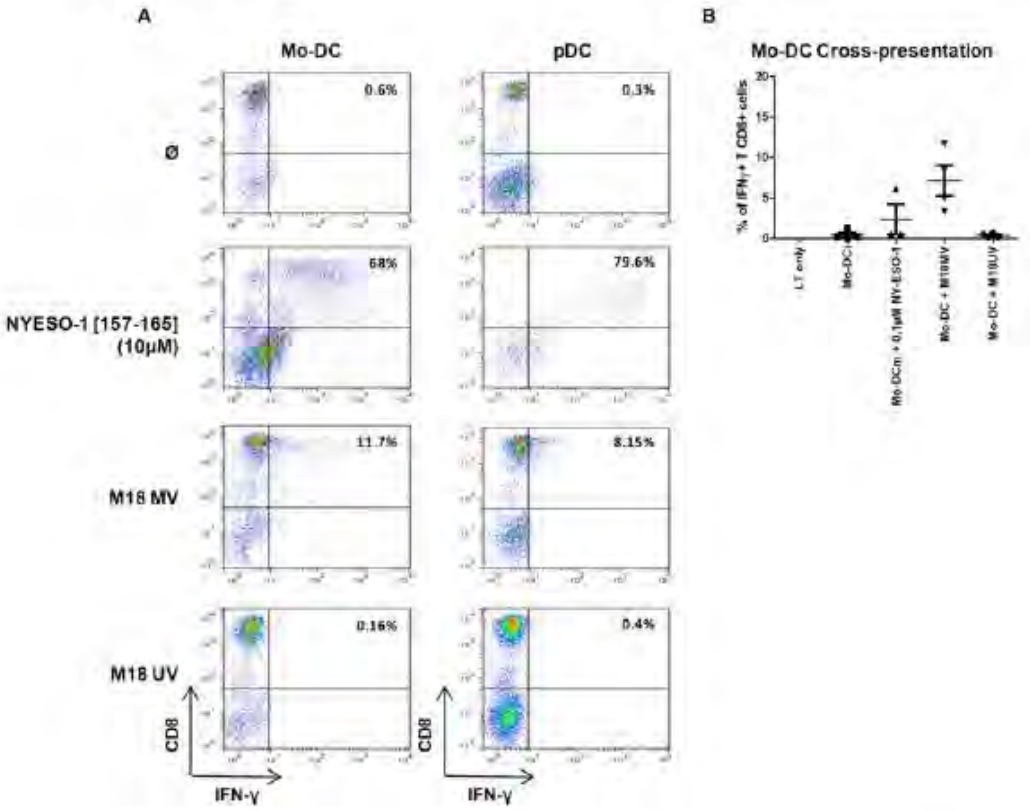
Supplemental Figure 4: Activation of pDC in response to MV-infected tumor cells is independent of MV replication in pDC and infection by CD46. (A) pDC were cultured with IL-3 alone, R848, IL-3/MV-eGFP (MV), IL-3/MV-eGFP with 10μg/ml of anti-CD46 or IL-3/UV-irradiated MV-eGFP (MV*) at MOI=1 during 18hrs. Expression of CD83, CD80 and CD86 by pDC was determined by flow cytometry. (B) pDC were cultured with IL-3, UV-irradiated M18, MV-infected M18 (M18MV) in presence or absence of 10μg/ml of anti-CD46 (Hycult biotech), or MV-infected M18 irradiated by UV before exposition to pDC (M18MV*). Expression of CD83, CD80 and CD86 by pDC (gate on BDCA-4+/HLA-DR+ cells) was determined by flow cytometry. (C) IFN-α production by pDC measured by ELISA. (D) MV-eGFP infection inhibition of M18 by 10μg/ml of anti-CD46 monoclonal antibody after 72hrs of culture.

Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 5: shematic of the culture conditions used in the cross-presentation experiments.

Supplemental Figure 6



Supplemental Figure 6: Monocyte-derived DC exhibit a similar level of NYESO-1 cross-presentation compared to pDC. (A) on day0, pDC and monocytes from a single donor were purified. pDC were frozen and monocytes cultured with IL-4 and GM-CSF. On day 5, pDC were thawed. pDC and monocyte-dervied DC were cultured alone or with UV-irradiated M18 (M18UV) or MV-infected M18 (M18MV) for 18hrs. On day6, DC were cultured with the NYESO-1 specific CD8+ T cell clone during 6hrs in presence of brefeldinA. Cells were then stained with anti-CD8+ antibody, fixed, permeabilized and stained with IFN-γ specific antibody. IFN-γ secretion by the the T cell clone was analyzed by flow cytometry. We conclude that level of cross-presentation was somewhat similar between the two cell types. It was a little bit weaker for pDC, but these cells have been frozen, whereas Monocyte-derived DC were not. (B) scatter plot representation of three cross-presentation experiments performed with monocyte-derived DC. Error bars represent standard deviation

DISCUSSION

VIII. Discussion

La virothérapie anti-tumorale utilise les propriétés oncolytiques de certaines souches virales pour infecter et détruire spécifiquement les cellules tumorales, laissant le tissu sain peu ou pas endommagé. Cette approche thérapeutique est actuellement évaluée dans différents essais cliniques et pour différents virus (Russell et al., 2012). L'adénovirus H101 est à ce jour le seul virus oncolytique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché. Il est uniquement exploité en Chine pour le traitement des cancers ORL en combinaison avec de la radiothérapie (Garber, 2006). En Europe et aux USA, le virus de l'herpès simplex [Talimogen Laherparepvec (TVEC)], développé par l'industriel Amgen, semble le plus avancé pour une commercialisation. Les résultats d'un essai clinique de phase III randomisé devraient être communiqués courant 2013 (Sheridan, 2013).

Parmi les virus oncolytiques étudiés, la souche atténuée Schwarz du virus de la rougeole (MV) est également un candidat prometteur. Les propriétés oncolytiques du MV ont été largement étudiées *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xénogreffes de cellules tumorales humaines (Guillerme et al., 2013a; Msaouel et al., 2013). Deux essais cliniques de phase I, évaluant les propriétés oncolytiques du MV contre des carcinomes ovariens et des lymphomes cutanés à cellules T, ont livré des résultats prometteurs quant à l'utilisation du MV comme agent anti-tumoral (Galanis et al., 2010; Heinzerling et al., 2005). Trois essais cliniques de phase I supplémentaires sont en cours à la Mayo clinic, Rochester, Minnesota, USA, qui recrutent des patients atteints de carcinomes squameux récurrents ou métastatiques de la tête et du cou, de mésothéliomes ou de myélomes multiples, et ont pour objectif commun de déterminer la dose maximum injectable de MV (http://clinicaltrials.gov).

La première partie de mon travail de thèse a consisté, avec le Dr Nicolas Boisgerault alors en thèse au laboratoire, à étudier les propriétés oncolytiques du MV contre des types de tumeurs pour lesquelles elles n'étaient pas décrites. Dans cette étude, nous avons démontré que le MV infecte et lyse efficacement des lignées de cellules tumorales d'adénocarcinomes pulmonaires et colorectaux *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffes de cellules tumorales humaines (Boisgerault et al., 2013). Dans la plupart des cas, la sensibilité à l'infection augmente avec l'expression de CD46. Cependant, ces travaux ont permis de mettre en évidence que l'expression des récepteurs connus CD46, CD150/SLAM et Nectin-4 ne permet pas d'expliquer dans tous les cas la sensibilité des cellules tumorales à l'infection par le MV, comme en témoigne la bonne sensibilité à l'infection de la lignée d'adénocarcinome pulmo-

naire ADK153 malgré son faible niveau d'expression de CD46. Les lignées ADK3 et ADK117 expriment des niveaux de CD46 comparables à la lignée ADK153 et s'infectent pourtant de manière moins efficace. On retrouve la même dissociation entre le niveau d'expression des récepteurs et la sensibilité à l'infection pour des lignées de cellules tumorales de mélanome. En effet, celles-ci expriment des niveaux très faibles de CD46 par rapport aux lignées cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires et colorectaux, et sont pourtant, pour 3 lignées sur 5, très sensibles à l'infection par le MV (données non montrées). Ces résultats suggèrent l'existence de récepteurs inconnus ou de mécanismes intracellulaires qui favoriseraient l'infection ou au contraire la rendraient plus difficile. Le Dr Mariana Mesel-Lemoine de l'équipe du Pr Frédéric Tangy, à l'unité de "Génomique Virale et Vaccination" de l'Institut Pasteur de Paris, étudie actuellement la possibilité qu'un récepteur autre que ceux déjà décrits, régule l'infection des cellules tumorales.

La sensibilité des cellules tumorales à l'IFN de type I pourrait être un des mécanismes qui influent sur l'efficacité de l'infection par le MV (Berchtold et al., 2013). La signalisation induite par l'IFN de type I peut aboutir à l'arrêt de la synthèse protéique des cellules exposées, ce qui limiterait la propagation du virus dans la culture cellulaire. Carole Achard, étudiante en thèse dans l'équipe, teste la sensibilité à l'infection par le MV de 25 lignées de mésothéliome pleural malin établies dans le laboratoire, et leur expression des récepteurs connus du MV, ainsi que des nouvelles molécules identifiées comme récepteur par le Dr Mariana Mesel-Lemoine de l'équipe du Pr Frédéric Tangy. Ces résultats permettront d'avoir une idée de la fréquence des patients pour lesquels les cellules tumorales sont efficacement infectées par le MV. Carole va également tester la production d'IFN de type I par les cellules tumorales infectées, ainsi qu'une série de molécules impliquées dans la signalisation de la voie de l'IFN de type I. Cela permettra de déterminer le rôle que cette cytokine, aux propriétés antivirales, pourrait jouer dans la régulation de l'infection par le MV.

In vitro, l'infection des lignées cellulaires conduit à une augmentation de la mort cellulaire, mise en évidence par l'augmentation du marquage cellulaire Annexine-V. Ce résultat confirme que la mort induite par le MV s'apparente au mécanisme d'apoptose (Esolen et al., 1995). Toutefois, l'observation sur 72h, par vidéo microscopie de l'infection de cellules tumorales, met en évidence que l'effet cytopathique du MV met en jeu la formation de syncitia non viables. Dès 48h post-infection, certains syncitia éclatent et libèrent leur contenu dans le milieu extérieur, comme en témoigne la dispersion rapide de la fluorescence associée au virus dans le surnageant de culture. Toutes ces observations mettent en évidence que la mort induite par le MV pourrait mettre en jeu des mécanismes de mort cellulaire différents de l'apoptose

classique. La mort cellulaire induite par l'infection semble donc être une mort cellulaire originale et complexe, différente de l'apoptose ou la nécrose classique (Russell et al., 2012). La détection d'IL-1β dans le surnageant de culture des cellules tumorales infectées (résultats non montrés) montre que cette mort cellulaire pourrait s'apparenter à la pyroptose par exemple (Galluzzi et al., 2012). Ceci pourrait en partie expliquer l'immunogénicité de la mort cellulaire induite par le MV observée dans les travaux précédents de l'équipe (Gauvrit et al., 2008).

D'autres équipes et la nôtre ont démontré *in vivo* la capacité oncolytique du MV à stopper la croissance de xénogreffes de nombreux types de tumeurs humaines largement développées. Dans notre étude, l'analyse sur coupe de l'expression de la caspase-3 activée, des tumeurs traitées ou non, nous a permis de mettre en évidence que des mécanismes différents pourraient réguler l'inhibition de la croissance tumorale obtenue par l'injection intra-tumorale de MV. *In vivo*, l'inhibition de la croissance des xénogreffes de cellules tumorales Caco-2 par le MV est associée à une forte activation de la caspase-3 dans les tumeurs des souris traitées par rapport aux souris du groupe contrôle. Ces résultats sont en adéquation avec ceux observés *in vitro,* et suggèrent l'apoptose des cellules tumorales infectées. Par contre, l'inhibition de la croissance des xénogreffes de cellules tumorales A549 n'est pas associée *in vivo* à une activation de la caspase-3. Ce résultat suggère que l'effet anti-tumoral du MV est indépendant dans ce cas de l'activation des mécanismes de l'apoptose. *In vivo,* l'infection par le MV semble induire un mécanisme de mort cellulaire différent de l'apoptose pour certains types de cellules tumorales.

La majorité des études sur le virus oncolytique de la rougeole évalue les propriétés cytotoxiques directes du MV sur les cellules tumorales. Néanmoins les propriétés immuno-adjuvantes du virus et de l'infection pourraient contribuer à l'efficacité de la virothérapie anti-tumorale. Il est donc désormais envisagé que le succès de la virothérapie anti-tumorale passe également par le développement d'une réaction immunitaire contre les cellules tumorales.

Notre équipe, dirigée par le Dr Marc Grégoire, développe des stratégies visant à induire la mort immunogène des cellules tumorales. Les travaux précédents de l'équipe ont démontré que des cellules tumorales de mésothéliome infectées par le MV induisent en co-culture la maturation de Mo-DC, alors que le virus seul ou les cellules tumorales induites en apoptose par irradiation UV-B ne permettent pas cette maturation (Gauvrit et al., 2008). Ces résultats suggèrent que l'infection génère des DAMP libérés par les cellules tumorales infectées et responsables de l'activation du programme de maturation et de présentation des antigènes des mDC. Parmi les DAMP libérés, le Dr Anne Gauvrit avait mis en évidence les protéines de choc thermique HSP70 et GP96. Avec le Dr Nicolas Boisgerault, nous avons pu

mettre en évidence que les cellules tumorales infectées libèrent d'autres DAMP, notamment la protéine HMGB1 (résultats non montrés). Melcher et ses collaborateurs ont également montré que l'infection par le MV induit la libération de la molécule HMGB1 et l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8, IFN-α et IFN-β, de la chimiokine RANTES par des cellules tumorales de mélanome (Donnelly et al., 2013). L'infection des cellules tumorales par le MV conduit également à l'expression de calréticuline à la surface de certaines lignées (données non montrées). L'ensemble de ces résultats démontre que le MV induit la production de DAMP et peut activer les DC myéloïdes, qui jouent un rôle central en liant l'immunité innée à l'immunité adaptative.

Les travaux d'Anne Gauvrit ont également mis en évidence que le MV se réplique intensément dans les cellules tumorales infectées. La quantité de particules virales infectieuses est approximativement multipliée par 100 dans le milieu de culture à 72h post-infection par rapport à l'inoculum (Gauvrit et al., 2008). Le virus oncolytique de la rougeole est un virus à ARN simple brin. Il constitue par conséquent un ligand naturel du TLR7, un PRR spécialisé dans la détection des ARN viraux simple brin et dont l'expression, parmi les cellules dendritiques humaines, est restreinte aux pDC (Hemont et al., 2013; Kadowaki et al., 2001). Les pDC constituent ainsi un élément central dans la réponse immunitaire antivirale grâce à leur capacité à synthétiser de grandes quantités d'IFN de type I en réponse à l'engagement des TLR7 et TLR9 (Liu, 2005). J'ai donc consacré la seconde partie de ma thèse à étudier, *in vitro*, les effets de cellules tumorales infectées par le virus oncolytique de la rougeole sur le phénotype et la fonction des pDC humaines.

Dans cette étude, j'ai pu mettre en évidence que les pDC ne sont pas infectées d'une manière productive par le MV. J'ai également démontré que les cellules tumorales infectées induisent la maturation des pDC, alors que les cellules tumorales induites en apoptose par exposition aux UV-B ne permettent pas cette maturation. Cette maturation est caractérisée par une forte augmentation du marqueur de maturation CD83 et la sécrétion de grandes quantités d'IFN-α. Par la suite, en utilisant un inhibiteur spécifique, j'ai identifié le TLR7 comme étant le récepteur impliqué dans la sécrétion d'IFN-α par les pDC en présence du MV. Enfin, j'ai démontré que les pDC réalisent la présentation croisée de l'antigène de tumeur NY-ESO-1, à un clone de lymphocyte T CD8+ spécifique du complexe HLA-A*0201/NY-ESO-1(157-165), uniquement lorsqu'elles sont co-cultivées avec des cellules tumorales NY-ESO-1^{+}, infectées par le MV.

Concernant l'infection des pDC, les travaux de Conzelmann et ses collaborateurs ainsi que ceux de Valentin et ses collaborateurs, apportaient des résultats contradictoires. Les deux

groupes mettent en évidence un marquage de l'hémagglutinine (H) virale du MV à la membrane des pDC. Conzelmann et ses collaborateurs concluent de ce marquage que les pDC sont infectées et amplifient le MV (Schlender et al., 2005), alors que Valentin et ses collaborateurs démontrent que, malgré l'expression de la protéine H à la membrane des pDC, le MV ne se réplique que très faiblement dans ce type cellulaire, en dosant le virus dans le surnageant de culture des pDC exposées au virus (Duhen et al., 2010). De plus, Valentin et ses collaborateurs démontrent que le virus s'accumule dans les endosomes et non dans le cytoplasme des pDC. J'ai pu confirmer, en partie, les résultats obtenus par Valentin et ses collaborateurs, par l'analyse de l'infection sur 72h des pDC avec une souche du MV recombinante pour la GFP. L'absence de signal GFP démontre que le virus n'est pas répliqué à l'intérieur des pDC.

Nous avons démontré que les cellules tumorales infectées et le MV activent la production d'IFN-α par les pDC. Quand nous avons commencé l'étude, la littérature présentait des résultats contradictoires quant à la capacité du MV à induire la sécrétion d'IFN-α par les pDC. En effet, Valentin et ses collaborateurs ont démontré que les pDC produisent de grandes quantités IFN-α en réponse au MV lorsqu'elles sont cultivées en présence d'IL-3, une cytokine essentielle à leur survie en l'absence de stimulation des TLR (Duhen et al., 2010). Conzelmann et ses collaborateurs ont rapporté, en l'absence d'IL-3, que le MV inhibe la sécrétion d'IFN-α par les pDC (Schlender et al., 2005). Mon travail explique que l'absence ou la présence d'IL-3 est à l'origine de ces résultats contradictoires. En présence de faible quantité de MV (MOI=1), sans autre signal de maturation ou d'IL-3, les pDC ne maturent pas et mourent rapidement. Ce résultat remettait en question la possibilité que le virus soit lui-même un signal de maturation pour les pDC. Lorsque les pDC sont mises en présence de la même quantité de MV, mais en présence d'IL-3 cette fois-ci, elles survivent, présentent un phénotype mature et produisent de l'IFN-α. Ces résultats suggèrent que sans IL-3, et en présence de faible quantité de MV, les pDC entrent en apoptose avant que des particules virales aient pu être internalisées et que l'ARN simple brin ait pu activer le programme de maturation/survie des pDC. Nous avons pu confirmer cette hypothèse en exposant les pDC, en l'absence ou en présence d'IL-3, à des doses croissantes de MV. En présence d'IL-3, les pDC produisent une quantité d'IFN-α qui augmente avec la quantité de virus. En absence d'IL-3, les pDC synthétisent de l'IFN-α uniquement lorsqu'elles sont exposées à la plus grande quantité de MV (MOI=50). A cette concentration, un nombre suffisant de particules virales doit atteindre le compartiment endosomal pour y activer le TLR7 responsable de la synthèse d'IFN-α avant que le processus d'apoptose ne soit engagé. Nos résultats ne confirment pas la conclusion de Conzelmann et ses collaborateurs qui proposent que le MV inhibe la synthèse d'IFN-α par les pDC et sont donc plutôt en

faveur des travaux de Valentin et ses collaborateurs. Dans notre étude, la production d'IFN-α par les pDC exposées aux MV est cohérente avec l'accumulation de particules virales dans les endosomes, et ne nécessite pas que les pDC soient infectées.

Nous avons démontré, à l'aide d'inhibiteurs spécifiques des TLR7 et TLR9, que le MV induit la production d'IFN-α par les pDC suite à l'activation du TLR7, probablement par l'ARNsb du MV. Il est clair aujourd'hui, qu'en fonction de la nature du ligand de TLR utilisé, il existe deux voies d'activation des pDC. Cette dichotomie a été rapportée pour la première fois par Kerkmann et ses collaborateurs, pour des ligands du TLR9, qui ont démontré que les CpG-A et CpG-B induisent deux voies d'activation distinctes : IRF7 et NF- κB (Kerkmann et al., 2003). Des travaux récents démontrent que cette dichotomie existe aussi en fonction du ligand TLR7 impliqué dans la maturation des pDC. Il a été démontré que le VIH se comporte comme le CpG-A pour le TLR9, et recrute le TLR7 dans les endosomes précoces, ce qui conduit à l'activation de la voie IRF7 responsable de la synthèse de grandes quantités d'IFN-α (O'Brien et al., 2011). Cette voie ne permet pas cependant une forte expression des molécules de costimulation. Lorsque le TLR7 est engagé dans l'endosome tardif, comme c'est les cas avec le R-848 qui agit comme le CpG-B pour le TLR9, c'est la voie NF-κB qui est majoritairement activée (Kerkmann et al., 2003; O'Brien et al., 2011). Cela provoque une forte expression des molécules de costimulation et de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-8. Le phénotype de maturation des pDC induit par le MV est caractérisé par l'expression de la molécule CD83 et la synthèse de grandes quantités d'IFN-α. Cependant les pDC expriment des niveaux faibles des molécules de costimulation CD40 et CD86. Ce phénotype de maturation des pDC exposées au MV et aux cellules tumorales infectées est similaire à celui observé pour les pDC exposées au VIH. Ceci suggère que le MV active le TLR7 dans les endosomes précoces et déclenche donc principalement la voie IRF7. Pour confirmer cette hypothèse, j'ai effectué le marquage des endosomes précoces et tardifs, respectivement avec les anticorps anti-EEA1 et anti-LAMP1, dans l'objectif de mettre en évidence, par microscopie confocale, la colocalisation du marquage EEA1 et du marquage de la nucléoprotéine (N) du MV. L'analyse par microscopie confocale a permis d'exclure la colocalisation entre la protéine N du MV et le compartiment LAMP1+. Le marquage diffus du compartiment EEA1 n'a pas permis de mettre en évidence une colocalisation entre la protéine N du MV et le compartiment EEA1+ des pDC (résultats non montrés).

Le mécanisme de présentation croisée ou "cross-présentation", qui permet aux DC de présenter des peptides extracellulaires dans le contexte des molécules HLA de classe I a été initialement décrit chez la souris, à partir de splénocytes par Michael J. Bevan en 1976

(Bevan, 1976). Il a fallu attendre la fin des années 90 pour démontrer que les DC myéloïdes excellent dans cet exercice (Albert et al., 1998; Regnault et al., 1999). En 2007, Anne Hosmalin et ses collaborateurs ont démontré que les pDC humaines cross-présentent efficacement différents antigènes du VIH, à partir de lymphocytes T CD4+ apoptotiques infectés à un niveau comparable à la présentation croisée effectuée par les mDC (Hoeffel et al., 2007). Plumas et ses collaborateurs observent, en 2009, que les pDC sont capables de cross-présenter des antigènes du virus influenza à partir de lymphocytes B infectés (Lui et al., 2009).

Récemment, il a été décrit que les cellules dendritiques CD141+ seraient la meilleure population de cellules présentatrices d'antigènes pour réaliser la présentation croisée d'antigènes (Bachem et al., 2010; Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010). Toutefois, d'autres résultats récents semblent montrer que les autres populations de DC, et notamment les pDC, seraient aussi performantes que les DC CD141+ pour réaliser la présentation croisée d'antigènes solubles (Segura et al., 2013a; Tel et al., 2013b). Cependant, ces mêmes études rapportent des résultats différents quant à la capacité des pDC à acquérir et cross-présenter des antigènes de tumeur à partir de cellules nécrotiques. Amigorena et ses collaborateurs démontrent que les pDC ne sont pas capables de cross-présenter l'antigène Melan-A à partir des cellules tumorales Mel888 nécrotiques (Segura et al., 2013a). De Vries et ses collaborateurs démontrent, au contraire, que les pDC, malgré des capacités de phagocytose plus faibles que les DC myéloïdes, cross-présentent les antigènes de tumeurs gp100 et Tyrosinase aussi efficacement que les mDC à partir de cellules nécrotiques BLM transfectées pour exprimer ces deux antigènes (Tel et al., 2013b). Ces différences de résultats pourraient s'expliquer par l'origine différente des pDC. Dans l'étude de Amigorena et ses collaborateurs, les pDC ont été obtenues à partir des amygdales, un organe lymphoïde secondaire, alors que dans l'étude de Tel et ses collaborateurs les pDC sont obtenues à partir du sang. D'après Amigorena et ses collaborateurs, les DC BDCA1+, BDCA3+ et pDC résidentes des organes lymphoïdes secondaires ont achevé leur différenciation et n'ont plus la nécessité d'être stimulées par un agoniste TLR pour pouvoir réaliser la présentation croisée d'antigènes. Ces même DC, sous leur forme circulante, n'auraient pas achevé leur différenciation et nécessiteraient l'activation par un agoniste TLR pour pouvoir réaliser la présentation croisée d'antigènes (Segura et al., 2012). La quantité d'antigène exprimée par les cellules tumorales pourraient également expliquer la différence entre l'étude de Segura et Tel . En effet, dans l'étude de De Vries et ses collaborateurs, les cellules n'expriment pas naturellement les antigènes de tumeur. Il est donc possible que les protéines à partir desquelles sont générés les épitopes cross-présentés soient produites en

beaucoup plus grandes quantités que dans les cellules Mel888 qui expriment naturellement l'antigène Melan-A utilisé dans l'étude de Amigorena et ses collaborateurs.

Dans notre étude, les pDC sont obtenues à partir du sang. La quantité d'antigène étant un élément limitant pour la présentation croisée, nous avons choisi de développer un modèle de présentation croisée utilisant un antigène naturellement exprimé par les cellules tumorales. Nous avons choisi la lignée de mélanome HLA-A*0201 négative qui exprimait le plus la protéine NY-ESO-1 parmi une vingtaine de lignées de mélanome de l'équipe du Pr Francine Jotereau. Notre étude confirme donc le résultat obtenu par d'autres équipes à partir de pDC issues du sang (Hoeffel et al., 2007; Lui et al., 2009; Tel et al., 2013b), qui montre que les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont capables de réaliser la présentation croisée d'antigènes à partir de cellules mortes et à un niveau comparable à celui observé avec les Mo-DC. Ce travail démontre également que les pDC peuvent cross-présenter des antigènes de tumeur dérivés de protéines exprimées à un niveau physiologique. La voie d'activation des pDC par le TLR7 dans les endosomes précoces, qui favorise l'activation du facteur IRF7, est donc compatible avec la présentation croisée des antigènes par les pDC. La capacité des pDC à activer des lymphocytes T CD8+ naïfs a déjà été démontrée à partir d'antigènes solubles (Nizzoli et al., 2013). Il reste néanmoins nécessaire de déterminer si la cross-présentation observée dans notre modèle permet l'activation de lymphocytes T CD8+ naïfs.

L'absence de consensus sur la capacité des différentes populations de DC à réaliser la présentation croisée d'antigènes nous incite à mettre à profit le modèle de présentation croisée que j'ai mis au point pour évaluer les propriétés de présentation croisée d'antigènes de ces différentes populations de DC du sang. Avec Raphaëlle Riou, l'étudiante en Master 2 recherche que j'ai supervisée pendant les derniers mois de ma thèse, nous avons développé une procédure de tri par cytométrie de flux de trois populations de DC issues du sang de donneurs sains : CD1c+, BDCA2+ et CD141+ DC. La réponse de ces différentes populations de DC aux cellules tumorales infectées et notamment leur capacité à réaliser la présentation croisée de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 à un clone de lymphocyte T CD8+ spécifique, va être rapidement évaluée dans ce modèle.

Au cours de l'étude de la présentation croisée par les pDC, nous avons souhaité confirmer le résultat obtenu avec l'antigène de tumeur NY-ESO-1, en utilisant un second antigène de tumeur étudié dans l'équipe : l'antigène MUC1 qui est notamment surexprimé dans le mésothéliome. Le Dr David Roulois a isolé pendant sa thèse un clone de lymphocyte T CD8+ cytotoxique humain spécifique du complexe HLA-A*0201/MUC1(950–958) (Roulois et al., 2011). Avec David, nous avons donc testé la possibilité de développer un second modèle de

présentation croisée d'antigènes de tumeur par les pDC à partir d'une lignée de cellules tumorales de mésothéliome Meso13 HLA-A*0201^{-} MUC1^{+}. Malheureusement, ce clone T spécifique du complexe HLA-A*0201/MUC1(950-958) reconnaît l'auto-antigène MUC1 endogène exprimé et présenté directement par les pDC et les Mo-DC. Ce clone s'active donc fortement contre les pDC non chargées. La présentation croisée de l'antigène de tumeur MUC1 par les pDC n'a donc pas pu être étudiée. Pour la suite de l'étude, qui consistera à comparer la capacité des différentes populations de DC circulantes à réaliser la présentation croisée d'antigènes, nous évaluerons également la cross-présentation du long peptide NY-ESO-1 (151-170).

Plumas et ses collaborateurs ont démontré que les pDC exposées à un agoniste TLR7/9 acquièrent des fonctions cytotoxiques grâce à l'expression de la molécule pro-apoptotique TRAIL. L'acquisition de ces propriétés cytotoxiques est dépendante de la sécrétion autocrine/paracrine d'IFN -α et -β par les pDC stimulées par un ligand TLR (Chaperot et al., 2006; Drobits et al., 2012). Ces propriétés cytotoxiques sont actuellement exploitées en clinique pour le traitement de carcinomes basocellulaires et mobilisées grâce à l'application d'une crème formulée avec 5% d'Imiquimod, un agoniste TLR7 (Stary et al., 2007). Sibilia et ses collaborateurs ont récemment mis en évidence, dans un modèle murin de mélanome, que l'application locale d'Imiquimod induit la sécrétion de CCL2, un facteur chimio-attractant, par les mastocytes infiltrant la lésion tumorale, ce qui permet le recrutement des pDC dans la tumeur. Sur place, les pDC sont exposées à leur tour à l'Imiquimod, synthétisent de l'IFN de type I responsable de l'acquisition de leurs fonctions cytotoxiques (Drobits et al., 2012). Dans une autre étude, De Vries et ses collaborateurs ont également démontré que les pDC peuvent acquérir des propriétés cytotoxiques suite à une stimulation du TLR7 par le FSME (Tel et al., 2012a). Cependant, les auteurs de cette étude démontrent que la cytotoxicité des pDC est indépendante de l'expression de TRAIL et du Granzyme B. Le MV étant un ligand naturel du TLR7, la possibilité que le MV induise l'acquisition de fonctions cytotoxiques par les pDC va être étudiée par notre équipe.

Il a également été montré que la contribution des pDC au développement d'une réaction immunitaire anti-tumorale passe par leur capacité à activer d'autres cellules de l'immunité. Liu et ses collaborateurs ont démontré, dans un modèle murin, que l'injection de pDC activées par un ligand du TLR9 (CpG) est responsable de l'activation de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques spécifiques d'antigènes de tumeur (Liu et al., 2008b). Les pDC activées sécrètent de grandes quantités de cytokines chimio-attractantes (CCL3, CCL4 et CCL5) responsables du recrutement dans la tumeur des lymphocytes NK, qui expriment le récepteur CCR5. Sur place, les lymphocytes NK sont exposés aux sécrétions d'IFN-α/β des pDC activées, ce qui

leur permet d'acquérir des fonctions cytotoxiques, notamment l'expression de la perforine. Les lymphocytes NK acquièrent également la capacité de sécréter de l'IFN-γ, qui contribue à leur cytotoxicité, grâce à la stimulation par le ligand OX40L exprimé par les pDC. Lou et ses collaborateurs ont également démontré, dans un modèle murin, que les pDC peuvent optimiser les capacités de présentation d'antigènes de tumeur et d'activation des lymphocytes T CD8+ des mDC (Lou et al., 2007). Cette coopération serait dépendante d'un contact direct entre les pDC et les mDC. Pour l'instant, la ou les molécules exprimées par les pDC, permettant cette coopération n'ont pas été identifiées dans ce modèle. Chez l'homme, les pDC activées par le VIH induisent la maturation des mDC en co-culture, alors que les mDC seules ne s'activent pas spontanément lorsqu'elles sont exposées au VIH (Fonteneau et al., 2004). Cette effet "bystander" sur les mDC est dépendant, dans ce cas, de la synthèse d'IFN-α et de TNF-α par les pDC activées. La capacité de présentation croisée des deux populations de DC seules ou en co-culture n'a pas été évaluée dans cette étude. Dans le cadre de la virothérapie anti-tumorale, les pDC activées par les cellules tumorales infectées par le MV pourraient participer à l'activation optimale des DC myéloïdes. En utilisant des Mo-DC comme modèle de DC myéloïdes, je souhaitais évaluer cette possibilité. En co-cultivant des Mo-DC d'un donneur HLA-A*0201 négatif avec les pDC d'un donneur HLA-A*0201 positif et vice-versa, je souhaitais évaluer la capacité des pDC exposées au MV à induire la maturation des Mo-DC, et leurs capacités respectives à réaliser la présentation croisée de l'antigène NY-ESO-1 à partir des cellules tumorales infectées. Les expériences préliminaires que j'ai réalisées dans les premiers mois de ma thèse ont donné des résultats préliminaires intéressants. En présence des pDC, les Mo-DC exposées aux cellules tumorales infectées montraient une forte production d'IL-12p70, alors que les Mo-DC exposées aux cellules tumorales infectées en l'absence des pDC n'en produisaient que de faibles quantités. Les tests de présentation croisée réalisés pour évaluer l'aide apportées par les pDC pour la cross-présentation par les Mo-DC, ou vis-versa, semblent montré que les pDC optimiseraient les capacités de présentation croisée des Mo-DC. Ces résultats sont à confirmer et le mécanisme qui régule cette coopération reste à déterminer.

Les pDC sont recrutées sous la forme immature dans la tumeur, grâce à la sécrétion de différentes molécules chimio-attractantes, et contribuent au conditionnement immunorégulateur du microenvironnement tumoral (Vermi et al., 2003). Les pDC associées aux tumeurs (TApDC) sont caractérisées par l'acquisition de propriétés immunosuppressives et leur insensibilité à la stimulation par le TLR9 (Sisirak et al., 2012). Les travaux de Caux et ses collaborateurs ont démontré, dans un modèle murin de cancer du sein, que les propriétés anti-tumorales des TApDC peuvent cependant être activées par un agoniste du TLR7 tel que le

SM360320 (Le Mercier et al., 2013). Dans cette étude, l'effet anti-tumoral des agonistes du TLR7 est strictement dépendant des pDC et de leur production d'IFN-α. Les auteurs démontrent que l'effet anti-tumoral des TApDC activées n'est pas dépendant de l'acquisition de propriétés cytotoxiques directes. Enfin, les auteurs démontrent que seules les injections intratumorales ont un effet anti-tumoral. Les injections controlatérales, même si elles induisent une augmentation de la concentration plasmatique de l'IFN-α, n'ont pas d'effet sur la croissance tumorale. Ce résultat suggère que les propriétés anti-tumorales de l'IFN-α sont dépendantes de son expression à l'intérieur de la tumeur, où il pourra contribuer au reconditionnement du microenvironnement tumoral.

Les pDC activées synthétisent de grandes quantités d'IFN de type I capables de mobiliser d'autres cellules de l'immunité innée et adaptative, réalisent la présentation croisée d'antigènes de tumeur et activent des lymphocytes T CD8+ spécifiques, permettent la polarisation des lymphocytes T CD4+ vers un phénotype T_H1 essentiel au développement de la réponse immunitaire T CD8+ cytotoxique, et acquièrent, sous certaines conditions de stimulation, des propriétés cytotoxiques contre les cellules tumorales. Ces propriétés font des pDC une cible intéressante à mobiliser pour le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Mon travail de thèse démontre que le virus oncolytique de la rougeole est capable d'infecter et de lyser des cellules tumorales issues de différents types de cancers (Boisgerault et al., 2013). Le lysat cellulaire qui résulte de l'infection forme une matrice capable d'activer au moins deux des propriétés anti-tumorales des pDC : leur capacité à sécréter de grandes quantités d'IFN-α et leur capacité à cross-présenter des antigènes (Guillerme et al., 2013b). La virothérapie anti-tumorale utilisant la souche Schwarz atténuée du virus de la rougeole serait donc un moyen de recruter les pDC dans la réponse immunitaire anti-tumorale et présenterait l'avantage, par rapport aux autres agonistes TLR7, de libérer des antigènes tumoraux pour la présentation croisée.

De plus, l'équipe du Pr Frédéric Tangy développe des souches modifiées du virus oncolytique de la rougeole. Récemment, notre équipe a participé au développement du MV-ΔC, une souche modifiée du MV qui n'exprime plus la protéine non structurale C, contribuant à inhiber l'activation de la réponse immunitaire en bloquant la production d'IFN de type I par les cellules infectées. Cette modification devrait contribuer à optimiser la spécificité de l'infection dans les cellules tumorales, souvent dépourvues de la voie de signalisation de l'IFN de type I, et protéger les tissus sains en permettant aux cellules saines infectées de produire de l'IFN de type I pour limiter la réplication du virus. Nous avons également observé que cette modification semble accélérer la cinétique d'infection des cellules tumorales par rapport à la

souche non modifiée et provoquer la mort des cellules tumorales plus rapidement. Ma participation à la caractérisation de cette souche m'a permis de faire partie des déposants du brevet qui protège l'utilisation de cette souche **(Annexe 3)**.

L'ensemble de ces résultats apporte de nouveaux arguments qui justifient l'évaluation clinique des propriétés anti-tumorales du virus oncolytique (souche Schwarz) de la rougeole. En collaboration avec l'équipe du Pr Frédéric Tangy, l'équipe du Dr Marc Grégoire souhaite développer rapidement un essai clinique dans le traitement du mésothéliome pleural malin pour lequel il n'existe aucun traitement efficace.

IX. Perspectives :

Dans cette étude, j'ai montré que les pDC sont activées par le MV et les cellules tumorales infectées par le MV. Cette activation est caractérisée par la synthèse de grandes quantités d'IFN-α, la capacité des pDC à internaliser des morceaux de cellules tumorales infectées et leur capacité à réaliser la présentation croisée de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 à un clone de lymphocytes T CD8+ spécifique. Il a été démontré que les pDC exposées à certains agonistes TLR7 ou TLR9 peuvent acquérir des fonctions cytotoxiques grâce à l'expression des molécules TRAIL et Granzyme B. L'acquisition de ces propriétés cytotoxiques est dépendante de la sécrétion autocrine/paracrine d'IFN-α et -β par les pDC stimulées par un ligand TLR (Chaperot et al., 2006; Drobits et al., 2012; Tel et al., 2012a). Le MV étant un ligand naturel du TLR7, la possibilité que le MV active les fonctions cytotoxiques des pDC va être étudiée par notre équipe.

Dans une première étude, l'équipe du Dr Marc Grégoire a caractérisé l'effet de la virothérapie anti-tumorale utilisant le virus oncolytique de la rougeole sur des DC obtenues à partir de monocytes sanguins, largement utilisés comme modèle des DC myéloïdes circulantes (mDC). Toutefois, il apparaît que les propriétés des Mo-DC ne sont pas représentatives des propriétés des mDC circulantes naturelles. Nous souhaitons donc poursuivre ce travail en évaluant l'impact de notre stratégie de virothérapie anti-tumorale sur le phénotype et la fonction des mDC CD1c+ et CD141+.

Les pDC pourraient également optimiser les capacités de présentation croisée des mDC grâce à leur capacité à synthétiser de grandes quantités d'IFN de type I suite à leur activation par le MV. Cette coopération entre les pDC et les mDC a déjà été démontrée dans un modèle murin et serait dépendante d'un contact direct entre les pDC et les mDC (Lou et al., 2007). Dans un autre modèle murin, Janssen et ses collaborateurs ont démontré que l'efficaci-

té d'un traitement adjuvant par injection de CpG, suite à une cryothérapie, est dépendante d'une coopération entre les mDC CD8α+ et les pDC (Nierkens et al., 2011). Dans ce modèle, les mDC CD8α+ acquièrent et réalisent efficacement la présentation croisée de l'antigène OVA uniquement en présence des pDC. Cette coopération est dépendante, dans ce cas, de la sécrétion d'IFN-α par les pDC. Chez l'homme, les pDC activées par le VIH induisent la maturation des mDC en co-culture, alors que les mDC seules ne s'activent pas spontanément lorsqu'elles sont exposées au VIH (Fonteneau et al., 2004). Cette effet "bystander" des pDC sur les mDC est dépendant, dans ce cas, de la synthèse d'IFN-α et de TNF-α par les pDC activées. La capacité de présentation croisée des deux populations de DC seules, ou en co-culture, n'a pas été évaluée dans cette étude. Nous souhaitons évaluer la possibilité d'une telle coopération dans notre modèle.

Immunothérapie anti-tumorale et virothérapie anti-tumorale

La stratégie de virothérapie anti-tumorale vient renforcer une collection de stratégies d'immunothérapie anti-tumorale déjà développées. On peut classer les immunothérapies en 4 grandes catégories : la vaccination, les thérapies adjuvantes, le transfert adoptif de lymphocytes T et le blocage des "checkpoint" immunitaires (Lizee et al., 2013).

La vaccination utilise les propriétés de présentation antigénique des DC. La majorité de ces stratégies consistent à isoler des monocytes sanguins puis à les différencier *ex vivo* en cellules dendritiques dérivées de monocytes (Mo-DC) en présence d'IL-4 et de GM-CSF. Ces Mo-DC sont chargées en antigènes suivant différents protocoles. Les Mo-DC peuvent être chargées avec des long peptides contenant des épitopes d'antigènes de tumeurs connus (Karbach et al., 2012), avec des protéines complètes de TAA (Chen et al., 2013) ou être transfectées avec des ARN messagers codant pour un antigène de tumeur (Aarntzen et al., 2012). L'inconvénient principal de ces stratégies de chargement est qu'on ne peut induire une réponse immunitaire que contre un nombre retreint d'antigènes. Charger les DC avec un lysat de cellules tumorales autologues (Kamigaki et al., 2013; Lasky et al., 2013) ou réaliser un hybride entre une cellule tumorale et une DC par électro-fusion (Shimizu et al., 2004) permettrait la présentation d'une multitude d'antigènes de tumeur spécifiques du patient. Une autre limitation de cette stratégie est l'injection des DC chargées. Les DC doivent impérativement migrer dans les ganglions lymphatiques pour pouvoir primer une réponse T. L'injection intranodale permet une meilleure migration des DC dans les ganglions (84% des DC injectées), par rapport aux injections intradermiques (4% des DC injectées). Cependant, la voie d'administration

par injection intradermique des DC génère plus fréquemment des cellules T fonctionnelles reconnaissant fortement les cellules tumorales (Lesterhuis et al., 2011). Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que l'injection intranodale déstructure l'architecture du ganglion lymphatique nuisant à l'activation des cellules T, ou encore par le fait que les DC injectées dans le derme subissent une maturation après l'administration qui optimise leur capacité à sensibiliser des lymphocytes T (Lesterhuis et al., 2011).

Dès la fin du 19ème siècle, William Coley propose l'injection intra-tumorale de bactéries comme traitement anti-tumoral suite à l'observation que certaines infections par *Streptococcus pyogenes* coïncident avec des régressions tumorales chez des patients atteints de sarcomes cutanés (Coley, 1991). Aujourd'hui, une stratégie similaire utilise des injections intravésicales de Bacille de Calmette et Guérin dans le traitement des cancers superficiels de la vessie (Morales et al., 1976). D'autres thérapies adjuvantes consistent en l'injection de ligands agonistes des TLR comme les oligodésoxynucléotides CpG (TLR9) (Pashenkov et al., 2006) et l'imiquimod (TLR7) (Geisse et al., 2004) ou des agonistes du récepteur CD40 exprimé par les DC (Advani et al., 2009). Ces stratégies permettent une maturation phénotypique et fonctionnelle des DC, indispensable à leur migration dans les ganglions lymphatiques (expression de CCR7) et à l'activation de lymphocytes T CD8+ naïfs.

Le transfert adoptif de lymphocytes T consiste à amplifier *ex vivo* les lymphocytes autologues du patient. Les lymphocytes peuvent être obtenus à partir de pièces opératoires. Dans ce cas, ce sont les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) qui sont amplifiés puis réinjectés (Labarriere et al., 2002; Rosenberg et al., 2011). Les lymphocytes peuvent être obtenus à partir des PBMC. Dans ce cas, ils seront stimulés avec des antigènes de tumeurs connus (Yee et al., 2002), transfectés avec un TCR spécifique d'un TAA exprimé par la tumeur (Morgan et al., 2006) ou transfectés avec un récepteur antigénique chimérique (CAR) (Burns et al., 2010). La réinjection des lymphocytes s'accompagne d'injection d'IL-2 permettant la survie des lymphocytes injectés (Rosenberg et al., 1986). La stratégie d'amplification et de transfert des TIL présente l'avantage de cibler une collection d'antigènes spécifiques du patient. L'efficacité de cette stratégie suppose que les lymphocytes injectés migrent dans la tumeur et puissent y mettre en œuvre leurs propriétés cytotoxiques.

Les lymphocytes T expriment des récepteurs qui peuvent inhiber leurs fonctions cytotoxiques, notamment CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), PD-1 (Programmed death 1), TIM-3 (T cell immunoglobulin mucin-3) et BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator). Des anticorps inhibiteurs de ces molécules ont été développés. Initialement décrites chez

la souris, les propriétés anti-tumorales du blocage du CTLA-4 sont aujourd'hui exploitées en clinique (Leach et al., 1996). L'ipilimumab, un anticorps monoclonal dirigé contre CTLA-4, permet d'augmenter significativement l'espérance de vie de patients atteints de mélanome métastatique (Hodi et al., 2010). Les patients recevaient soit une injection intraveineuse d'ipilimumab, soit une injection intraveineuse d'ipilimumab + 2 peptides gp100 dans du Montanide ISA-51 en sous cutanée, soit une injection sous cutanée des 2 peptides gp100 dans du Montanide ISA-51. La survie des patients traités par ipilimumab est augmentée par rapport aux patient n'ayant reçu que l'injection de peptides (10,1 mois V.S. 6,4 mois). L'injection des peptides ne modifie pas la survie.

La stratégie de virothérapie anti-tumorale utilise les propriétés oncolytiques de certains virus pour infecter de manière spécifique les cellules tumorales et les tuer. Les cellules tumorales mortes constituent une matrice contenant des signaux de danger moléculaires, synthétisés ou libérés par les cellules sous l'action du stress généré par l'infection, des signaux de danger dérivés de constituants du virus lui-même qui sont perçus par les DC grâce à l'expression d'une collection de PRR spécifiques, et des antigènes de tumeur pour la présentation aux lymphocytes T CD8+ (Donnelly et al., 2013; Gauvrit et al., 2008; Guillerme et al., 2013b). L'injection intra-tumorale d'un virus oncolytique pourrait représenter un moyen efficace de recruter les propriétés de présentation antigénique de DC en les exposant à un lysat de cellules tumorales autologues fournissant une source d'antigènes multiples spécifiques du patient, et des agents de maturation permettant la maturation fonctionnelle des DC indispensable à l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale cellulaire. Cette maturation devra inclure l'expression des molécules de co-stimulation, la sécrétion de cytokines (IFN de type I et IL-12), la présentation d'antigènes et l'expression des récepteurs CCR7 aux chimiokines CCL21 et CCL19, indispensables à la migration des DC dans les ganglions lymphatiques (Seth et al., 2011). L'injection intra-tumorale d'un virus oncolytique pourrait permettre la mobilisation des DC infiltrant la tumeur, en partie responsables du conditionnement immunosuppresseur du microenvironnement tumoral. Les DC ainsi activées pourraient participer au reconditionnement du microenvironnement tumoral en sécrétant des cytokines immuno-activatrices et particulièrement l'IFN de type I. La virothérapie anti-tumorale permettrait ainsi de générer un point d'inflammation au site de la tumeur qui pourrait jouer un rôle essentiel dans l'infiltration des LT anti-tumoraux activés dans les ganglions. En effet, il a été montré que l'injection sous-cutanée de peptides antigéniques formulés dans un adjuvant incomplet de Freund peut conduire à une séquestration des LT spécifiques de ces antigènes au point d'injection, plutôt que d'infiltrer la tumeur (Gnjatic and Bhardwaj, 2013; Hailemichael et al., 2013).

La virothérapie anti-tumorale pourrait ainsi regrouper plusieurs avantages de différentes stratégies d'immunothérapie, notamment la mobilisation intra-tumorale des DC contribuant à reconditionner le microenvironnement tumoral, le chargement des DC par une multitude d'antigènes de tumeurs spécifiques du patient, une maturation compatible avec la migration des DC dans les ganglions et la présentation d'antigènes de tumeur.

Au même titre que les réponses immunitaires anti-tumorales cellulaires spontanées et celles induites par les différentes stratégies d'immunothérapie, les réponses LT CD8+ générées par la virothérapie anti-tumorale peuvent être inhibées par différents "checkpoint" immunitaires, notamment l'expression par LT CD8+ spécifiques d'antigènes de tumeur de récepteurs inhibiteurs tels que CTLA-4, PD-1, BTLA ou TIM-3. Des anticorps bloquant ces "checkpoint" immunitaires, utilisés en combinaison avec la virothérapie anti-tumorale, pourraient permettre d'augmenter l'efficacité thérapeutique de cette stratégie. Un essai clinique de phase II évalue actuellement l'efficacité thérapeutique de la virothérapie anti-tumorale utilisant le TVEC (HSV modifié) combinée à l'injection d'ipilimumab (anti-CTLA-4) sur des patients atteints de mélanome de stade III ou IV non opérable.
(http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01740297?term=ipilimumab+oncolytic&rank=1)

Il est ainsi essentiel de déterminer si la stratégie de virothérapie anti-tumorale utilisant le virus atténué de la rougeole remplit l'ensemble des critères nécessaires à une efficacité thérapeutique optimale.

REFERENCES

X. Références

2009. Progress towards measles elimination in WHO's European Region, 2005-2008. *Wkly Epidemiol Rec* 84:57-64.

Aarntzen, E.H., G. Schreibelt, K. Bol, W.J. Lesterhuis, A.J. Croockewit, J.H. de Wilt, M.M. van Rossum, W.A. Blokx, J.F. Jacobs, T. Duiveman-de Boer, D.H. Schuurhuis, R. Mus, K. Thielemans, I.J. de Vries, C.G. Figdor, C.J. Punt, and G.J. Adema. 2012. Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells responses in stage III and IV melanoma patients. *Clin Cancer Res* 18:5460-5470.

Ackerman, A.L., A. Giodini, and P. Cresswell. 2006. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25:607-617.

Aderem, A., and D.M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.

Advani, R., A. Forero-Torres, R.R. Furman, J.D. Rosenblatt, A. Younes, H. Ren, K. Harrop, N. Whiting, and J.G. Drachman. 2009. Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:4371-4377.

Akashi-Takamura, S., and K. Miyake. 2008. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 20:420-425.

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

Albert, M.L., S.F. Pearce, L.M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R.L. Silverstein, and N. Bhardwaj. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 188:1359-1368.

Allen, C., M. Opyrchal, I. Aderca, M.A. Schroeder, J.N. Sarkaria, E. Domingo, M.J. Federspiel, and E. Galanis. 2013. Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells. *Gene Ther* 20:444-449.

Amedei, A., A. Cappon, G. Codolo, A. Cabrelle, A. Polenghi, M. Benagiano, E. Tasca, A. Azzurri, M.M. D'Elios, G. Del Prete, and M. de Bernard. 2006. The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori promotes Th1 immune responses. *The Journal of clinical investigation* 116:1092-1101.

Andersen, M.H., D. Schrama, P. Thor Straten, and J.C. Becker. 2006. Cytotoxic T cells. *The Journal of investigative dermatology* 126:32-41.

Anderson, B.D., T. Nakamura, S.J. Russell, and K.W. Peng. 2004. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res* 64:4919-4926.

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. Andre, 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.

Atkins, D., A. Breuckmann, G.E. Schmahl, P. Binner, S. Ferrone, F. Krummenauer, S. Storkel, and B. Seliger. 2004. MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 109:265-273.

Bachem, A., S. Guttler, E. Hartung, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H.W. Mages, V. Henn, P.M. Kloetzel, S. Gurka, and R.A. Kroczek. 2010. Superior antigen

cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 207:1273-1281.

Banchereau, J., and A.K. Palucka. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature reviews. Immunology* 5:296-306.

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

Bankamp, B., M. Takeda, Y. Zhang, W. Xu, and P.A. Rota. 2011. Genetic characterization of measles vaccine strains. *The Journal of infectious diseases* 204 Suppl 1:S533-548.

Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-233.

Bedoui, S., P.G. Whitney, J. Waithman, L. Eidsmo, L. Wakim, I. Caminschi, R.S. Allan, M. Wojtasiak, K. Shortman, F.R. Carbone, A.G. Brooks, and W.R. Heath. 2009. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10:488-495.

Beignon, A.S., K. McKenna, M. Skoberne, O. Manches, I. DaSilva, D.G. Kavanagh, M. Larsson, R.J. Gorelick, J.D. Lifson, and N. Bhardwaj. 2005. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *The Journal of clinical investigation* 115:3265-3275.

Bekeredjian-Ding, I., M. Schafer, E. Hartmann, R. Pries, M. Parcina, P. Schneider, T. Giese, S. Endres, B. Wollenberg, and G. Hartmann. 2009. Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 128:439-450.

Benedict, C.A., P.S. Norris, T.I. Prigozy, J.L. Bodmer, J.A. Mahr, C.T. Garnett, F. Martinon, J. Tschopp, L.R. Gooding, and C.F. Ware. 2001. Three adenovirus E3 proteins cooperate to evade apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2. *J Biol Chem* 276:3270-3278.

Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, R.A. Flavell, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478-480.

Berchtold, S., J. Lampe, T. Weiland, I. Smirnow, S. Schleicher, R. Handgretinger, H.G. Kopp, J. Reiser, F. Stubenrauch, N. Mayer, N.P. Malek, M. Bitzer, and U.M. Lauer. 2013. Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J Virol* 87:3484-3501.

Berdasco, M., and M. Esteller. 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Developmental cell* 19:698-711.

Berger-Achituv, S., V. Brinkmann, U.A. Abed, L.I. Kuhn, J. Ben-Ezra, R. Elhasid, and A. Zychlinsky. 2013. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Frontiers in immunology* 4:48.

Bevan, M.J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *The Journal of experimental medicine* 143:1283-1288.

Beyer, I., H. Cao, J. Persson, H. Wang, Y. Liu, R. Yumul, Z. Li, D. Woodle, R. Manger, M. Gough, D. Rocha, J. Bogue, A. Baldessari, R. Berenson, D. Carter, and A. Lieber. 2013. Transient removal of CD46 is safe and increases B-cell depletion by rituximab in CD46 transgenic mice and macaques. *Mol Ther* 21:291-299.

Biesecker, M., J.H. Kimn, H. Lu, D. Dingli, and Z. Bajzer. 2010. Optimization of virotherapy for cancer. *Bulletin of mathematical biology* 72:469-489.

Birkeland, S.A., H.H. Storm, L.U. Lamm, L. Barlow, I. Blohme, B. Forsberg, B. Eklund, O. Fjeldborg, M. Friedberg, L. Frodin, and et al. 1995. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* 60:183-189.

Biron, C.A., K.B. Nguyen, G.C. Pien, L.P. Cousens, and T.P. Salazar-Mather. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17:189-220.

Bischoff, J.R., D.H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J.A. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaey, and F. McCormick. 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274:373-376.

Blazar, B.R., F.P. Lindberg, E. Ingulli, A. Panoskaltsis-Mortari, P.A. Oldenborg, K. Iizuka, W.M. Yokoyama, and P.A. Taylor. 2001. CD47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine* 194:541-549.

Blechacz, B., P.L. Splinter, S. Greiner, R. Myers, K.W. Peng, M.J. Federspiel, S.J. Russell, and N.F. LaRusso. 2006. Engineered measles virus as a novel oncolytic viral therapy system for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 44:1465-1477.

Bluestone, J.A. 1995. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 2:555-559.

Blum, A., L. Chaperot, J.P. Molens, V. Foissaud, D. Plantaz, and J. Plumas. 2006. Mechanisms of TRAIL-induced apoptosis in leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Experimental hematology* 34:1655-1662.

Bluming, A.Z., and J.L. Ziegler. 1971. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet* 2:105-106.

Boisgerault, N., J.B. Guillerme, D. Pouliquen, M. Mesel-Lemoine, C. Achard, C. Combredet, J.F. Fonteneau, F. Tangy, and M. Gregoire. 2013. Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. *BioMed research international* 2013:387362.

Boisgerault, N., F. Tangy, and M. Gregoire. 2010. New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play. *Immunotherapy* 2:185-199.

Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M.C. Nussenzweig, and R.M. Steinman. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine* 196:1627-1638.

Borkowski, T.A., J.J. Letterio, A.G. Farr, and M.C. Udey. 1996. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* 184:2417-2422.

Bourke, E., D. Bosisio, J. Golay, N. Polentarutti, and A. Mantovani. 2003. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 102:956-963.

Breitbach, C.J., R. Arulanandam, N. De Silva, S.H. Thorne, R. Patt, M. Daneshmand, A. Moon, C. Ilkow, J. Burke, T.H. Hwang, J. Heo, M. Cho, H. Chen, F.A. Angarita, C. Addison, J.A. McCart, J.C. Bell, and D.H. Kirn. 2013. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res* 73:1265-1275.

Breitbach, C.J., J. Burke, D. Jonker, J. Stephenson, A.R. Haas, L.Q. Chow, J. Nieva, T.H. Hwang, A. Moon, R. Patt, A. Pelusio, F. Le Boeuf, J. Burns, L. Evgin, N. De Silva, S. Cvancic, T. Robertson, J.E. Je, Y.S. Lee, K. Parato, J.S. Diallo, A. Fenster, M. Daneshmand, J.C. Bell, and D.H. Kirn. 2011. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 477:99-102.

Brem, H., I. Gresser, J. Grosfeld, and J. Folkman. 1993. The combination of antiangiogenic agents to inhibit primary tumor growth and metastasis. *J Pediatr Surg* 28:1253-1257.

Brown, G.C., and J.J. Neher. 2012. Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends in biochemical sciences* 37:325-332.

Brown, G.D. 2012. Immunology: Actin' dangerously. *Nature* 485:589-590.

Bucheit, A.D., S. Kumar, D.M. Grote, Y. Lin, V. von Messling, R.B. Cattaneo, and A.K. Fielding. 2003. An oncolytic measles virus engineered to enter cells through the CD20 antigen. *Mol Ther* 7:62-72.

Burnet, M. 1957. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1:779-786.

Burns, W.R., Y. Zhao, T.L. Frankel, C.S. Hinrichs, Z. Zheng, H. Xu, S.A. Feldman, S. Ferrone, S.A. Rosenberg, and R.A. Morgan. 2010. A high molecular weight melanoma-associated antigen-specific chimeric antigen receptor redirects lymphocytes to target human melanomas. *Cancer Res* 70:3027-3033.

Caballero, O.L., and Y.T. Chen. 2009. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer science* 100:2014-2021.

Candido, J., and T. Hagemann. 2013. Cancer-related inflammation. *Journal of clinical immunology* 33 Suppl 1:S79-84.

Cao, W., and L. Bover. 2010. Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunological reviews* 234:163-176.

Cao, W., D.B. Rosen, T. Ito, L. Bover, M. Bao, G. Watanabe, Z. Yao, L. Zhang, L.L. Lanier, and Y.J. Liu. 2006. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *The Journal of experimental medicine* 203:1399-1405.

Cao, W., L. Zhang, D.B. Rosen, L. Bover, G. Watanabe, M. Bao, L.L. Lanier, and Y.J. Liu. 2007. BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS biology* 5:e248.

Chabot, V., P. Reverdiau, S. Iochmann, A. Rico, D. Senecal, C. Goupille, P.Y. Sizaret, and L. Sensebe. 2006. CCL5-enhanced human immature dendritic cell migration through the basement membrane in vitro depends on matrix metalloproteinase-9. *Journal of leukocyte biology* 79:767-778.

Chang, M., W. Jin, and S.C. Sun. 2009. Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat Immunol* 10:1089-1095.

Chaperot, L., A. Blum, O. Manches, G. Lui, J. Angel, J.P. Molens, and J. Plumas. 2006. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology* 176:248-255.

Charles, J., J. Di Domizio, D. Salameire, N. Bendriss-Vermare, C. Aspord, R. Muhammad, C. Lefebvre, J. Plumas, M.T. Leccia, and L. Chaperot. 2010. Characterization of circulating dendritic cells in melanoma: role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor. *The Journal of investigative dermatology* 130:1646-1656.

Chen, Y., A. Huang, M. Gao, Y. Yan, and W. Zhang. 2013. Potential therapeutic value of dendritic cells loaded with NYESO1 protein for the immunotherapy of advanced hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular medicine*

Chen, Y.T., A.D. Boyer, C.S. Viars, S. Tsang, L.J. Old, and K.C. Arden. 1997. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenetics and cell genetics* 79:237-240.

Cheng, A.L., Y.K. Kang, Z. Chen, C.J. Tsao, S. Qin, J.S. Kim, R. Luo, J. Feng, S. Ye, T.S. Yang, J. Xu, Y. Sun, H. Liang, J. Liu, J. Wang, W.Y. Tak, H. Pan, K. Burock, J. Zou, D. Voliotis, and Z. Guan. 2009. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 10:25-34.

Chiba, S., M. Baghdadi, H. Akiba, H. Yoshiyama, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, Y. Fujioka, Y. Ohba, J.V. Gorman, J.D. Colgan, M. Hirashima, T. Uede, A. Takaoka, H. Yagita, and M. Jinushi. 2012. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol* 13:832-842.

Chiocca, E.A. 2002. Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer* 2:938-950.

Chou, J., J.J. Chen, M. Gross, and B. Roizman. 1995. Association of a M(r) 90,000 phosphoprotein with protein kinase PKR in cells exhibiting enhanced phosphorylation of translation initiation factor eIF-2 alpha and premature shutoff of protein synthesis after infection with gamma 134.5- mutants of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10516-10520.

Chouaib, S., F. El Hage, H. Benlalam, and F. Mami-Chouaib. 2006. [Immunotherapy of cancer: promise and reality]. *Medecine sciences : M/S* 22:755-759.

Cohn, L., B. Chatterjee, F. Esselborn, A. Smed-Sorensen, N. Nakamura, C. Chalouni, B.C. Lee, R. Vandlen, T. Keler, P. Lauer, D. Brockstedt, I. Mellman, and L. Delamarre. 2013. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *The Journal of experimental medicine* 210:1049-1063.

Coley, W.B. 1991. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clinical orthopaedics and related research* 3-11.

Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5:1219-1226.

Conrad, C., J. Gregorio, Y.H. Wang, T. Ito, S. Meller, S. Hanabuchi, S. Anderson, N. Atkinson, P.T. Ramirez, Y.J. Liu, R. Freedman, and M. Gilliet. 2012. Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res* 72:5240-5249.

Crozat, K., R. Guiton, V. Contreras, V. Feuillet, C.A. Dutertre, E. Ventre, T.P. Vu Manh, T. Baranek, A.K. Storset, J. Marvel, P. Boudinot, A. Hosmalin, I. Schwartz-Cornil, and M. Dalod. 2010. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 207:1283-1292.

Cumberbatch, M., M. Bhushan, R.J. Dearman, I. Kimber, and C.E. Griffiths. 2003. IL-1beta-induced Langerhans' cell migration and TNF-alpha production in human skin: regulation by lactoferrin. *Clinical and experimental immunology* 132:352-359.

Curtsinger, J.M., J.O. Valenzuela, P. Agarwal, D. Lins, and M.F. Mescher. 2005. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *Journal of immunology* 174:4465-4469.

D'Elios, M.M., A. Amedei, A. Cappon, G. Del Prete, and M. de Bernard. 2007. The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori (HP-NAP) as an immune modulating agent. *FEMS immunology and medical microbiology* 50:157-164.

de Vries, R.D., A.W. Mesman, T.B. Geijtenbeek, W.P. Duprex, and R.L. de Swart. 2012. The pathogenesis of measles. *Current opinion in virology* 2:248-255.

Decalf, J., S. Fernandes, R. Longman, M. Ahloulay, F. Audat, F. Lefrerre, C.M. Rice, S. Pol, and M.L. Albert. 2007. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *The Journal of experimental medicine* 204:2423-2437.

Delamarre, L., M. Pack, H. Chang, I. Mellman, and E.S. Trombetta. 2005. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307:1630-1634.

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

Delpeut, S., R.S. Noyce, R.W. Siu, and C.D. Richardson. 2012. Host factors and measles virus replication. *Current opinion in virology* 2:773-783.

Demoulin, S., M. Herfs, P. Delvenne, and P. Hubert. 2013. Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms. *Journal of leukocyte biology* 93:343-352.

Derycke, M.S., S.E. Pambuccian, C.B. Gilks, S.E. Kalloger, A. Ghidouche, M. Lopez, R.L. Bliss, M.A. Geller, P.A. Argenta, K.M. Harrington, and A.P. Skubitz. 2010. Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol* 134:835-845.

Deryugina, E.I., and J.P. Quigley. 2006. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* 25:9-34.

Dhodapkar, M.V., R.M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, and N. Bhardwaj. 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 193:233-238.

Di Gaetano, N., E. Cittera, R. Nota, A. Vecchi, V. Grieco, E. Scanziani, M. Botto, M. Introna, and J. Golay. 2003. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *Journal of immunology* 171:1581-1587.

Diamond, M.S., M. Kinder, H. Matsushita, M. Mashayekhi, G.P. Dunn, J.M. Archambault, H. Lee, C.D. Arthur, J.M. White, U. Kalinke, K.M. Murphy, and R.D. Schreiber. 2011. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *The Journal of experimental medicine* 208:1989-2003.

Dingli, D., K.W. Peng, M.E. Harvey, P.R. Greipp, M.K. O'Connor, R. Cattaneo, J.C. Morris, and S.J. Russell. 2004. Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. *Blood* 103:1641-1646.

Donnelly, O.G., F. Errington-Mais, L. Steele, E. Hadac, V. Jennings, K. Scott, H. Peach, R.M. Phillips, J. Bond, H. Pandha, K. Harrington, R. Vile, S. Russell, P. Selby, and A.A. Melcher. 2013. Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther* 20:7-15.

Doughty, L. 2011. Pathogen Associated Molecular Patterns, Pattern Recognition Receptors and Pediatric Sepsis. *The Open Inflammation Journal* 4:31-48.

Dranoff, G., E. Jaffee, A. Lazenby, P. Golumbek, H. Levitsky, K. Brose, V. Jackson, H. Hamada, D. Pardoll, and R.C. Mulligan. 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.

Drobits, B., M. Holcmann, N. Amberg, M. Swiecki, R. Grundtner, M. Hammer, M. Colonna, and M. Sibilia. 2012. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *The Journal of clinical investigation* 122:575-585.

Dudley, M.E., J.R. Wunderlich, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, R.M. Sherry, F.M. Marincola, S.F. Leitman, C.A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K.E. Morton, A. Nahvi, S.A. Mavroukakis, D.E. White, and S.A. Rosenberg. 2002. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *Journal of immunotherapy* 25:243-251.

Duhen, T., F. Herschke, O. Azocar, J. Druelle, S. Plumet, C. Delprat, S. Schicklin, T.F. Wild, C. Rabourdin-Combe, D. Gerlier, and H. Valentin. 2010. 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 research* 152:115-125.

Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329-360.

Dzionek, A., Y. Inagaki, K. Okawa, J. Nagafune, J. Rock, Y. Sohma, G. Winkels, M. Zysk, Y. Yamaguchi, and J. Schmitz. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Human immunology* 63:1133-1148.

Ebert, O., K. Shinozaki, C. Kournioti, M.S. Park, A. Garcia-Sastre, and S.L. Woo. 2004. Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. *Cancer Res* 64:3265-3270.

Enders, J.F., and T.C. Peebles. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 86:277-286.

Esolen, L.M., S.W. Park, J.M. Hardwick, and D.E. Griffin. 1995. Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cells. *J Virol* 69:3955-3958.

Eugenin, E.A., M.C. Branes, J.W. Berman, and J.C. Saez. 2003. TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. *Journal of immunology* 170:1320-1328.

Fabre-Lafay, S., S. Garrido-Urbani, N. Reymond, A. Goncalves, P. Dubreuil, and M. Lopez. 2005. Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem* 280:19543-19550.

Facchetti, F., C. de Wolf-Peeters, D.Y. Mason, K. Pulford, J.J. van den Oord, and V.J. Desmet. 1988. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *The American journal of pathology* 133:15-21.

Fadok, V.A., and G. Chimini. 2001. The phagocytosis of apoptotic cells. *Seminars in immunology* 13:365-372.

Fanger, N.A., K. Wardwell, L. Shen, T.F. Tedder, and P.M. Guyre. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *Journal of immunology* 157:541-548.

Feller, A.C., K. Lennert, H. Stein, H.D. Bruhn, and H.H. Wuthe. 1983. Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases. *Histopathology* 7:825-839.

Ferrantini, M., I. Capone, and F. Belardelli. 2007. Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie* 89:884-893.

Fielding, A.K. 2005. Measles as a potential oncolytic virus. *Reviews in medical virology* 15:135-142.

Figdor, C.G., Y. van Kooyk, and G.J. Adema. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature reviews. Immunology* 2:77-84.

Fishelson, Z., N. Donin, S. Zell, S. Schultz, and M. Kirschfink. 2003. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol* 40:109-123.

Fitzgerald, K.A., S.M. McWhirter, K.L. Faia, D.C. Rowe, E. Latz, D.T. Golenbock, A.J. Coyle, S.M. Liao, and T. Maniatis. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4:491-496.

Flacher, V., M. Bouschbacher, E. Verronese, C. Massacrier, V. Sisirak, O. Berthier-Vergnes, B. de Saint-Vis, C. Caux, C. Dezutter-Dambuyant, S. Lebecque, and J. Valladeau. 2006. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *Journal of immunology* 177:7959-7967.

Flinsenberg, T.W., E.B. Compeer, D. Koning, M. Klein, F.J. Amelung, D. van Baarle, J.J. Boelens, and M. Boes. 2012. Fcgamma receptor antigen targeting potentiates cross-presentation by human blood and lymphoid tissue BDCA-3+ dendritic cells. *Blood* 120:5163-5172.

Fonteneau, J.F., D.G. Kavanagh, M. Lirvall, C. Sanders, T.L. Cover, N. Bhardwaj, and M. Larsson. 2003. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 102:4448-4455.

Fonteneau, J.F., M. Larsson, A.S. Beignon, K. McKenna, I. Dasilva, A. Amara, Y.J. Liu, J.D. Lifson, D.R. Littman, and N. Bhardwaj. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 78:5223-5232.

Friedrich, K., J.R. Hanauer, S. Prufer, R.C. Munch, I. Volker, C. Filippis, C. Jost, K.M. Hanschmann, R. Cattaneo, K.W. Peng, A. Pluckthun, C.J. Buchholz, K. Cichutek, and M.D. Muhlebach. 2013. DARPin-targeting of measles virus: unique bispecificity, effective oncolysis, and enhanced safety. *Mol Ther* 21:849-859.

Fu, X., L. Tao, A. Jin, R. Vile, M.K. Brenner, and X. Zhang. 2003. Expression of a fusogenic membrane glycoprotein by an oncolytic herpes simplex virus potentiates the viral antitumor effect. *Mol Ther* 7:748-754.

Fuertes, M.B., A.K. Kacha, J. Kline, S.R. Woo, D.M. Kranz, K.M. Murphy, and T.F. Gajewski. 2011. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 208:2005-2016.

Galanis, E., L.C. Hartmann, W.A. Cliby, H.J. Long, P.P. Peethambaram, B.A. Barrette, J.S. Kaur, P.J. Haluska, Jr., I. Aderca, P.J. Zollman, J.A. Sloan, G. Keeney, P.J. Atherton, K.C. Podratz, S.C. Dowdy, C.R. Stanhope, T.O. Wilson, M.J. Federspiel, K.W. Peng, and S.J. Russell. 2010. Phase I

trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res* 70:875-882.

Galluzzi, L., I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H.U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* 19:107-120.

Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and F. Pages. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964.

Gancz, D., and Z. Fishelson. 2009. Cancer resistance to complement-dependent cytotoxicity (CDC): Problem-oriented research and development. *Mol Immunol* 46:2794-2800.

Garber, K. 2006. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 98:298-300.

Gardai, S.J., K.A. McPhillips, S.C. Frasch, W.J. Janssen, A. Starefeldt, J.E. Murphy-Ullrich, D.L. Bratton, P.A. Oldenborg, M. Michalak, and P.M. Henson. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123:321-334.

Gauvrit, A., S. Brandler, C. Sapede-Peroz, N. Boisgerault, F. Tangy, and M. Gregoire. 2008. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res* 68:4882-4892.

Geisse, J., I. Caro, J. Lindholm, L. Golitz, P. Stampone, and M. Owens. 2004. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *Journal of the American Academy of Dermatology* 50:722-733.

Gerlini, G., P. Di Gennaro, G. Mariotti, C. Urso, A. Chiarugi, N. Pimpinelli, and L. Borgognoni. 2010. Indoleamine 2,3-dioxygenase+ cells correspond to the BDCA2+ plasmacytoid dendritic cells in human melanoma sentinel nodes. *The Journal of investigative dermatology* 130:898-901.

Germain, R.N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-299.

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. Genin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, 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.

Gildea, L.A., R.E. Morris, and S.L. Newman. 2001. Histoplasma capsulatum yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Journal of immunology* 166:1049-1056.

Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu. 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature reviews. Immunology* 8:594-606.

Ginhoux, F., F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubeau, X.M. Dai, E.R. Stanley, G.J. Randolph, and M. Merad. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7:265-273.

Gnjatic, S., and N. Bhardwaj. 2013. Antigen depots: T cell traps? *Nat Med* 19:397-398.

Gnjatic, S., H. Nishikawa, A.A. Jungbluth, A.O. Gure, G. Ritter, E. Jager, A. Knuth, Y.T. Chen, and L.J. Old. 2006. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Advances in cancer research* 95:1-30.

Gooden, M.J., G.H. de Bock, N. Leffers, T. Daemen, and H.W. Nijman. 2011. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *British journal of cancer* 105:93-103.

Gorden, K.B., K.S. Gorski, S.J. Gibson, R.M. Kedl, W.C. Kieper, X. Qiu, M.A. Tomai, S.S. Alkan, and J.P. Vasilakos. 2005. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *Journal of immunology* 174:1259-1268.

Goubier, A., B. Dubois, H. Gheit, G. Joubert, F. Villard-Truc, C. Asselin-Paturel, G. Trinchieri, and D. Kaiserlian. 2008. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 29:464-475.

Griffin, D. 2001. Measles Virus. In *Field's Virology*. D. Knipe, and P. Howley, editors. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, USA. 1401-1441.

Griffin, D.E., C.H. Pan, and W.J. Moss. 2008. Measles vaccines. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:1352-1370.

Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140:883-899.

Grossardt, C., C.E. Engeland, S. Bossow, N. Halama, K. Zaoui, M.F. Leber, C. Springfeld, D. Jaeger, C. von Kalle, and G. Ungerechts. 2013. GM-CSF-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine. *Human gene therapy*

Grote, D., S.J. Russell, T.I. Cornu, R. Cattaneo, R. Vile, G.A. Poland, and A.K. Fielding. 2001. Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood* 97:3746-3754.

Grouard, G., M.C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau, and Y.J. Liu. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *The Journal of experimental medicine* 185:1101-1111.

Guermonprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert, and S. Amigorena. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425:397-402.

Guillerme, J., M. Gregoire, F. Tangy, and J.F. Fonteneau. 2013a. Antitumor virotherapy by attenuated measles virus (MV). *Biology* 2:587-602.

Guillerme, J.B., N. Boisgerault, D. Roulois, J. Menager, C. Combredet, F. Tangy, J.F. Fonteneau, and M. Gregoire. 2013b. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res* 19:1147-1158.

Hadeiba, H., K. Lahl, A. Edalati, C. Oderup, A. Habtezion, R. Pachynski, L. Nguyen, A. Ghodsi, S. Adler, and E.C. Butcher. 2012. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* 36:438-450.

Hailemichael, Y., Z. Dai, N. Jaffarzad, Y. Ye, M.A. Medina, X.F. Huang, S.M. Dorta-Estremera, N.R. Greeley, G. Nitti, W. Peng, C. Liu, Y. Lou, Z. Wang, W. Ma, B. Rabinovich, K.S. Schluns, R.E. Davis, P. Hwu, and W.W. Overwijk. 2013. Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8(+) T cell sequestration, dysfunction and deletion. *Nat Med* 19:465-472.

Hammond, A.L., R.K. Plemper, J. Zhang, U. Schneider, S.J. Russell, and R. Cattaneo. 2001. Single-chain antibody displayed on a recombinant measles virus confers entry through the tumor-associated carcinoembryonic antigen. *J Virol* 75:2087-2096.

Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.

Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P.S. Wasan, X.N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R.F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J.K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, and F. Ginhoux. 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37:60-73.

Hansson, M., A. Lundgren, K. Elgbratt, M. Quiding-Jarbrink, A.M. Svennerholm, and E.L. Johansson. 2006. Dendritic cells express CCR7 and migrate in response to CCL19 (MIP-3beta) after exposure to Helicobacter pylori. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8:841-850.

Harshyne, L.A., M.I. Zimmer, S.C. Watkins, and S.M. Barratt-Boyes. 2003. A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *Journal of immunology* 170:2302-2309.

Hasegawa, K., T. Nakamura, M. Harvey, Y. Ikeda, A. Oberg, M. Figini, S. Canevari, L.C. Hartmann, and K.W. Peng. 2006a. The use of a tropism-modified measles virus in folate receptor-targeted virotherapy of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 12:6170-6178.

Hasegawa, K., L. Pham, M.K. O'Connor, M.J. Federspiel, S.J. Russell, and K.W. Peng. 2006b. Dual therapy of ovarian cancer using measles viruses expressing carcinoembryonic antigen and sodium iodide symporter. *Clin Cancer Res* 12:1868-1875.

He, D., H. Li, N. Yusuf, C.A. Elmets, M. Athar, S.K. Katiyar, and H. Xu. 2012. IL-17 mediated inflammation promotes tumor growth and progression in the skin. *PloS one* 7:e32126.

He, Q., Y. Liu, Q. Zou, and Y.S. Guan. 2011. Transarterial injection of H101 in combination with chemoembolization overcomes recurrent hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 17:2353-2355.

Heath, W.R., and F.R. Carbone. 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature reviews. Immunology* 1:126-134.

Heinzerling, L., V. Kunzi, P.A. Oberholzer, T. Kundig, H. Naim, and R. Dummer. 2005. Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood* 106:2287-2294.

Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3:196-200.

Hemont, C., A. Neel, M. Heslan, C. Braudeau, and R. Josien. 2013. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *Journal of leukocyte biology* 93:599-609.

Hengstschlager, M., M. Pfeilstocker, and E. Wawra. 1998. Thymidine kinase expression. A marker for malignant cells. *Adv Exp Med Biol* 431:455-460.

Heo, J., T. Reid, L. Ruo, C.J. Breitbach, S. Rose, M. Bloomston, M. Cho, H.Y. Lim, H.C. Chung, C.W. Kim, J. Burke, R. Lencioni, T. Hickman, A. Moon, Y.S. Lee, M.K. Kim, M. Daneshmand, K. Dubois, L. Longpre, M. Ngo, C. Rooney, J.C. Bell, B.G. Rhee, R. Patt, T.H. Hwang, and D.H. Kirn. 2013. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med* 19:329-336.

Hill, A., P. Jugovic, I. York, G. Russ, J. Bennink, J. Yewdell, H. Ploegh, and D. Johnson. 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 375:411-415.

Hilleman, M.R. 2001. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine* 20:651-665.

Hodi, F.S., S.J. O'Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J.C. Hassel, W. Akerley, A.J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J.M. Vaubel, G.P. Linette, D. Hogg, C.H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J.I. Clark, J.D. Wolchok, J.S. Weber, J. Tian, M.J. Yellin, G.M. Nichol, A. Hoos, and W.J. Urba. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363:711-723.

Hoeffel, G., A.C. Ripoche, D. Matheoud, M. Nascimbeni, N. Escriou, P. Lebon, F. Heshmati, J.G. Guillet, M. Gannage, S. Caillat-Zucman, N. Casartelli, O. Schwartz, H. De la Salle, D. Hanau, A. Hosmalin, and C. Maranon. 2007. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27:481-492.

Hoeffel, G., Y. Wang, M. Greter, P. See, P. Teo, B. Malleret, M. Leboeuf, D. Low, G. Oller, F. Almeida, S.H. Choy, M. Grisotto, L. Renia, S.J. Conway, E.R. Stanley, J.K. Chan, L.G. Ng, I.M. Samokhvalov, M. Merad, and F. Ginhoux. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine* 209:1167-1181.

Honda, K., Y. Ohba, H. Yanai, H. Negishi, T. Mizutani, A. Takaoka, C. Taya, and T. Taniguchi. 2005. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434:1035-1040.

Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human

peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of immunology* 168:4531-4537.

Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M.F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks, and M. Desjardins. 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425:402-406.

Hsu, E.C., C. Iorio, F. Sarangi, A.A. Khine, and C.D. Richardson. 2001. CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* 279:9-21.

Hummel, H.D., G. Kuntz, S.J. Russell, T. Nakamura, A. Greiner, H. Einsele, and M.S. Topp. 2009. Genetically engineered attenuated measles virus specifically infects and kills primary multiple myeloma cells. *The Journal of general virology* 90:693-701.

Hutzen, B., C.R. Pierson, S.J. Russell, E. Galanis, C. Raffel, and A.W. Studebaker. 2012. Treatment of medulloblastoma using an oncolytic measles virus encoding the thyroidal sodium iodide symporter shows enhanced efficacy with radioiodine. *BMC Cancer* 12:508.

Iankov, I.D., C. Allen, M.J. Federspiel, R.M. Myers, K.W. Peng, J.N. Ingle, S.J. Russell, and E. Galanis. 2012. Expression of immunomodulatory neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori enhances the antitumor activity of oncolytic measles virus. *Mol Ther* 20:1139-1147.

Iankov, I.D., B. Blechacz, C. Liu, J.D. Schmeckpeper, J.E. Tarara, M.J. Federspiel, N. Caplice, and S.J. Russell. 2007. Infected cell carriers: a new strategy for systemic delivery of oncolytic measles viruses in cancer virotherapy. *Mol Ther* 15:114-122.

Iankov, I.D., M.L. Hillestad, A.B. Dietz, S.J. Russell, and E. Galanis. 2009. Converting tumor-specific markers into reporters of oncolytic virus infection. *Mol Ther* 17:1395-1403.

Iankov, I.D., P. Msaouel, C. Allen, M.J. Federspiel, P.A. Bulur, A.B. Dietz, D. Gastineau, Y. Ikeda, J.N. Ingle, S.J. Russell, and E. Galanis. 2010. Demonstration of anti-tumor activity of oncolytic measles virus strains in a malignant pleural effusion breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 122:745-754.

Inaba, K., M. Inaba, M. Naito, and R.M. Steinman. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *The Journal of experimental medicine* 178:479-488.

Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell, and R.M. Steinman. 1997. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 186:665-672.

Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society* 147:258-267.

Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, and S. Fukuhara. 2002. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *The Journal of experimental medicine* 195:1507-1512.

Ito, T., M. Yang, Y.H. Wang, R. Lande, J. Gregorio, O.A. Perng, X.F. Qin, Y.J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *The Journal of experimental medicine* 204:105-115.

Jaehn, P.S., K.S. Zaenker, J. Schmitz, and A. Dzionek. 2008. Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon. *European journal of immunology* 38:1822-1832.

Jager, E., Y.T. Chen, J.W. Drijfhout, J. Karbach, M. Ringhoffer, D. Jager, M. Arand, H. Wada, Y. Noguchi, E. Stockert, L.J. Old, and A. Knuth. 1998. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *The Journal of experimental medicine* 187:265-270.

Jager, E., Y. Nagata, S. Gnjatic, H. Wada, E. Stockert, J. Karbach, P.R. Dunbar, S.Y. Lee, A. Jungbluth, D. Jager, M. Arand, G. Ritter, V. Cerundolo, B. Dupont, Y.T. Chen, L.J. Old, and A. Knuth. 2000.

Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4760-4765.

Jaiswal, S., C.H. Jamieson, W.W. Pang, C.Y. Park, M.P. Chao, R. Majeti, D. Traver, N. van Rooijen, and I.L. Weissman. 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138:271-285.

Janeway, C. 1989. Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunology today* 10:283-286.

Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology* 31:3388-3393.

Jimenez-Baranda, S., I.P. Silva, and N. Bhardwaj. 2012. Plasmacytoid dendritic cells lead the charge against tumors. *The Journal of clinical investigation* 122:481-484.

Jing, Y., C. Tong, J. Zhang, T. Nakamura, I. Iankov, S.J. Russell, and J.R. Merchan. 2009. Tumor and vascular targeting of a novel oncolytic measles virus retargeted against the urokinase receptor. *Cancer Res* 69:1459-1468.

Joffre, O.P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* 12:557-569.

Jongbloed, S.L., A.J. Kassianos, K.J. McDonald, G.J. Clark, X. Ju, C.E. Angel, C.J. Chen, P.R. Dunbar, R.B. Wadley, V. Jeet, A.J. Vulink, D.N. Hart, and K.J. Radford. 2010. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of experimental medicine* 207:1247-1260.

Jotwani, R., S.V. Eswaran, S. Moonga, and C.W. Cutler. 2010. MMP-9/TIMP-1 imbalance induced in human dendritic cells by Porphyromonas gingivalis. *FEMS immunology and medical microbiology* 58:314-321.

Kadowaki, N., S. Antonenko, J.Y. Lau, and Y.J. Liu. 2000. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *The Journal of experimental medicine* 192:219-226.

Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R.W. Malefyt, R.A. Kastelein, F. Bazan, and Y.J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of experimental medicine* 194:863-869.

Kamigaki, T., T. Kaneko, K. Naitoh, M. Takahara, T. Kondo, H. Ibe, E. Matsuda, R. Maekawa, and S. Goto. 2013. Immunotherapy of autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccines by a closed-flow electroporation system for solid tumors. *Anticancer research* 33:2971-2976.

Kanerva, A., and A. Hemminki. 2004. Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer* 110:475-480.

Karbach, J., A. Neumann, K. Brand, C. Wahle, E. Siegel, M. Maeurer, E. Ritter, T. Tsuji, S. Gnjatic, L.J. Old, G. Ritter, and E. Jager. 2012. Phase I clinical trial of mixed bacterial vaccine (Coley's toxins) in patients with NY-ESO-1 expressing cancers: immunological effects and clinical activity. *Clin Cancer Res* 18:5449-5459.

Kaufmann, J.K., S. Bossow, C. Grossardt, S. Sawall, J. Kupsch, P. Erbs, J.C. Hassel, C. von Kalle, A.H. Enk, D.M. Nettelbeck, and G. Ungerechts. 2013. Chemovirotherapy of malignant melanoma with a targeted and armed oncolytic measles virus. *The Journal of investigative dermatology* 133:1034-1042.

Kawai, T., and S. Akira. 2008. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143:1-20.

Kawai, T., and S. Akira. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology* 21:317-337.

Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.

Kefas, B., J. Godlewski, L. Comeau, Y. Li, R. Abounader, M. Hawkinson, J. Lee, H. Fine, E.A. Chiocca, S. Lawler, and B. Purow. 2008. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res* 68:3566-3572.

Kerkmann, M., S. Rothenfusser, V. Hornung, A. Towarowski, M. Wagner, A. Sarris, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann. 2003. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two

distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology* 170:4465-4474.

Kim, J.H., J.Y. Oh, B.H. Park, D.E. Lee, J.S. Kim, H.E. Park, M.S. Roh, J.E. Je, J.H. Yoon, S.H. Thorne, D. Kirn, and T.H. Hwang. 2006. Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol Ther* 14:361-370.

Kim, Y.M., M.M. Brinkmann, M.E. Paquet, and H.L. Ploegh. 2008. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452:234-238.

Kinzler, K.W., and B. Vogelstein. 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761, 763.

Klechevsky, E., A.L. Flamar, Y. Cao, J.P. Blanck, M. Liu, A. O'Bar, O. Agouna-Deciat, P. Klucar, L. Thompson-Snipes, S. Zurawski, Y. Reiter, A.K. Palucka, G. Zurawski, and J. Banchereau. 2010. Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* 116:1685-1697.

Knuth, A., B. Danowski, H.F. Oettgen, and L.J. Old. 1984. T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3511-3515.

Kool, M., C. Geurtsvankessel, F. Muskens, F.B. Madeira, M. van Nimwegen, H. Kuipers, K. Thielemans, H.C. Hoogsteden, H. Hammad, and B.N. Lambrecht. 2011. Facilitated antigen uptake and timed exposure to TLR ligands dictate the antigen-presenting potential of plasmacytoid DCs. *Journal of leukocyte biology* 90:1177-1190.

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

Kroemer, G., L. Galluzzi, O. Kepp, and L. Zitvogel. 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 31:51-72.

Krysko, D.V., A.D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis, and P. Vandenabeele. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 12:860-875.

Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30:16-34.

Kurts, C., B.W. Robinson, and P.A. Knolle. 2010. Cross-priming in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 10:403-414.

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 immunology, immunotherapy : CII* 51:532-538.

Lampe, J., S. Bossow, T. Weiland, I. Smirnow, R. Lehmann, W. Neubert, M. Bitzer, and U.M. Lauer. 2013. An armed oncolytic measles vaccine virus eliminates human hepatoma cells independently of apoptosis. *Gene Ther*

Lande, R., J. Gregorio, V. Facchinetti, B. Chatterjee, Y.H. Wang, B. Homey, W. Cao, Y.H. Wang, B. Su, F.O. Nestle, T. Zal, I. Mellman, J.M. Schroder, Y.J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449:564-569.

Lane, D.P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.

Lanzavecchia, A. 1998. Immunology. Licence to kill. *Nature* 393:413-414.

Lasky, J.L., 3rd, E.H. Panosyan, A. Plant, T. Davidson, W.H. Yong, R.M. Prins, L.M. Liau, and T.B. Moore. 2013. Autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell immunotherapy for pediatric patients with newly diagnosed or recurrent high-grade gliomas. *Anticancer research* 33:2047-2056.

Lauterbach, H., B. Bathke, S. Gilles, C. Traidl-Hoffmann, C.A. Luber, G. Fejer, M.A. Freudenberg, G.M. Davey, D. Vremec, A. Kallies, L. Wu, K. Shortman, P. Chaplin, M. Suter, M. O'Keeffe, and H. Hochrein. 2010. Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *The Journal of experimental medicine* 207:2703-2717.

Le Bon, A., V. Durand, E. Kamphuis, C. Thompson, S. Bulfone-Paus, C. Rossmann, U. Kalinke, and D.F. Tough. 2006. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *Journal of immunology* 176:4682-4689.

Le Bon, A., and D.F. Tough. 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 14:432-436.

Le Mercier, I., D. Poujol, A. Sanlaville, V. Sisirak, M. Gobert, I. Durand, B. Dubois, I. Treilleux, J. Marvel, J. Vlach, J.Y. Blay, N. Bendriss-Vermare, C. Caux, I. Puisieux, and N. Goutagny. 2013. Tumor Promotion by Intratumoral Plasmacytoid Dendritic Cells Is Reversed by TLR7 Ligand Treatment. *Cancer Res* 73:4629-4640.

Leach, D.R., M.F. Krummel, and J.P. Allison. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734-1736.

Leber, M.F., S. Bossow, V.H. Leonard, K. Zaoui, C. Grossardt, M. Frenzke, T. Miest, S. Sawall, R. Cattaneo, C. von Kalle, and G. Ungerechts. 2011. MicroRNA-sensitive oncolytic measles viruses for cancer-specific vector tropism. *Mol Ther* 19:1097-1106.

Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86:973-983.

Lennert, K., and W. Remmele. 1958. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes]. *Acta haematologica* 19:99-113.

Lesterhuis, W.J., I.J. de Vries, G. Schreibelt, A.J. Lambeck, E.H. Aarntzen, J.F. Jacobs, N.M. Scharenborg, M.W. van de Rakt, A.J. de Boer, S. Croockewit, M.M. van Rossum, R. Mus, W.J. Oyen, O.C. Boerman, S. Lucas, G.J. Adema, C.J. Punt, and C.G. Figdor. 2011. Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients. *Clin Cancer Res* 17:5725-5735.

Li, H., K.W. Peng, D. Dingli, R.A. Kratzke, and S.J. Russell. 2010. Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy. *Cancer Gene Ther* 17:550-558.

Li, H., K.W. Peng, and S.J. Russell. 2012. Oncolytic measles virus encoding thyroidal sodium iodide symporter for squamous cell cancer of the head and neck radiovirotherapy. *Human gene therapy* 23:295-301.

Li, Z., A. Menoret, and P. Srivastava. 2002. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 14:45-51.

Lievano, F., S.A. Galea, M. Thornton, R.T. Wiedmann, S.B. Manoff, T.N. Tran, M.A. Amin, M.M. Seminack, K.A. Vagie, A. Dana, and S.A. Plotkin. 2012. Measles, mumps, and rubella virus vaccine (M-M-RII): a review of 32 years of clinical and postmarketing experience. *Vaccine* 30:6918-6926.

Lin, M.L., Y. Zhan, A.I. Proietto, S. Prato, L. Wu, W.R. Heath, J.A. Villadangos, and A.M. Lew. 2008. Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3029-3034.

Linard, B., S. Bezieau, H. Benlalam, N. Labarriere, Y. Guilloux, E. Diez, and F. Jotereau. 2002. A ras-mutated peptide targeted by CTL infiltrating a human melanoma lesion. *Journal of immunology* 168:4802-4808.

Lindstedt, M., K. Lundberg, and C.A. Borrebaeck. 2005. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *Journal of immunology* 175:4839-4846.

Liszewski, M.K., and J.P. Atkinson. 1992. Membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol* 178:45-60.

Liu, B.L., M. Robinson, Z.Q. Han, R.H. Branston, C. English, P. Reay, Y. McGrath, S.K. Thomas, M. Thornton, P. Bullock, C.A. Love, and R.S. Coffin. 2003. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther* 10:292-303.

Liu, C., C. Erlichman, C.J. McDonald, J.N. Ingle, P. Zollman, I. Iankov, S.J. Russell, and E. Galanis. 2008a. Heat shock protein inhibitors increase the efficacy of measles virotherapy. *Gene Ther* 15:1024-1034.

Liu, C., K. Hasegawa, S.J. Russell, M. Sadelain, and K.W. Peng. 2009. Prostate-specific membrane antigen retargeted measles virotherapy for the treatment of prostate cancer. *The Prostate* 69:1128-1141.

Liu, C., Y. Lou, G. Lizee, H. Qin, S. Liu, B. Rabinovich, G.J. Kim, Y.H. Wang, Y. Ye, A.G. Sikora, W.W. Overwijk, Y.J. Liu, G. Wang, and P. Hwu. 2008b. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *The Journal of clinical investigation* 118:1165-1175.

Liu, C., S.J. Russell, and K.W. Peng. 2010. Systemic therapy of disseminated myeloma in passively immunized mice using measles virus-infected cell carriers. *Mol Ther* 18:1155-1164.

Liu, C., J.N. Sarkaria, C.A. Petell, G. Paraskevakou, P.J. Zollman, M. Schroeder, B. Carlson, P.A. Decker, W. Wu, C.D. James, S.J. Russell, and E. Galanis. 2007. Combination of measles virus virotherapy and radiation therapy has synergistic activity in the treatment of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 13:7155-7165.

Liu, T.C., T. Hwang, B.H. Park, J. Bell, and D.H. Kirn. 2008c. The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates antitumoral, antivascular, and anti-HBV activities in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Ther* 16:1637-1642.

Liu, Y.J. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106:259-262.

Liu, Y.J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23:275-306.

Liu, Y.P., C. Tong, A. Dispenzieri, M.J. Federspiel, S.J. Russell, and K.W. Peng. 2012. Polyinosinic acid decreases sequestration and improves systemic therapy of measles virus. *Cancer Gene Ther* 19:202-211.

Lizee, G., W.W. Overwijk, L. Radvanyi, J. Gao, P. Sharma, and P. Hwu. 2013. Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annual review of medicine* 64:71-90.

Lopez, M., F. Cocchi, L. Menotti, E. Avitabile, P. Dubreuil, and G. Campadelli-Fiume. 2000. Nectin2alpha (PRR2alpha or HveB) and nectin2delta are low-efficiency mediators for entry of herpes simplex virus mutants carrying the Leu25Pro substitution in glycoprotein D. *J Virol* 74:1267-1274.

Lou, Y., C. Liu, G.J. Kim, Y.J. Liu, P. Hwu, and G. Wang. 2007. Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses. *Journal of immunology* 178:1534-1541.

Lui, G., O. Manches, J. Angel, J.P. Molens, L. Chaperot, and J. Plumas. 2009. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PloS one* 4:e7111.

MacDonald, K.P., D.J. Munster, G.J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz, and D.N. Hart. 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100:4512-4520.

Mackensen, A., N. Meidenbauer, S. Vogl, M. Laumer, J. Berger, and R. Andreesen. 2006. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24:5060-5069.

Madden, D.R., D.N. Garboczi, and D.C. Wiley. 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 75:693-708.

Mader, E.K., Y. Maeyama, Y. Lin, G.W. Butler, H.M. Russell, E. Galanis, S.J. Russell, A.B. Dietz, and K.W. Peng. 2009. Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. *Clin Cancer Res* 15:7246-7255.

Majeti, R., M.P. Chao, A.A. Alizadeh, W.W. Pang, S. Jaiswal, K.D. Gibbs, Jr., N. van Rooijen, and I.L. Weissman. 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138:286-299.

Maranon, C., J.F. Desoutter, G. Hoeffel, W. Cohen, D. Hanau, and A. Hosmalin. 2004. Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6092-6097.

Marrack, P., J. Kappler, and T. Mitchell. 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *The Journal of experimental medicine* 189:521-530.

Matheoud, D., L. Perie, G. Hoeffel, L. Vimeux, I. Parent, C. Maranon, P. Bourdoncle, L. Renia, A. Prevost-Blondel, B. Lucas, V. Feuillet, and A. Hosmalin. 2010. Cross-presentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo. *Blood* 115:4412-4420.

Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045.

McCart, J.A., J.M. Ward, J. Lee, Y. Hu, H.R. Alexander, S.K. Libutti, B. Moss, and D.L. Bartlett. 2001. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res* 61:8751-8757.

McDonald, C.J., C. Erlichman, J.N. Ingle, G.A. Rosales, C. Allen, S.M. Greiner, M.E. Harvey, P.J. Zollman, S.J. Russell, and E. Galanis. 2006. A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 99:177-184.

McWilliam, A.S., D. Nelson, J.A. Thomas, and P.G. Holt. 1994. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *The Journal of experimental medicine* 179:1331-1336.

Medema, J.P., J. de Jong, L.T. Peltenburg, E.M. Verdegaal, A. Gorter, S.A. Bres, K.L. Franken, M. Hahne, J.P. Albar, C.J. Melief, and R. Offringa. 2001. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11515-11520.

Mendelsohn, C.L., E. Wimmer, and V.R. Racaniello. 1989. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56:855-865.

Meng, X., T. Nakamura, T. Okazaki, H. Inoue, A. Takahashi, S. Miyamoto, G. Sakaguchi, M. Eto, S. Naito, M. Takeda, Y. Yanagi, and K. Tani. 2010. Enhanced antitumor effects of an engineered measles virus Edmonston strain expressing the wild-type N, P, L genes on human renal cell carcinoma. *Mol Ther* 18:544-551.

Merad, M., M.G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I.L. Weissman, J.G. Cyster, and E.G. Engleman. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3:1135-1141.

Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31:563-604.

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.

Mittag, D., A.I. Proietto, T. Loudovaris, S.I. Mannering, D. Vremec, K. Shortman, L. Wu, and L.C. Harrison. 2011. Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *Journal of immunology* 186:6207-6217.

Mohr, I., D. Sternberg, S. Ward, D. Leib, M. Mulvey, and Y. Gluzman. 2001. A herpes simplex virus type 1 gamma34.5 second-site suppressor mutant that exhibits enhanced growth in cultured glioblastoma cells is severely attenuated in animals. *J Virol* 75:5189-5196.

Moore, A.E. 1952. Viruses with oncolytic properties and their adaptation to tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 54:945-952.

Moore, R.J., D.M. Owens, G. Stamp, C. Arnott, F. Burke, N. East, H. Holdsworth, L. Turner, B. Rollins, M. Pasparakis, G. Kollias, and F. Balkwill. 1999. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* 5:828-831.

Morales, A., D. Eidinger, and A.W. Bruce. 1976. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *The Journal of urology* 116:180-183.

Morelli, A.E., and A.W. Thomson. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature reviews. Immunology* 7:610-621.

Morgan, R.A., M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, M.S. Hughes, J.C. Yang, R.M. Sherry, R.E. Royal, S.L. Topalian, U.S. Kammula, N.P. Restifo, Z. Zheng, A. Nahvi, C.R. de Vries, L.J. Rogers-Freezer, S.A. Mavroukakis, and S.A. Rosenberg. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-129.

Moss, W.J., and D.E. Griffin. 2006. Global measles elimination. *Nature reviews. Microbiology* 4:900-908.

Mouries, J., G. Moron, G. Schlecht, N. Escriou, G. Dadaglio, and C. Leclerc. 2008. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* 112:3713-3722.

Msaouel, P., I.D. Iankov, C. Allen, I. Aderca, M.J. Federspiel, D.J. Tindall, J.C. Morris, M. Koutsilieris, S.J. Russell, and E. Galanis. 2009a. Noninvasive imaging and radiovirotherapy of prostate cancer using an oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter. *Mol Ther* 17:2041-2048.

Msaouel, P., I.D. Iankov, C. Allen, J.C. Morris, V. von Messling, R. Cattaneo, M. Koutsilieris, S.J. Russell, and E. Galanis. 2009b. Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer. *The Prostate* 69:82-91.

Msaouel, P., M. Opyrchal, E. Domingo Musibay, and E. Galanis. 2013. Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents. *Expert opinion on biological therapy* 13:483-502.

Muhlebach, M.D., M. Mateo, P.L. Sinn, S. Prufer, K.M. Uhlig, V.H. Leonard, C.K. Navaratnarajah, M. Frenzke, X.X. Wong, B. Sawatsky, S. Ramachandran, P.B. McCray, Jr., K. Cichutek, V. von Messling, M. Lopez, and R. Cattaneo. 2011. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480:530-533.

Muhlebach, M.D., T. Schaser, M. Zimmermann, S. Armeanu, K.M. Hanschmann, R. Cattaneo, M. Bitzer, U.M. Lauer, K. Cichutek, and C.J. Buchholz. 2010. Liver cancer protease activity profiles support therapeutic options with matrix metalloproteinase-activatable oncolytic measles virus. *Cancer Res* 70:7620-7629.

Muller, P.A., and K.H. Vousden. 2013. p53 mutations in cancer. *Nature cell biology* 15:2-8.

Myers, R.M., S.M. Greiner, M.E. Harvey, G. Griesmann, M.J. Kuffel, S.A. Buhrow, J.M. Reid, M. Federspiel, M.M. Ames, D. Dingli, K. Schweikart, A. Welch, A. Dispenzieri, K.W. Peng, and S.J. Russell. 2007. Preclinical pharmacology and toxicology of intravenous MV-NIS, an oncolytic measles virus administered with or without cyclophosphamide. *Clinical pharmacology and therapeutics* 82:700-710.

Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T.F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe, and D. Gerlier. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67:6025-6032.

Nierkens, S., M.H. den Brok, Z. Garcia, S. Togher, J. Wagenaars, M. Wassink, L. Boon, T.J. Ruers, C.G. Figdor, S.P. Schoenberger, G.J. Adema, and E.M. Janssen. 2011. Immune adjuvant efficacy of CpG oligonucleotide in cancer treatment is founded specifically upon TLR9 function in plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Res* 71:6428-6437.

Nierkens, S., J. Tel, E. Janssen, and G.J. Adema. 2013. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? *Trends in immunology*

Nizzoli, G., J. Krietsch, A. Weick, S. Steinfelder, F. Facciotti, P. Gruarin, A. Bianco, B. Steckel, M. Moro, M. Crosti, C. Romagnani, K. Stolzel, S. Torretta, L. Pignataro, C. Scheibenbogen, P. Neddermann, R. De Francesco, S. Abrignani, and J. Geginat. 2013. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 122:932-942.

Noyce, R.S., D.G. Bondre, M.N. Ha, L.T. Lin, G. Sisson, M.S. Tsao, and C.D. Richardson. 2011. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* 7:e1002240.

O'Brien, M., O. Manches, R.L. Sabado, S.J. Baranda, Y. Wang, I. Marie, L. Rolnitzky, M. Markowitz, D.M. Margolis, D. Levy, and N. Bhardwaj. 2011. Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN-alpha-producing and partially matured phenotype. *The Journal of clinical investigation* 121:1088-1101.

O'Sullivan, T., R. Saddawi-Konefka, W. Vermi, C.M. Koebel, C. Arthur, J.M. White, R. Uppaluri, D.M. Andrews, S.F. Ngiow, M.W. Teng, M.J. Smyth, R.D. Schreiber, and J.D. Bui. 2012. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *The Journal of experimental medicine* 209:1869-1882.

Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccosanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13:54-61.

Odjele, A., D. Charest, and P. Morin, Jr. 2012. miRNAs as important drivers of glioblastomas: a no-brainer? *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 11:245-252.

Ong, H.T., M.M. Timm, P.R. Greipp, T.E. Witzig, A. Dispenzieri, S.J. Russell, and K.W. Peng. 2006. Oncolytic measles virus targets high CD46 expression on multiple myeloma cells. *Experimental hematology* 34:713-720.

Opyrchal, M., C. Allen, I. Iankov, I. Aderca, M. Schroeder, J. Sarkaria, and E. Galanis. 2012. Effective radiovirotherapy for malignant gliomas by using oncolytic measles virus strains encoding the sodium iodide symporter (MV-NIS). *Human gene therapy* 23:419-427.

Pang, B., J. Neijssen, X. Qiao, L. Janssen, H. Janssen, C. Lippuner, and J. Neefjes. 2009. Direct antigen presentation and gap junction mediated cross-presentation during apoptosis. *Journal of immunology* 183:1083-1090.

Paraskevakou, G., C. Allen, T. Nakamura, P. Zollman, C.D. James, K.W. Peng, M. Schroeder, S.J. Russell, and E. Galanis. 2007. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-retargeted measles virus strains effectively target EGFR- or EGFRvIII expressing gliomas. *Mol Ther* 15:677-686.

Parham, P. 1992. Immunology. Deconstructing the MHC. *Nature* 360:300-301.

Park, B.H., T. Hwang, T.C. Liu, D.Y. Sze, J.S. Kim, H.C. Kwon, S.Y. Oh, S.Y. Han, J.H. Yoon, S.H. Hong, A. Moon, K. Speth, C. Park, Y.J. Ahn, M. Daneshmand, B.G. Rhee, H.M. Pinedo, J.C. Bell, and D.H. Kirn. 2008. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol* 9:533-542.

Parker Fiebelkorn, A., S.B. Redd, K. Gallagher, P.A. Rota, J. Rota, W. Bellini, and J. Seward. 2010. Measles in the united states during the postelimination era. . *The Journal of infectious diseases* 1520-1528.

Parrula, C., S.A. Fernandez, B. Zimmerman, M. Lairmore, and S. Niewiesk. 2011. Measles virotherapy in a mouse model of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *The Journal of general virology* 92:1458-1466.

Pashenkov, M., G. Goess, C. Wagner, M. Hormann, T. Jandl, A. Moser, C.M. Britten, J. Smolle, S. Koller, C. Mauch, I. Tantcheva-Poor, S. Grabbe, C. Loquai, S. Esser, T. Franckson, A. Schneeberger, C. Haarmann, A.M. Krieg, G. Stingl, and S.N. Wagner. 2006. Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24:5716-5724.

Peng, K.W., G.J. Ahmann, L. Pham, P.R. Greipp, R. Cattaneo, and S.J. Russell. 2001. Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. *Blood* 98:2002-2007.

Peng, K.W., K.A. Donovan, U. Schneider, R. Cattaneo, J.A. Lust, and S.J. Russell. 2003. Oncolytic measles viruses displaying a single-chain antibody against CD38, a myeloma cell marker. *Blood* 101:2557-2562.

Peng, K.W., C.J. TenEyck, E. Galanis, K.R. Kalli, L.C. Hartmann, and S.J. Russell. 2002. Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res* 62:4656-4662.

Penheiter, A.R., G.E. Griesmann, M.J. Federspiel, D. Dingli, S.J. Russell, and S.K. Carlson. 2012. Pinhole micro-SPECT/CT for noninvasive monitoring and quantitation of oncolytic virus dispersion and percent infection in solid tumors. *Gene Ther* 19:279-287.

Penheiter, A.R., T.R. Wegman, K.L. Classic, D. Dingli, C.E. Bender, S.J. Russell, and S.K. Carlson. 2010. Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy for pancreatic cancer. *AJR Am J Roentgenol* 195:341-349.

Penna, G., M. Vulcano, A. Roncari, F. Facchetti, S. Sozzani, and L. Adorini. 2002a. Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology* 169:6673-6676.

Penna, G., M. Vulcano, S. Sozzani, and L. Adorini. 2002b. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Human immunology* 63:1164-1171.

Phuong, L.K., C. Allen, K.W. Peng, C. Giannini, S. Greiner, C.J. TenEyck, P.K. Mishra, S.I. Macura, S.J. Russell, and E.C. Galanis. 2003. Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 63:2462-2469.

Poulin, L.F., M. Salio, E. Griessinger, F. Anjos-Afonso, L. Craciun, J.L. Chen, A.M. Keller, O. Joffre, S. Zelenay, E. Nye, A. Le Moine, F. Faure, V. Donckier, D. Sancho, V. Cerundolo, D. Bonnet, and C. Reis e Sousa. 2010. Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 207:1261-1271.

Racaniello, V. 2011. Virology. An exit strategy for measles virus. *Science* 334:1650-1651.

Rec, W.E. 2001. Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update). *Wkly Epidemiol Rec* 76:249-251.

Reddi, H.V., P. Madde, S.J. McDonough, M.A. Trujillo, J.C. Morris, 3rd, R.M. Myers, K.W. Peng, S.J. Russell, B. McIver, and N.L. Eberhardt. 2012. Preclinical efficacy of the oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter in iodine non-avid anaplastic thyroid cancer: a novel therapeutic agent allowing noninvasive imaging and radioiodine therapy. *Cancer Gene Ther* 19:659-665.

Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena. 1999. Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *The Journal of experimental medicine* 189:371-380.

Reis e Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nature reviews. Immunology* 6:476-483.

Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-478.

Robbiani, D.F., R.A. Finch, D. Jager, W.A. Muller, A.C. Sartorelli, and G.J. Randolph. 2000. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 103:757-768.

Robinson, S.C., K.A. Scott, J.L. Wilson, R.G. Thompson, A.E. Proudfoot, and F.R. Balkwill. 2003. A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res* 63:8360-8365.

Robson, N.C., T. McAlpine, A.J. Knights, M. Schnurr, A. Shin, W. Chen, E. Maraskovsky, and J. Cebon. 2010. Processing and cross-presentation of individual HLA-A, -B, or -C epitopes from NY-ESO-1 or an HLA-A epitope for Melan-A differ according to the mode of antigen delivery. *Blood* 116:218-225.

Rock, F.L., G. Hardiman, J.C. Timans, R.A. Kastelein, and J.F. Bazan. 1998. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:588-593.

Rollins, B.J. 1997. Chemokines. *Blood* 90:909-928.

Roncarolo, M.G., M.K. Levings, and C. Traversari. 2001. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 193:F5-9.

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

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.

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.

Rosin, D.L., and M.D. Okusa. 2011. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22:416-425.

Roulois, D., V. Vignard, F. Gueugnon, N. Labarriere, M. Gregoire, and J.F. Fonteneau. 2011. Recognition of pleural mesothelioma by mucin-1(950-958)/human leukocyte antigen A*0201-specific CD8+ T-cells. *The European respiratory journal* 38:1117-1126.

Rouse, B.T., M. Rollinghoff, and N.L. Warner. 1972. Anti-theta serum-induced supression of the cellular transfer of tumour-specific immunity to a syngeneic plasma cell tumour. *Nature: New biology* 238:116-117.

Ruppert, J., J. Sidney, E. Celis, R.T. Kubo, H.M. Grey, and A. Sette. 1993. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 74:929-937.

Russell, S.J., K.W. Peng, and J.C. Bell. 2012. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30:658-670.

Saji, H., M. Koike, T. Yamori, S. Saji, M. Seiki, K. Matsushima, and M. Toi. 2001. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer* 92:1085-1091.

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

Sanjabi, S., and R.A. Flavell. 2010. Overcoming the hurdles in using mouse genetic models that block TGF-beta signaling. *Journal of immunological methods* 353:111-114.

Scanlan, M.J., A.J. Simpson, and L.J. Old. 2004. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer immunity* 4:1.

Schlender, J., V. Hornung, S. Finke, M. Gunthner-Biller, S. Marozin, K. Brzozka, S. Moghim, S. Endres, G. Hartmann, and K.K. Conzelmann. 2005. 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* 79:5507-5515.

Schneider-Schaulies, S., and V.t. Meulen. 1999. Measles Virus (Paramyxoviridae). Academic Press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, Calfornia 92101-4495, USA. 8 pp.

Schnurr, M., Q. Chen, A. Shin, W. Chen, T. Toy, C. Jenderek, S. Green, L. Miloradovic, D. Drane, I.D. Davis, J. Villadangos, K. Shortman, E. Maraskovsky, and J. Cebon. 2005. Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105:2465-2472.

Schoenberger, S.P., R.E. Toes, E.I. van der Voort, R. Offringa, and C.J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480-483.

Schott, M. 2006. Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocrine-related cancer* 13:779-795.

Schulz, C., E. Gomez Perdiguero, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S.E. Jacobsen, J.W. Pollard, J. Frampton, K.J. Liu, and F. Geissmann. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336:86-90.

Schwarz, A.J. 1962. Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine. *American journal of diseases of children* 103:386-389.

Segura, E., M. Durand, and S. Amigorena. 2013a. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 210:1035-1047.

Segura, E., M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiocchia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, and S. Amigorena. 2013b. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 38:336-348.

Segura, E., J. Valladeau-Guilemond, M.H. Donnadieu, X. Sastre-Garau, V. Soumelis, and S. Amigorena. 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 209:653-660.

Segura, E., and J.A. Villadangos. 2011. A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic* 12:1677-1685.

Senzer, N.N., H.L. Kaufman, T. Amatruda, M. Nemunaitis, T. Reid, G. Daniels, R. Gonzalez, J. Glaspy, E. Whitman, K. Harrington, H. Goldsweig, T. Marshall, C. Love, R. Coffin, and J.J. Nemunaitis. 2009. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:5763-5771.

Serwold, T., F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob, and N. Shastri. 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419:480-483.

Seth, S., L. Oberdorfer, R. Hyde, K. Hoff, V. Thies, T. Worbs, S. Schmitz, and R. Forster. 2011. CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions. *Journal of immunology* 186:3364-3372.

Shankaran, V., H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2001. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111.

Shen, L., L.J. Sigal, M. Boes, and K.L. Rock. 2004. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21:155-165.

Sheridan, C. 2013. Amgen announces oncolytic virus shrinks tumors. *Nat Biotechnol* 31:471-472.

Shigematsu, H., B. Reizis, H. Iwasaki, S. Mizuno, D. Hu, D. Traver, P. Leder, N. Sakaguchi, and K. Akashi. 2004. Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21:43-53.

Shimizu, K., H. Kuriyama, J. Kjaergaard, W. Lee, H. Tanaka, and S. Shu. 2004. Comparative analysis of antigen loading strategies of dendritic cells for tumor immunotherapy. *Journal of immunotherapy* 27:265-272.

Shisler, J., C. Yang, B. Walter, C.F. Ware, and L.R. Gooding. 1997. The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J Virol* 71:8299-8306.

Shresta, S., C.T. Pham, D.A. Thomas, T.A. Graubert, and T.J. Ley. 1998. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10:581-587.

Siegal, F.P., N. Kadowaki, M. Shodell, P.A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y.J. Liu. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837.

Silverstein, S.C., R.M. Steinman, and Z.A. Cohn. 1977. Endocytosis. *Annual review of biochemistry* 46:669-722.

Simon, T., S. Tanguy-Royer, P.J. Royer, N. Boisgerault, J. Frikeche, J.F. Fonteneau, and M. Gregoire. 2012. Human dendritic cells sequentially matured with CD4(+) T cells as a secondary signal favor CTL and long-term T memory cell responses. *Biological research* 45:33-43.

Sisirak, V., J. Faget, M. Gobert, N. Goutagny, N. Vey, I. Treilleux, S. Renaudineau, G. Poyet, S.I. Labidi-Galy, S. Goddard-Leon, I. Durand, I. Le Mercier, A. Bajard, T. Bachelot, A. Puisieux, I. Puisieux, J.Y. Blay, C. Menetrier-Caux, C. Caux, and N. Bendriss-Vermare. 2012. Impaired IFN-alpha

production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res* 72:5188-5197.

Sluyter, R., A.N. Shemon, and J.S. Wiley. 2004. Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL-1 beta release from human monocytes. *Journal of immunology* 172:3399-3405.

Smits, E.L., P. Ponsaerts, Z.N. Berneman, and V.F. Van Tendeloo. 2008. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *The oncologist* 13:859-875.

Spadaro, F., C. Lapenta, S. Donati, L. Abalsamo, V. Barnaba, F. Belardelli, S.M. Santini, and M. Ferrantini. 2012. IFN-alpha enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing. *Blood* 119:1407-1417.

Sparer, T.E., R.A. Tripp, D.L. Dillehay, T.W. Hermiston, W.S. Wold, and L.R. Gooding. 1996. The role of human adenovirus early region 3 proteins (gp19K, 10.4K, 14.5K, and 14.7K) in a murine pneumonia model. *J Virol* 70:2431-2439.

Srivastava, P. 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology* 2:185-194.

Stary, G., C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp, and G. Stingl. 2007. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 204:1441-1451.

Stefan, N., P. Martin-Killias, S. Wyss-Stoeckle, A. Honegger, U. Zangemeister-Wittke, and A. Pluckthun. 2011. DARPins recognizing the tumor-associated antigen EpCAM selected by phage and ribosome display and engineered for multivalency. *Journal of molecular biology* 413:826-843.

Steinman, R.M., J.C. Adams, and Z.A. Cohn. 1975. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *The Journal of experimental medicine* 141:804-820.

Steinman, R.M., and Z.A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 137:1142-1162.

Steinman, R.M., and Z.A. Cohn. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *The Journal of experimental medicine* 139:380-397.

Steinman, R.M., D.S. Lustig, and Z.A. Cohn. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *The Journal of experimental medicine* 139:1431-1445.

Steinman, R.M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine* 191:411-416.

Stinchcombe, J.C., G. Bossi, S. Booth, and G.M. Griffiths. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15:751-761.

Stockert, E., E. Jager, Y.T. Chen, M.J. Scanlan, I. Gout, J. Karbach, M. Arand, A. Knuth, and L.J. Old. 1998. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *The Journal of experimental medicine* 187:1349-1354.

Studebaker, A.W., B. Hutzen, C.R. Pierson, S.J. Russell, E. Galanis, and C. Raffel. 2012. Oncolytic measles virus prolongs survival in a murine model of cerebral spinal fluid-disseminated medulloblastoma. *Neuro Oncol* 14:459-470.

Stutman, O. 1974. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183:534-536.

Stutman, O. 1979. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst* 62:353-358.

Sugiyama, T., M. Yoneda, T. Kuraishi, S. Hattori, Y. Inoue, H. Sato, and C. Kai. 2013. Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activation molecule as a novel oncolytic virus for breast cancer treatment. *Gene Ther* 20:338-347.

Swiecki, M., and M. Colonna. 2010. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunological reviews* 234:142-162.

Takano, A., N. Ishikawa, R. Nishino, K. Masuda, W. Yasui, K. Inai, H. Nishimura, H. Ito, H. Nakayama, Y. Miyagi, E. Tsuchiya, N. Kohno, Y. Nakamura, and Y. Daigo. 2009. Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 69:6694-6703.

Takeda, M., M. Tahara, T. Hashiguchi, T.A. Sato, F. Jinnouchi, S. Ueki, S. Ohno, and Y. Yanagi. 2007. A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. *J Virol* 81:12091-12096.

Talmadge, J.E. 2011. Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: mechanisms and clinical impact. *Seminars in cancer biology* 21:131-138.

Taqi, A.M., M.B. Abdurrahman, A.M. Yakubu, and A.F. Fleming. 1981. Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet* 1:1112.

Tarhini, A.A., H. Gogas, and J.M. Kirkwood. 2012. IFN-alpha in the treatment of melanoma. *Journal of immunology* 189:3789-3793.

Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893-897.

Tel, J., E.H. Aarntzen, T. Baba, G. Schreibelt, B.M. Schulte, D. Benitez-Ribas, O.C. Boerman, S. Croockewit, W.J. Oyen, M. van Rossum, G. Winkels, P.G. Coulie, C.J. Punt, C.G. Figdor, and I.J. de Vries. 2013a. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res* 73:1063-1075.

Tel, J., G. Schreibelt, S.P. Sittig, T.S. Mathan, S.I. Buschow, L.J. Cruz, A.J. Lambeck, C.G. Figdor, and I.J. de Vries. 2013b. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* 121:459-467.

Tel, J., E.L. Smits, S. Anguille, R.N. Joshi, C.G. Figdor, and I.J. de Vries. 2012a. Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood* 120:3936-3944.

Tel, J., A.M. van der Leun, C.G. Figdor, R. Torensma, and I.J. de Vries. 2012b. Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 61:1279-1288.

Toda, M., S.D. Rabkin, H. Kojima, and R.L. Martuza. 1999. Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. *Human gene therapy* 10:385-393.

Tollefson, A.E., A.R. Stewart, S.P. Yei, S.K. Saha, and W.S. Wold. 1991. The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus form a complex and function together to down-regulate the epidermal growth factor receptor. *J Virol* 65:3095-3105.

Tougeron, D., E. Fauquembergue, and J.B. Latouche. 2013. Immune response and colorectal cancer. *Bulletin du cancer* 100:283-294.

Treilleux, I., J.Y. Blay, N. Bendriss-Vermare, I. Ray-Coquard, T. Bachelot, J.P. Guastalla, A. Bremond, S. Goddard, J.J. Pin, C. Barthelemy-Dubois, and S. Lebecque. 2004. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:7466-7474.

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

Tsukamoto, N., S. Okada, Y. Onami, Y. Sasaki, K. Umezawa, and Y. Kawakami. 2009. Impairment of plasmacytoid dendritic cells for IFN production by the ligand for immunoglobulin-like transcript 7 expressed on human cancer cells. *Clin Cancer Res* 15:5733-5743.

Ueno, T., M. Toi, H. Saji, M. Muta, H. Bando, K. Kuroi, M. Koike, H. Inadera, and K. Matsushima. 2000. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 6:3282-3289.

Ungerechts, G., M.E. Frenzke, K.C. Yaiw, T. Miest, P.B. Johnston, and R. Cattaneo. 2010. Mantle cell lymphoma salvage regimen: synergy between a reprogrammed oncolytic virus and two chemotherapeutics. *Gene Ther* 17:1506-1516.

Ungerechts, G., C. Springfeld, M.E. Frenzke, J. Lampe, W.B. Parker, E.J. Sorscher, and R. Cattaneo. 2007. An immunocompetent murine model for oncolysis with an armed and targeted measles virus. *Mol Ther* 15:1991-1997.

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

Valladeau, J., V. Duvert-Frances, J.J. Pin, C. Dezutter-Dambuyant, C. Vincent, C. Massacrier, J. Vincent, K. Yoneda, J. Banchereau, C. Caux, J. Davoust, and S. Saeland. 1999. The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *European journal of immunology* 29:2695-2704.

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

Valladeau, J., and S. Saeland. 2005. Cutaneous dendritic cells. *Seminars in immunology* 17:273-283.

Vanbervliet, B., N. Bendriss-Vermare, C. Massacrier, B. Homey, O. de Bouteiller, F. Briere, G. Trinchieri, and C. Caux. 2003. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *The Journal of experimental medicine* 198:823-830.

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. *The Journal of pathology* 200:255-268.

Vermi, W., M. Soncini, L. Melocchi, S. Sozzani, and F. Facchetti. 2011. Plasmacytoid dendritic cells and cancer. *Journal of leukocyte biology* 90:681-690.

Villadangos, J.A., and P. Schnorrer. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature reviews. Immunology* 7:543-555.

Vulink, A., K.J. Radford, C. Melief, and D.N. Hart. 2008. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Advances in cancer research* 99:363-407.

Vyas, J.M., A.G. Van der Veen, and H.L. Ploegh. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature reviews. Immunology* 8:607-618.

Wakim, L.M., and M.J. Bevan. 2011. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature* 471:629-632.

Watkins, S.K., Z. Zhu, E. Riboldi, K.A. Shafer-Weaver, K.E. Stagliano, M.M. Sklavos, S. Ambs, H. Yagita, and A.A. Hurwitz. 2011. FOXO3 programs tumor-associated DCs to become tolerogenic in human and murine prostate cancer. *The Journal of clinical investigation* 121:1361-1372.

Watts, C. 2001. Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* 13:26-31.

Wei, J., J. Waithman, R. Lata, N.A. Mifsud, J. Cebon, T. Kay, M.J. Smyth, A.J. Sadler, and W. Chen. 2010. Influenza A infection enhances cross-priming of CD8+ T cells to cell-associated antigens in a TLR7- and type I IFN-dependent fashion. *Journal of immunology* 185:6013-6022.

White, E. 1994. Tumour biology. p53, guardian of Rb. *Nature* 371:21-22.

Wolfson, L.J., P.M. Strebel, M. Gacic-Dobo, E.J. Hoekstra, J.W. McFarland, B.S. Hersh, and I. Measles. 2007. Has the 2005 measles mortality reduction goal been achieved? A natural history modelling study. *Lancet* 369:191-200.

Xu, X., X.Y. Fu, J. Plate, and A.S. Chong. 1998. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 58:2832-2837.

Yaiw, K.C., T.S. Miest, M. Frenzke, M. Timm, P.B. Johnston, and R. Cattaneo. 2011. CD20-targeted measles virus shows high oncolytic specificity in clinical samples from lymphoma patients independent of prior rituximab therapy. *Gene Ther* 18:313-317.

Yamamoto, M., S. Yamazaki, S. Uematsu, S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Kuwata, O. Takeuchi, K. Takeshige, T. Saitoh, S. Yamaoka, N. Yamamoto, S. Yamamoto, T. Muta, K.

Takeda, and S. Akira. 2004. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* 430:218-222.

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.

Zhang, H., H. Wang, J. Zhang, G. Qian, B. Niu, X. Fan, J. Lu, A.R. Hoffman, J.F. Hu, and S. Ge. 2009. Enhanced therapeutic efficacy by simultaneously targeting two genetic defects in tumors. *Mol Ther* 17:57-64.

Zhang, J.G., P.E. Czabotar, A.N. Policheni, I. Caminschi, S.S. Wan, S. Kitsoulis, K.M. Tullett, A.Y. Robin, R. Brammananth, M.F. van Delft, J. Lu, L.A. O'Reilly, E.C. Josefsson, B.T. Kile, W.J. Chin, J.D. Mintern, M.A. Olshina, W. Wong, J. Baum, M.D. Wright, D.C. Huang, N. Mohandas, R.L. Coppel, P.M. Colman, N.A. Nicola, K. Shortman, and M.H. Lahoud. 2012a. The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity* 36:646-657.

Zhang, S.C., W.S. Cai, Y. Zhang, K.L. Jiang, K.R. Zhang, and W.L. Wang. 2012b. Engineered measles virus Edmonston strain used as a novel oncolytic viral system against human neuroblastoma through a CD46 and nectin 4-independent pathway. *Cancer letters* 325:227-237.

Zhang, S.C., W.L. Wang, W.S. Cai, K.L. Jiang, and Z.W. Yuan. 2012c. Engineered measles virus Edmonston strain used as a novel oncolytic viral system against human hepatoblastoma. *BMC Cancer* 12:427.

Zhang, S.Y., E. Jouanguy, S. Ugolini, A. Smahi, G. Elain, P. Romero, D. Segal, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, C. Picard, A. Chapgier, S. Plancoulaine, M. Titeux, C. Cognet, H. von Bernuth, C.L. Ku, A. Casrouge, X.X. Zhang, L. Barreiro, J. Leonard, C. Hamilton, P. Lebon, B. Heron, L. Vallee, L. Quintana-Murci, A. Hovnanian, F. Rozenberg, E. Vivier, F. Geissmann, M. Tardieu, L. Abel, and J.L. Casanova. 2007. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317:1522-1527.

Zhang, Y., B. Patel, A. Dey, E. Ghorani, L. Rai, M. Elham, A.Z. Castleton, and A.K. Fielding. 2012d. Attenuated, oncolytic, but not wild-type measles virus infection has pleiotropic effects on human neutrophil function. *Journal of immunology* 188:1002-1010.

Zhao, D., P. Chen, H. Yang, Y. Wu, X. Zeng, Y. Zhao, Y. Wen, X. Zhao, X. Liu, Y. Wei, and Y. Li. 2013. Live attenuated measles virus vaccine induces apoptosis and promotes tumor regression in lung cancer. *Oncology reports* 29:199-204.

Zhou, G., and H. Levitsky. 2012. Towards curative cancer immunotherapy: overcoming posttherapy tumor escape. *Clinical & developmental immunology* 2012:124187.

Zhou, S., Y. Li, F. Huang, B. Zhang, T. Yi, Z. Li, H. Luo, X. He, Q. Zhong, C. Bian, X. Lin, X. Qi, P. Liu, C. Huang, X. Zhao, and Y. Wei. 2012. Live-attenuated measles virus vaccine confers cell contact loss and apoptosis of ovarian cancer cells via ROS-induced silencing of E-cadherin by methylation. *Cancer letters* 318:14-25.

Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D.N. Hart, P.J. Leenen, Y.J. Liu, G. MacPherson, G.J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J.M. Austyn, and M.B. Lutz. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74-80.

Ziegler, J.L. 1976. Spontaneous remission in Burkitt's lymphoma. *Natl Cancer Inst Monogr* 44:61-65.

Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature reviews. Immunology* 6:715-727.

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

Zou, W., and N.P. Restifo. 2010. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* 10:248-256.

Zygiert, Z. 1971. Hodgkin's disease: remissions after measles. *Lancet* 1:593.

ANNEXES

XI. Annexe 1: "Antitumor Virotherapy by Attenuated Measles Virus (MV)"

Biology **2013**, *2*, 587-602; doi:10.3390/biology2020587

OPEN ACCESS

biology

ISSN 2079-7737

www.mdpi.com/journal/biology

Review

Antitumor Virotherapy by Attenuated Measles Virus (MV)

Jean-Baptiste Guillerme [1,2,3], Marc Gregoire [1,2,3], Frédéric Tangy [4] and Jean-François Fonteneau [1,2,3,*]

1 INSERM, UMR892, Nantes, F-44000, France; E-Mails: jean-baptiste.guillerme@univ-nantes.fr (J.-B.G.); marc.gregoire@nantes.inserm.fr (M.G.)

2 CNRS, UMR6299, Nantes, F-44000, France

3 Université de Nantes, Nantes, F-44000, France

4 CNRS, URA3015, Institut Pasteur, Unité de Génomique Virale et Vaccination, Paris, 75015, France; E-Mail: ftangy@pasteur.fr

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jean-francois.fonteneau@inserm.fr; Tel.: +33-228-080-239; Fax: +33-228-080-204.

Received: 4 February 2013; in revised form: 28 February 2013 / Accepted: 5 March 2013 / Published: 28 March 2013

Abstract: Antitumor virotherapy consists of the use of replication-competent viruses to infect and kill tumor cells preferentially, without damaging healthy cells. Vaccine-attenuated strains of measles virus (MV) are good candidates for this approach. Attenuated MV uses the CD46 molecule as a major entry receptor into cells. This molecule negatively regulates the complement system and is frequently overexpressed by cancer cells to escape lysis by the complement system. MV exhibits oncolytic properties in many cancer types *in vitro*, and in mouse models. Phase I clinical trials using MV are currently underway. Here, we review the state of this therapeutic approach, with a focus on the effects of MV on the antitumor immune response.

Keywords: antitumor virotherapy; measles virus vaccine; dendritic cells; tumor antigen; clinical trial; vaccine

1. Introduction

During the past decade, there has been an increasing interest in antitumor virotherapy using oncolytic viruses (OV). This consists of the use of replication-competent virus to infect and kill tumor

cells preferentially, without, or with limited, infection of healthy counterparts. The oncolytic properties of many live, attenuated viruses have been evaluated as cancer therapeutics, including adenovirus, vesicular stomatitis virus, herpes simplex virus, Newcastle disease virus and MV [1]. The tropism of OV for tumor cells is due to two main factors. First, the receptor that OV use to enter cells is overexpressed by, or has expression restricted to, tumor cells. The second level of selectivity is tumor biology [2]. Most tumors develop many strategies to escape the immune system, and to resist apoptosis and translational suppression. These mechanisms also play crucial roles in the control of viral replication. Their ablations during tumor development make the tumor an efficient destination for virus to replicate. Tumor cell death through OV infection is complex and should be considered as a particular/original type of cell death which differs from classical cell death by apoptosis, necrosis or autophagy [2].

In addition to killing tumor cells, OV could play a crucial role in tumor rejection to overcome or reorient immune suppression mediated by the tumor microenvironment. By its nature, the virus is a [3]. DC are at the interface between innate and adaptive immunity, and can prime an adaptive immune response, notably T cell responses against specific, tumor-associated antigens if these are correctly activated [4].

Among the different oncolytic viruses, vaccine-attenuated strains of measles virus (MV) show a promising potential for cancer therapy. As early as the 1970s, spontaneous clinical remissions were observed in patients suffering from hematological cancers after natural infection with wild-type (wt) MV [5,6]. Since then, it has been demonstrated that attenuated MV exhibits oncolytic properties against many types of cancers, *in vitro* and *in vivo*, in models of human tumor xenografts in immunodeficient mice [1]. Alternatively, the capacity of MV infection to activate a strong immune reaction could play a crucial role in the efficiency of antitumor virotherapy based on MV [7,8]. Antitumor virotherapy using MV is, thus, currently being evaluated in clinical trials [2].

Oncolytic virotherapy is a complex approach, requiring good viral replication in targeted tumor tissue and the enrollment of the immune system against tumor-associated antigens, without inhibiting earlier viral replication. Here, we review the different aspects of this approach using attenuated strains of MV, with a special focus on MV immunogenicity and effects on the antitumor immune response.

2. MV Vaccine

2.1. Measles Virus Description: wt and Vaccine-Attenuated Strains

MV is an enveloped and negative, nonsegmented, single-strand RNA virus belonging to the *Morbillivirus* genus of the *Paramyxoviridae* family [9]. The World Health Organization lists twenty-four strains of measles viruses, classed into eight clades [10]. The MV RNA genome comprises around 16,000 nucleotides and encodes eight proteins, two of which are nonstructural proteins (V and C) resulting from an alternative transcript from the RNA coding for the phosphoprotein (P). Large protein (L) and nucleoprotein (N) form the viral nucleocapsid, which contains the viral RNA genome. The matrix protein (M), fusion protein (F) and hemagglutinin protein (H) form the viral envelope with lipids from the infected host cell membrane [9].

The first MV isolate was obtained from a child and was named the Edmonston strain. Different attenuated strains of MV have been generated from the wild-type Edmonston strain by culture in various cell types [11,12]. For example the Schwarz strain, which is produced and used to vaccinate children in Europe and Brazil, was generated in 1962 by additional subcultures of the Edmonston strain in chick embryo fibroblasts [13]. The comparative sequence analysis between wild-type-Edmonston and Schwarz shows 42 nucleotide changes. These mutations contribute to the attenuated profile of this strain [12].

The replication cycle starts with the adsorption of MV to the host cell through the interaction between the MV H protein and the cell surface molecules CD150, CD46 and/or Nectin-4. The F protein then mediates the fusion between the viral particle and the host cell membrane, allowing penetration of the negative, single-stranded RNA and the associated proteins into the cytoplasm. These proteins form a ribo-nucleo-proteic complex (RNP complex), which is a template for mRNA transcription and MV genome replication [12]. The virions bud from the plasma membrane of the host cell to end the cycle. In addition, MV infection is known to induce the formation of syncytia. MV-infected cells fuse with uninfected neighboring cells forming multinucleated infected cells, a phenomenon that increases the efficiency of MV replication.

2.2. Vaccine Efficacy

Measles virus is a highly contagious agent and one of the leading causes of death in children worldwide [9]. One person with measles can infect fifteen to twenty others (R_0 = 15 20), meaning that the interruption of endemic transmission in a population requires that more than 95% of the population is immune [14]. People who recover from measles are immunized for life. Most measles-related deaths are caused by MV-associated temporary immune suppression which allows opportunistic infections. Even though a safe and cost-effective vaccine is available, around twenty million cases of measles infection are reported every year, and more than 95% of MV-related deaths occur in underdeveloped countries [15].

Live, attenuated MV vaccine has been distributed at low cost to millions of children in many countries through the Extended Program on Immunization (EPI) of the World Health Organization (WHO). This vaccine induces a strong, long term immunity against measles virus after one or two injections, as antibodies and specific CD8+ T cells persist for as long as 25 years after vaccination [16]. Prior to vaccination, an estimated four to five million cases of measles occurred annually between 1953 and 1962 in the US [17]. From 2001 to 2008 the annual incidence of measles was less than one case per million in the US [18], and less than ten cases per million in Europe [19]. Measles caused an estimated 139,300 deaths worldwide in 2010, which represents a greater than 97% decrease compared with the estimated six million deaths occurring annually prior to use of the measles vaccine [20].

2.3. Vaccine Safety: Absence of Observed Reversion

From 1978 to 2010, 17,536 adverse experiences following immunization were reported to Merk after M-M-R^{TM} II administration, for approximately 575 million doses distributed. Only 4,822 cases were considered to be serious, the relative risk of a serious event thus being 8.4 cases per million doses

distributed [17]. The reversion of measles vaccine to a pathogenic form has never been reported [21]. Altogether, these considerations make the measles virus vaccine one of the safest human vaccines.

3. MV in Antitumor Virotherapy

3.1. Receptors for MV Infection

Receptors for the entry of MV are quite well defined. The pathogenic wild-type strains of measles virus enter the cell using the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM/CD150) which confers on this virus a natural tropism for T and B lymphocytes and activated monocytes/macrophages [22,23]. The live, attenuated strains of MV, which are selectively oncolytic, use the CD46 molecule as the major receptor for entry into the cell [24 26], which is ubiquitously expressed at a low level by all nucleated cells [27]. CD46 and other complement regulatory proteins (CRP: CD55 and CD35) block the complement cascade at the C3 activation stage, and their expression at low density protects normal tissues from accidental injury by activated complement. It is also clear that many tumor types overexpress these molecules to escape complement-dependent cytotoxicity (CDC) [28,29]. This selective expression at high density by many cancer cell types confers on live, attenuated MV a natural tropism for tumor cells. Indeed, it has been demonstrated that, above a certain threshold of CD46 expression, the killing and syncitia formation mediated by MV infection increase dramatically [24] whereas healthy tissues, which express a low density of CD46, remain unharmed [30].

Nectin-4 (PVRL-4) has recently been identified as a novel receptor for wtMV and vaccine strains [31,32] and plays a crucial role in the shedding of MV from the respiratory tract of infected individuals for transmission of the disease [33]. It is an adherent junction protein originally described as a member of the polio virus receptor-like proteins, which act as an entry site for poliovirus [34] and other viruses such as HSV-1 and HSV-2 [35]. In humans, PVRL-4 is mostly expressed in placenta and trachea, and can also be found at a low density in the epithelial cells of tonsils, oral mucosa, lung macrophages and neuronal cells of the cerebral cortex [31]. It has also been described as a tumor marker which is frequently overexpressed in many adenocarcinomas, such as ovarian, lung, colon and breast tumors [36 38]. It has been demonstrated recently that nectin-4 is necessary for the tumor selectivity of infection by MV in some breast cancers [39].

Finally, other MV entry receptors may exist, as some tumor cell lines which do not express CD46, CD150/SLAM and nectin-4 are sensitive to MV infection [40].

3.2. MV Sensitivity of Numerous Cancer Types In Vitro *and* In Vivo

The cytopathic effect (CPE) of MV is characterized by the formation of syncytia (giant multinucleated cells) due to the interactions of viral hemagglutinin and fusion proteins from the infected cells with the CD46 expressed by the neighboring cells. Many studies have described oncolytic properties of MV, *in vitro* and *in vivo*, on immunodeficient mice bearing human tumor xenografts. Hence, oncolytic efficacy of MV has been demonstrated against T-cell lymphoma [41,42], myelomas [43], pancreatic cancer [44], glioblastomas, gliomas [45,46], ovarian carcinomas [30], prostate cancer [47], breast cancer [39,47,48], melanoma [49], renal cell carcinoma [50], mesothelioma [7,51], medulloblastoma [52,53] and lung/colorectal adenocarcinoma [54]. Recently, Zhang *et al.* demonstrated a

therapeutic efficacy of MV against human hepatoblastoma, both *in vivo* and *in vitro* [55]. During the last ten years, oncolytic activities of MV have been evaluated and demonstrated for at least twelve different cancer types, highlighting the enthusiasm given to this approach. Furthermore, the fact that attenuated MV has been injected to vaccinate millions of children around the world with an excellent safety profile and with no observed reversion to the wt-MV make MV attractive, compared to other OV that are not used in vaccination.

3.3. Engineering of MV to Increase the Efficiency of Antitumor Virotherapy

Despite its natural tropism for tumor cells and its lytic activity, the oncolytic properties of MV can be improved by genetic engineering. RNA encoding recombinant protein can be inserted into the MV, up to 5 kb [56]. Thus, recombinant MV can be designed to express receptors against specific tumor markers, to increase its replication capacity, or to improve the monitoring of viral spread *in vivo*.

Virus entry into cells is dependent on cell-surface-marker recognition and the concept of engineering MV to extend its recognition of tumor-specific markers is interesting. Hence, the group of M.S. Topp efficiently retargeted MV for multiple myeloma (MM). Using site-specific mutagenesis, they inserted the sequence encoding a single chain derived from the Wue-1 antibody, which specifically recognizes CD138+ MM [57]. This modification makes the MV unable to infect cells by CD150 or CD46. Despite the lack of classical recognition, the retargeted MV-Wue has shown efficient oncolytic properties against MM [58].

Another way to improve the oncolytic potential of MV is to improve its cytotoxic activity. Meng and colleagues developed an MV derived from Edmonston lineage, recombinant for wild-type N/P/L protein (MV-NPL). These proteins form the ribonucleoprotein complex which is the viral replication unit in infected cells. These genetic modifications confer on MV more efficient replication and cytotoxic abilities against renal cancer cells than nonengineered MV, and display a minimal cytopathic effect on normal human cell lines [50].

MV has also been engineered to facilitate the monitoring of viral spread *in vivo*. E. Galanis group has developed an MV recombinant for carcinoembryonic antigen (CEA). CEA is used as a reporter gene for viral replication, which can be detected in the blood. This MV-CEA exhibits efficacy against different types of tumor models, *in vitro* and *in vivo* [46,59], and has also been tested in a phase I clinical trial in recurrent ovarian cancer patients, by intraperitoneal injection [60].

MV has also been genetically modified to express the sodium iodide symporter, NIS, (MV-NIS). This modification allows the noninvasive assessment of MV replication by administration of ^{123}I for gamma-camera imaging, as infected tumor cells express NIS making them permeable to ^{123}I. MV-NIS was also used to improve the tumoricidal properties of MV, by allowing an ionizing radiation treatment by administration of ^{131}I, emitter particles penetrate the tissue for 0.4 mm and provide a local bystander killing of oncolysis-refractory tumor cells [61].

Type I IFNs are known to have antiangiogenic properties [62] and to induce an antitumor immune response by modulating the activation of different immune cell types, such as NK and T cells [63]. These properties have been exploited in an engineered MV, modified in order to express recombinant INF- d that MV-IFN- ed a better capacity to kill mesothelioma xenografts and to increase the survival of treated mice than mice treated with an MV not recombinant

for IFN- [51]. This study also revealed that MV-IFN- s a modification of the tumor microenvironment, by increasing the infiltration of CD68+ macrophages and limiting neoangiogenesis.

Recently, a Schwartz attenuated strain of MV containing a transgene encoding the suicide gene super cytosine deaminase (MV-SCD) has been studied to kill sarcoma tumor cell lines that are sensitive to MV infection, but where the MV fail to replicate due to innate antiviral mechanism, such as IFN-stimulated genes [64]. SCD is a gene encoding a fusion protein consisting of yeast cytosine deaminase and yeast uracil phosphoribosyltransferase that transforms the prodrug 5-fluorocytosine into a cytotoxic drug.

4. MV and the Antitumor Immune Response

4.1. MV Immunogenicity May Participate in the Efficiency of Antitumor Virotherapy

In addition to its capacity to lyse infected tumor cells, MV has also the ability to activate the immune system. This ability may participate in the efficiency of antitumor virotherapy based on MV. Indeed, tumors develop many different strategies to grow, especially by conditioning their microenvironment to escape the immune system and to promote neoangiogenesis. They produce immunosuppressive cytokines, notably TGF- , and recruit immunosuppressive cells, such as T regulatory cells (Tregs), to maintain immune tolerance within the tumor. Thus, MV may also act as an immunoadjuvant to overcome the immunosuppressive tumor environment. It has already been demonstrated for reovirus, another OV, that innate and adaptive immunity-mediated antitumor activity is necessary for successful virotherapy, independent of direct oncolysis [65,66]. Infection at the tumor site can induce a potent immune response due to the release of induced by MV-mediated cell death. These danger signals can be classified into two categories: the damage-associated molecular patterns (DAMPs) which are released as a result of immunogenic cell death, notably triggered during viral infection [67], and the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) which are conserved molecular motifs expressed by pathogens such as the single stranded RNA of MV [68]. The presence at the tumor site of danger signals (DAMPs and PAMPs) and dead tumor cells as a source of tumor antigens may fulfill the conditions for an efficient induction of antitumor immunity.

4.2. MV-Infected Tumor Cells Activate Myeloid Dendritic Cells

In humans, there are at least two main subsets of DC: the CD11c+/BDCA2- myeloid DC (mDC), which include Langerhans cells and dermal and intestinal DC, and the CD11c-/BDCA2+ plasmacytoid DC (pDC). Each subset is equipped with a specialized combination of pattern-recognition receptors (PRR), allowing each DC subset to recognize different danger signals.

mDC constitute a major antigen-presenting cell family and play a crucial role in the induction of tolerance or immune response. In normal conditions they tend to induce tolerance against self antigens, whereas in pathogenic conditions the presence of danger signals induces their maturation, notably their expression of costimulatory molecules (CD80, CD86), and allows them to prime T cell responses [4,69]. DC are defined by a typical morphology [70] and a unique ability to acquire and process exogenous antigen into peptides for class II major histocompatibility complex (MHC) presentation to CD4+ T cells in lymphoid organs, and also for class I MHC presentation to CD8+ T cells, a phenomenon named

- [71]. Their maturation/activation is required to prime adaptive immunity [72]. Recruitment of DCs could be a key regulator in the long term therapeutic benefit of oncolytic therapy by triggering an antitumor immune response, notably T cell responses. Therefore, stimulation of the mDC subset to promote tumor rejection is probably essential to the efficacy of antitumor virotherapy.

The effects of MV-infected tumor cells on mDC have been addressed recently. Our group demonstrated, *in vitro*, that mesothelioma tumor cells infected with the Schwarz strain of MV undergo immunogenic cell death characterized by the release of DAMPs, such as the heat shock proteins, Hsp70 and gp96, and by the presence of the viral double-stranded RNA (dsRNA) [7]. Monocyte derived-DC mature after internalization of MV-infected tumor cells, due to their expression pattern of PRR (TLR3, MDA5, RIG-1) and the presence of DAMPs and PAMPs. This efficient uptake and maturation allows DC to cross-present tumor antigen, and, thus, to cross-prime CD8+ T cells specific for mesothelin, a tumor antigen expressed by mesothelioma tumor cells [7]. Donnelly and colleagues also demonstrated that MV Edmonston strain induced immunogenic death of melanoma tumor cells, through the secretion of inflammatory cytokines (IL-6, IL-8 and type I IFN) and chemokines (RANTES and HMGB1) in an MV dose-dependent manner [49]. They also show that MV-infected tumor cells are a good substrate to induce an antitumor T cell response by cross-presentation. The release of HMGB1 by MV-infected tumor cells is of particular interest as it has been shown to be a potent DAMP important for immunogenic cell death of cancer cells, acting as an adjuvant to DC maturation through the TLR4 pathway [73].

Recently, a new subset of mDC that is more efficient than the others to perform cross-presentation, has been described [74 77]. This new DC subset is characterized by expression of BDCA-3 membrane protein (CD141), the chimiokine receptor XCR1, and the C-type lectin Clec9A (DNGR-1). Interaction of this new subset of mDC with MV has not been addressed.

4.3. MV-Infected Tumor Cells Activate Plasmacytoid DC (pDC)

pDC, also known as type I interferon-producing cells (IPC), are present in the blood and lymphoid organs. This subset of DC is particularly involved in the antiviral immune response, due to their expression of intracellular toll-like receptors specialized in sensing viral nucleic acid (TLR7 and 9). Hence, pDC respond to a wide range of RNA and DNA viruses, in response to TLR triggering, by producing large amounts of type I IFN (IFN- , -) and by upregulating their expression of maturation markers and costimulation molecules. pDC have already shown their capacity to present viral antigens to CD8+ and CD4+ T cells when they are infected by influenza virus [78], and to cross-present viral antigen acquired from infected cells to CD8+ T lymphocytes [79,80].

We recently demonstrated that MV antitumor virotherapy could be an efficient way to recruit pDC in antitumor immunity [8]. We showed, *in vitro*, that MV-infected melanoma cell lines are efficiently internalized by pDC and induce their maturation, characterized by a huge secretion of IFN- TLR7-dependent manner. We demonstrated that human pDC can cross-present a tumor-associated antigen (NYESO-1) to CD8+ T cells from the MV-infected tumor cells. We also observed that cross-presentation occured only when pDC acquired antigen from MV-infected tumor cells, whereas pDC exposed to UV-irradiated tumor cells (nonimmunogenic cell death) did not perform tumor antigen cross-presentation. These results show that MV-infected tumor cells activate pDC, notably

their capacities to produce large amounts of IFN- and to cross-present tumor antigens to CD8+ T cells. IFN- plays an important role in the antitumor immune response, as it is necessary for the induction of tumor-antigen-specific T cell responses [81,82].

pDC have been shown to play a beneficial role in the antitumor immune response, when they are adequately activated. It has been demonstrated recently, in a mouse melanoma model, that topical imiquimod treatment of tumors can induce tumor rejection. Imiquimod is a ligand of TLR7, expressed by pDC, and activates their cytotoxic properties through the expression of TRAIL and the secretion of granzyme B [83]. In a similar model, C. Liu *et al.* show that injection of TLR9-activated pDC induces tumor regression in mice by recruitment of NK cells at the tumor site in a CCR5-dependent manner [84]. Furthermore, J. Mourries *et al.* have shown in a mouse model that antigen cross-presentation by pDC can be triggered by viruses or by TLR7 or TLR9 ligands, which results in cross-priming of antigen-specific CD8+ T cells [85]. Finally, Jolanda De Vries group has recently completed the first phase I clinical trial by intranodal injection of tumor-antigen-loaded and -activated pDC in metastatic melanoma patients. They reported that all patients mounted a T cell response against the tumor antigens. The clinical outcomes of this trial were promising with a significantly extended survival in the majority of the patients [86].

Thus, MV used in antitumor virotherapy may be an interesting method of activating pDC subsets in cancer patients. Furthermore, it has an additional advantage over classical TLR7 or TLR9 ligands such as imiquimod, as MV induces the release of tumor antigens for cross-presentation following the lysis of infected tumor cells.

4.4. Effects of MV on other Immune Cell Types

Besides DC, the effects of MV virotherapy on the antitumor immune response have also been studied on neutrophils [87]. In a human lymphoma xenograft model in immunodeficient mice, intratumoral injection of MV induced the regression of large tumors, characterized by an important influx of activated neutrophils in the tumor. The number of these neutrophils correlated with the level of tumor regression, suggesting a role for these cells in the efficiency of antitumor virotherapy by MV.

It is also possible that MV virotherapy is able to induce natural killer (NK) cell activation, as IFN- produced by pDC is able to activate an NK response [84]. However, D. Grote *et al.* failed to observe an influx of NK into tumor in their model of MV virotherapy using a human lymphoma xenograft in immunodeficient SCID mice [87]. The authors did not look at cells of the adaptive immune response, since T and B lymphocytes are deficient in SCID mice.

This last study highlights one problem encountered by immunologists to determine the effect of MV virotherapy on antitumor immune response. Indeed, mouse cells, including tumor cells, are not sensitive to MV infection. Thus, this therapeutic approach cannot be studied in immunocompetent mice. Most *in vivo* work on MV virotherapy has been performed with human tumor xenografts in immunodeficient mice (nude, SCID, Nod/SCID), which limits study of the antitumor immune response on some cells of the innate immune response, such as neutrophils or NK, but does not allow to study the adaptive antitumor immune response. This is not the case of some other OV, such as vesicular stomatitis virus or vaccinia, which can infect human cells, as well as mouse cells [2].

4.5. Effects of Anti-Measles Immune Response on MV Antitumor Virotherapy

Due to the very high contagiousness of wt-MV and to MV vaccination programs started at the end of the 70s, more than 90% of occidental countries population is immunized again MV, with notably presence of neutralizing antibodies that can persist throughout life [16]. These neutralizing antibodies may limit infection of tumor cells by MV. Indeed, in a model of human disseminated myeloma xenograft in immunodeficient mouse, the presence of adoptively transferred neutralizing antibody impaired efficiency of MV antitumor virotherapy when the MV is injected systematically [88]. One way to circumvent this problem is to inject MV-infected cells as virus carriers, which protect the virus from neutralizing antibodies, instead of injection of free MV. This virus carrier strategy has also been used to treat orthotopic ovarian cancer by intraperitoneal injection of mesenchymal stem cells infected with MV [89]. Thus, systemic injection of free MV for antitumor virotherapy is not efficient due to the presence of neutralizing antibodies. Virus carrier is a strategy that permits to limit effects of neutralizing antibody.

Another approach to limit effects of neutralizing antibodies may be to inject MV directly inside tumors. In a recent phase II clinical study using as OV, vaccinia virus with disruption of the viral thymidine kinase gene and engineered to express GM-CSF to treat advanced hepatocellular carcinoma, Heo *et al*. show that intratumoral injections of high doses of virus induce strong clinical responses which are independent of a preexisting immunity against vaccinia in treated patients [90].

5. Clinical Trials

5.1. Phase I Clinical Trial on Cutaneous T Cell Lymphoma (CTCL)

Viral oncolysis has been proposed as a mechanism explaining the spontaneous tumor regressions of Hodgkin lymphoma [91,92] and Burkitt s lymphoma [5,93] after natural MV infections. These case reports suggest an important oncolytic activity for MV against hematological tumors. These observations led Heinzerling and colleagues to carry out the first phase I clinical trial of MV antitumor virotherapy using the Edmonston-Zagreb strain of MV on patients with CTCL [94]. This malignancy is characterized by an accumulation of clonal T lymphocytes in the skin, inducing patches, plaques and tumors. This clinical study showed that intratumoral injection of MV after systemic treatment by IFN- (to avoid MV infection in IFN- -sensitive healthy cells) induced local infection and a characteristic cytopathogenic effect of MV on tumor cells which was not abrogated by the presence of preexisting MV antibodies. Tumor regressions were observed in three patients with, interestingly, some regression of distant lesions where MV was not injected.

5.2. Phase I Clinical Trial on Chemotherapy-Refractory Ovarian Cancer

The oncolytic properties of MV have also been evaluated clinically in patients with Taxol- and platinum-refractory, recurrent ovarian cancers, who are seropositive for measles virus. In this phase I clinical study, Evanthia Galanis and colleagues (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) used MV-CEA, a modified Edmonston strain engineered to produce carcinoma embryonic antigen as a soluble maker, which allows the monitoring of MV replication by serum dosage [60]. Escalating doses were given to

patients who were preimmunized against MV to assure the safety of the trial. Doses ranged from 10^3 to 10^9 $TCID_{50}$ with no dose-limiting toxicity observed. Clinical objective responses were observed in fourteen of twenty-one patients, with a stabilization of disease for a median duration of 92.5 days. The stabilization of the disease was associated, in five patients, with a diminution of the tumor-specific marker, CA-125. The median survival time of the MV-treated patients (12.15 months) was double that of the expected median survival of the patient population (6 months). These results highlight the promising potential of oncolytic measles therapy in ovarian cancer patients.

5.3. Ongoing Clinical Trials

Three phase I clinical trials of antitumor virotherapy using MV are currently underway, recruiting patients with either recurrent ovarian cancer, mesothelioma or multiple myeloma. All of these trials are being performed at the Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA, with a common outcome: to determine the maximum tolerated dose of a modified Edmonston strain of measles virus genetically engineered to produce the human thyroid sodium iodide symporter (MV-NIS) [95]. All recruited patients must be seropositive for measles virus with a level of serum anti-measles IgG greater than 20 EU/mL. The multiple myeloma clinical trial presents the particularity of evaluating the beneficial role of cyclophosphamide, an immunomodulatory agent able to suppress immune response, in MV-NIS-treated patients, to improve the spread of virus in tumor cells.

6. Conclusions

Antitumor virotherapy is a promising strategy to treat cancer. The broad range of cancer types sensitive to attenuated MV, the relatively high safety of attenuated MV for vaccinating children, the high immunogenicity of MV, and progress in industrial virus production, make MV a very good candidate for the development of this strategy. Furthermore, MV can be engineered to express transgenes to increase its oncolytic efficiency, to allow tracking of viral replication *in vivo,* or to increase its immune-stimulatory effects.

Acknowledgements

The authors are 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.

References and Notes

1. Boisgerault, N.; Tangy, F.; Gregoire, M. New perspectives in cancer virotherapy: Bringing the immune system into play. *Immunotherapy* **2010**, *2*, 185 199.
2. Russell, S.J.; Peng, K.W.; Bell, J.C. Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 658 670.
3. Mogensen, T.H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 240 273, Table of Contents.
4. Banchereau, J.; Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **1998**, *392*, 245 252.

5. Bluming, A.Z.; Ziegler, J.L. Regression of burkitt s lymphoma in association with measles infection. *Lancet* **1971**, *2*, 105 106.
6. Pasquinucci, G. Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet* **1971**, *1*, 136.
7. Gauvrit, A.; Brandler, S.; Sapede-Peroz, 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 4892.
8. Guillerme, J.B.; Boisgerault, N.; Roulois, D.; Menager, J.; Combredet, C.; Tangy, F.; Fonteneau, J.-F.; Gregoire, M. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce plasmacytoid dendritic cell maturation and tumor antigen cross-presentation. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 1147 1158
9. Moss, W.J.; Griffin, D.E. Global measles elimination. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 900 908.
10. Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update). *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2001**, *76*, 249 251.
11. Enders, J.F.; Peebles, T.C. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1954**, *86*, 277 286.
12. Bankamp, B.; Takeda, M.; Zhang, Y.; Xu, W.; Rota, P.A. Genetic characterization of measles vaccine strains. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, S533 S548.
13. Schwarz, A.J. Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine. *Am. J. Dis. Child.* **1962**, *103*, 386 389.
14. Griffin, D.E.; Pan, C.H.; Moss, W.J. Measles vaccines. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 1352 1370.
15. World Health Organisation: Immunization, Vaccines and Biologicals: Measles. Available online: http://www.who.int/immunization/topics/measles/en/index.html/ (accessed on 24 April 2012).
16. Griffin, D. Measles virus. In *Field s Virology*; Knipe, D., Howley, P., Eds.; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, PA, USA, 2001; Volume 2, pp. 1401 1441.
17. Lievano, F.; Galea, S.A.; Thornton, M.; Wiedmann, R.T.; Manoff, S.B.; Tran, T.N.; Amin, M.A.; Seminack, M.M.; Vagie, K.A.; Dana, A.; *et al.* Measles, mumps, and rubella virus vaccine (m-m-rii): A review of 32 years of clinical and postmarketing experience. *Vaccine* **2012**, *30*, 6918 6926.
18. Parker Fiebelkorn, A.; Redd, S.B.; Gallagher, K.; Rota, P.A.; Rota, J.; Bellini, W.; Seward, J. Measles in the united states during the postelimination era. *J. Infect. Dis.* **2010**, *202*, 1520 1528.
19. Progress towards measles elimination in who s european region, 2005 2008. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2009**, *84*, 57 64.
20. Wolfson, L.J.; Strebel, P.M.; Gacic-Dobo, M.; Hoekstra, E.J.; McFarland, J.W.; Hersh, B.S. Has the 2005 measles mortality reduction goal been achieved? A natural history modelling study. *Lancet* **2007**, *369*, 191 200.
21. Hilleman, M.R. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine* **2001**, *20*, 651 665.
22. Hsu, E.C.; Iorio, C.; Sarangi, F.; Khine, A.A.; Richardson, C.D. Cdw150(slam) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* **2001**, *279*, 9 21.
23. Tatsuo, H.; Ono, N.; Tanaka, K.; Yanagi, Y. Slam (cdw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **2000**, *406*, 893 897.

24. Anderson, B.D.; Nakamura, T.; Russell, S.J.; Peng, K.W. High cd46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4919 4926.
25. Dorig, R.E.; Marcil, A.; Chopra, A.; Richardson, C.D. The human cd46 molecule is a receptor for measles virus (edmonston strain). *Cell* **1993**, *75*, 295 305.
26. Naniche, D.; Varior-Krishnan, G.; Cervoni, F.; Wild, T.F.; Rossi, B.; Rabourdin-Combe, C.; Gerlier, D. Human membrane cofactor protein (cd46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* **1993**, *67*, 6025 6032.
27. Liszewski, M.K.; Atkinson, J.P. Membrane cofactor protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1992**, *178*, 45 60.
28. 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*, 109 123.
29. Ravindranath, N.M.; Shuler, C. Expression of complement restriction factors (cd46, cd55 & cd59) in head and neck squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* **2006**, *35*, 560 567.
30. Peng, K.W.; TenEyck, C.J.; Galanis, E.; Kalli, K.R.; Hartmann, L.C.; Russell, S.J. Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4656 4662.
31. Noyce, R.S.; Bondre, D.G.; Ha, M.N.; Lin, L.T.; Sisson, G.; Tsao, M.S.; Richardson, C.D. Tumor cell marker pvrl4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002240.
32. Muhlebach, M.D.; Mateo, M.; Sinn, P.L.; Prufer, S.; Uhlig, K.M.; Leonard, V.H.; Navaratnarajah, C.K.; Frenzke, M.; Wong, X.X.; Sawatsky, B.; *et al.* Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* **2011**, *480*, 530 533.
33. Racaniello, V., Virology. An exit strategy for measles virus. *Science* **2011**, *334*, 1650 1651.
34. Mendelsohn, C.L.; Wimmer, E.; Racaniello, V.R. Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **1989**, *56*, 855 865.
35. Lopez, M.; Cocchi, F.; Menotti, L.; Avitabile, E.; Dubreuil, P.; Campadelli-Fiume, G. Nectin2alpha (prr2alpha or hveb) and nectin2delta are low-efficiency mediators for entry of herpes simplex virus mutants carrying the leu25pro substitution in glycoprotein d. *J. Virol.* **2000**, *74*, 1267 1274.
36. Derycke, M.S.; Pambuccian, S.E.; Gilks, C.B.; Kalloger, S.E.; Ghidouche, A.; Lopez, M.; Bliss, R.L.; Geller, M.A.; Argenta, P.A.; Harrington, K.M.; *et al.* Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: Potential role as a serum biomarker. *Am. J. Clin. Pathol.* **2010**, *134*, 835 845.
37. Takano, A.; Ishikawa, N.; Nishino, R.; Masuda, K.; Yasui, W.; Inai, K.; Nishimura, H.; Ito, H.; Nakayama, H.; Miyagi, Y.; *et al.* Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 6694 6703.
38. Fabre-Lafay, S.; Garrido-Urbani, S.; Reymond, N.; Goncalves, A.; Dubreuil, P.; Lopez, M. Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (tace)/adam-17. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 19543 19550.

39. Sugiyama, T.; Yoneda, M.; Kuraishi, T.; Hattori, S.; Inoue, Y.; Sato, H.; Kai, C. Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activation molecule as a novel oncolytic virus for breast cancer treatment. *Gene Ther.* **2012**, *20*, 338 347.
40. Boisgerault, N.; Fonteneau, J.F.; Gregoire, M. INSERM UMR892, Nantes, France. Unpublished work, 2011.
41. Parrula, C.; Fernandez, S.A.; Zimmerman, B.; Lairmore, M.; Niewiesk, S. Measles virotherapy in a mouse model of adult t-cell leukaemia/lymphoma. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 1458 1466.
42. Grote, D.; Russell, S.J.; Cornu, T.I.; Cattaneo, R.; Vile, R.; Poland, G.A.; Fielding, A.K. Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood* **2001**, *97*, 3746 3754.
43. Peng, K.W.; Ahmann, G.J.; Pham, L.; Greipp, P.R.; Cattaneo, R.; Russell, S.J. Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. *Blood* **2001**, *98*, 2002 2007.
44. Penheiter, A.R.; Wegman, T.R.; Classic, K.L.; Dingli, D.; Bender, C.E.; Russell, S.J.; Carlson, S.K. Sodium iodide symporter (nis)-mediated radiovirotherapy for pancreatic cancer. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2010**, *195*, 341 349.
45. Allen, C.; Opyrchal, M.; Aderca, I.; Schroeder, M.A.; Sarkaria, J.N.; Domingo, E.; Federspiel, M.J.; Galanis, E. Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells. *Gene Ther.* **2012**, *122*, 745 754.
46. Phuong, L.K.; Allen, C.; Peng, K.W.; Giannini, C.; Greiner, S.; TenEyck, C.J.; Mishra, P.K.; Macura, S.I.; Russell, S.J.; Galanis, E.C. Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2462 2469.
47. Iankov, I.D.; Msaouel, P.; Allen, C.; Federspiel, M.J.; Bulur, P.A.; Dietz, A.B.; Gastineau, D.; Ikeda, Y.; Ingle, J.N.; Russell, S.J.; *et al.* Demonstration of anti-tumor activity of oncolytic measles virus strains in a malignant pleural effusion breast cancer model. *Breast Cancer Res. Treat.* **2010**, *122*, 745 754.
48. McDonald, C.J.; Erlichman, C.; Ingle, J.N.; Rosales, G.A.; Allen, C.; Greiner, S.M.; Harvey, M.E.; Zollman, P.J.; Russell, S.J.; Galanis, E. A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2006**, *99*, 177 184.
49. Donnelly, O.G.; Errington-Mais, F.; Steele, L.; Hadac, E.; Jennings, V.; Scott, K.; Peach, H.; Phillips, R.M.; Bond, J.; Pandha, H.; *et al.* Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther.* **2011**, *20*, 7 15.
50. Meng, X.; Nakamura, T.; Okazaki, T.; Inoue, H.; Takahashi, A.; Miyamoto, S.; Sakaguchi, G.; Eto, M.; Naito, S.; Takeda, M.; *et al.* Enhanced antitumor effects of an engineered measles virus edmonston strain expressing the wild-type n, p, l genes on human renal cell carcinoma. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 544 551.
51. Li, H.; Peng, K.W.; Dingli, D.; Kratzke, R.A.; Russell, S.J. Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy. *Cancer Gene Ther.* **2010**, *17*, 550 558.
52. Hutzen, B.; Pierson, C.R.; Russell, S.J.; Galanis, E.; Raffel, C.; Studebaker, A.W. Treatment of medulloblastoma using an oncolytic measles virus encoding the thyroidal sodium iodide symporter shows enhanced efficacy with radioiodine. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 508.

53. Studebaker, A.W.; Kreofsky, C.R.; Pierson, C.R.; Russell, S.J.; Galanis, E.; Raffel, C. Treatment of medulloblastoma with a modified measles virus. *Neuro. Oncol.* **2010**, *12*, 1034 1042.
54. Boisgerault, N.; Guillerme, J.B.; Pouliquen, D.; Achard, C.; Mesel-Lemoine, M.; Combredet, C.; Fonteneau, J.F.; Tangy, F.; Gregoire, M. Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 387362.
55. Zhang, S.C.; Wang, W.L.; Cai, W.S.; Jiang, K.L.; Yuan, Z.W. Engineered measles virus edmonston strain used as a novel oncolytic viral system against human hepatoblastoma. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 427.
56. Tangy, F.; Naim, H.Y. Live attenuated measles vaccine as a potential multivalent pediatric vaccination vector. *Viral Immunol.* **2005**, *18*, 317 326.
57. Greiner, A.; Neumann, M.; Stingl, S.; Wassink, S.; Marx, A.; Riechert, F.; Muller-Hermelink, H.K. Characterization of wue-1, a novel monoclonal antibody that stimulates the growth of plasmacytoma cell lines. *Virchows. Arch.* **2000**, *437*, 372 379.
58. Hummel, H.D.; Kuntz, G.; Russell, S.J.; Nakamura, T.; Greiner, A.; Einsele, H.; Topp, M.S. Genetically engineered attenuated measles virus specifically infects and kills primary multiple myeloma cells. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 693 701.
59. Myers, R.; Greiner, S.; Harvey, M.; Soeffker, D.; Frenzke, M.; Abraham, K.; Shaw, A.; Rozenblatt, S.; Federspiel, M.J.; Russell, S.J.; *et al.* Oncolytic activities of approved mumps and measles vaccines for therapy of ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* **2005**, *12*, 593 599.
60. Galanis, E.; Hartmann, L.C.; Cliby, W.A.; Long, H.J.; Peethambaram, P.P.; Barrette, B.A.; Kaur, J.S.; Haluska, P.J., Jr.; Aderca, I.; Zollman, P.J.; *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*, 875 882.
61. Dingli, D.; Peng, K.W.; Harvey, M.E.; Greipp, P.R.; O Connor, M.K.; Cattaneo, R.; Morris, J.C.; Russell, S.J. Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. *Blood* **2004**, *103*, 1641 1646.
62. Brem, H.; Gresser, I.; Grosfeld, J.; Folkman, J. The combination of antiangiogenic agents to inhibit primary tumor growth and metastasis. *J. Pediatr. Surg.* **1993**, *28*, 1253 1257.
63. Le Bon, A.; Tough, D.F. Links between innate and adaptive immunity via type i interferon. *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, *14*, 432 436.
64. Berchtold, S.; Lampe, J.; Weiland, T.; Smirnow, I.; Schleicher, S.; Handgretinger, R.; Kopp, H.G.; Reiser, J.; Stubenrauch, F.; Mayer, N.; *et al.* Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J. Virol.* **2013**, *87*, 3484 3501.
65. Prestwich, R.J.; Ilett, E.J.; Errington, F.; Diaz, R.M.; Steele, L.P.; Kottke, T.; Thompson, J.; Galivo, F.; Harrington, K.J.; Pandha, H.S.; *et al.* Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 4374 4381.
66. Errington, F.; Steele, L.; Prestwich, R.; Harrington, K.J.; Pandha, H.S.; Vidal, L.; de Bono, J.; Selby, P.; Coffey, M.; Vile, R.; *et al.* Reovirus activates human dendritic cells to promote innate antitumor immunity. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 6018 6026.
67. Kepp, O.; Tesniere, A.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. The immunogenicity of tumor cell death. *Curr. Opin. Oncol.* **2009**, *21*, 71 76.

82. Fuertes, M.B.; Kacha, A.K.; Kline, J.; Woo, S.R.; Kranz, D.M.; Murphy, K.M.; Gajewski, T.F. Host type i ifn signals are required for antitumor cd8+ t cell responses through cd8{alpha}+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 2005 2016.
83. Drobits, B.; Holcmann, M.; Amberg, N.; Swiecki, M.; Grundtner, R.; Hammer, M.; Colonna, M.; Sibilia, M., Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pdcs into tumor-killing effector cells. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 575 585.
84. Liu, C.; Lou, Y.; Lizee, G.; Qin, H.; Liu, S.; Rabinovich, B.; Kim, G.J.; Wang, Y.H.; Ye, Y.; Sikora, A.G.; *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 1175.
85. 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 3722.
86. Tel, J.; Aarntzen, E.H.; Baba, T.; Schreibelt, G.; Schulte, B.M.; Benitez-Ribas, D.; Boerman, O.C.; Croockewit, S.; Oyen, W.J.; van Rossum, M.; *et al.* Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific t-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1063 1075
87. Grote, D.; Cattaneo, R.; Fielding, A.K. Neutrophils contribute to the measles virus-induced antitumor effect: Enhancement by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6463 6468.
88. Liu, C.; Russell, S.J.; Peng, K.W. Systemic therapy of disseminated myeloma in passively immunized mice using measles virus-infected cell carriers. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 1155 1164.
89. Mader, E.K.; Maeyama, Y.; Lin, Y.; Butler, G.W.; Russell, H.M.; Galanis, E.; Russell, S.J.; Dietz, A.B.; Peng, K.W. Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7246 7255.
90. Heo, J.; Reid, T.; Ruo, L.; Breitbach, C.J.; Rose, S.; Bloomston, M.; Cho, M.; Lim, H.Y.; Chung, H.C.; Kim, C.W.; *et al.* Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia jx-594 in liver cancer. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 329 336.
91. Taqi, A.M.; Abdurrahman, M.B.; Yakubu, A.M.; Fleming, A.F. Regression of Hodgkin s disease after measles. *Lancet* **1981**, *1*, 1112.
92. Zygiert, Z., Hodgkin s disease: Remissions after measles. *Lancet* **1971**, *1*, 593.
93. Ziegler, J.L. Spontaneous remission in burkitt s lymphoma. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **1976**, *44*, 61 65.
94. Heinzerling, L.; Kunzi, V.; Oberholzer, P.A.; 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 2294.
95. ClinicalTrials.gov. Available online: http://www.clinicaltrials.gov/ (accessed on 12 December 2012).

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

XII. Annexe 2: "Attenuated measles virus used as an oncolytic virus activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells

OncoImmunology 2:5, e24212; May 2013; © 2013 Landes Bioscience

Attenuated measles virus used as an oncolytic virus activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells

Jean-François Fonteneau,[1,2,3,*] Jean-Baptiste Guillerme,[1,2,3] Frédéric tangy[4] and Marc Grégoire[1,2,3]

[1]INser M; u Mr 892; Nantes, France; [2]CNr s; u Mr 6299; Nantes, France; [3]u niversité de Nantes; Nantes, France; [4]CNr s; u r A3015; Institut Pasteur; unité de Génomique Virale et Vaccination; Paris, France

Keywords: oncolytic virus, measles virus vaccine, plasmacytoid DC, myeloid DC, cytotoxic CD8+ T cell, tumor antigen

Attenuated measles viruses (MV) are assessed in clinical trials for their capacity to preferentially infect and kill tumor cells. we recently showed that MV-infected tumor cells are able to activate tumor antigen cross-presentation by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. t hus, MV-based antitumor virotherapy may stimulate antitumor immune response.

Antitumor virotherapy using oncolytic viruses (OV) is currently assessed in numerous clinical trials.[1] This therapeutic approach consists of the use of attenuated and/or genetically modif ed replication-competent virus to preferentially infect and kill tumor cells, with limited infection, if any, of healthy cells.

Among the different oncolytic viruses, vaccine-attenuated strains of measles virus (MV) are promising candidates for cancer therapy.[2] MV is an enveloped and negative, non-segmented, single-strand RNA virus belonging to the Morbillivirus genus of the Paramyxoviridae family. Attenuated MV strains use the CD46 molecule as a main entry receptor into cells.[3] This molecule negatively regulates the complement system and is frequently overexpressed by tumor cells to escape lysis by the complement system.[4] Thus, MV oncolytic activity has been reported for numerous types of human cancers in vitro, and in immunodef cient mouse models of human tumor xenografts.[2] Phase I clinical trials of anti-tumor virotherapy using "Edmonston" attenuated strain of MV are currently underway for ovarian cancer, glioma, myeloma, mesothelioma and squamous cell cancer of the head and neck.[1]

The antitumor activity of MV attenuated strains is due to their ability to preferentially infect and kill tumor cells. In addition, the capacity of MV-infected tumor cells to activate cells from the immune response, especially dendritic cells (DC), may also play a role. Indeed, we previously reported that mesothelioma tumor cells infected by the Schwarz attenuated strain of MV are able to induce monocyte-derived DC (Mo-DC) maturation in vitro, while UV-irradiated tumor cells are not.[5] This maturation is induced by danger-associated molecular patterns (DAMP) released by MV-infected tumor cells, since the MV alone is not able to induce maturation of Mo-DC. We also showed that MV-infected tumor cells express the heat-shock proteins (HSP) HSP70 and gp96, which are not expressed by UV-irradiated tumor cells. These HSP could be at least partially responsible for Mo-DC maturation. Finally, we observed that Mo-DC exposed to MV-infected tumor cells, but not UV-irradiated ones, cross-prime a CD8+ T lymphocyte response specif c for mesothelin, a tumor-associated antigen (TAA) expressed by mesothelioma tumor cells. Similar results were reported by Donnelly et al., who showed that melanoma tumor cells infected by the Edmonston strain of MV are able to activate Mo-DC, that can then cross-prime a CD8+ T lymphocyte response with a cytotoxic activity against melanoma tumor cells.[6] Moreover, they observed that MV-infected melanoma tumor cells release DAMP such as HMGB1, or inf ammatory cytokines such as Type I IFN (IFNα and IFNβ), IL-6 and IL-8, which participate in Mo-DC maturation. Altogether, these studies show that MV infection of tumor cells induce an immunologic cell death capable of stimulating myeloid DC, notably their capacity to cross-prime antitumoral T cell responses.

We extended our study by looking at the effects of MV-infected tumor cells on plasmacytoid DC (pDC).[7] This subset of DC is also known as IFN-producing cells, which produce a huge quantity of Type I IFN (IFNα, IFNβ, IFNω) when exposed to viruses, notably Inf uenza virus, Herpes Simplex virus and HIV.[8] Their expression of Toll-like receptors (TLR), in particular TLR-7 and TLR-9, allow them to detect viral nucleic acids. They also participate to the activation of NK and T cell responses. In cancer immunotherapy, there is an increasing interest for immunostimulatory molecules, such as CpG and Imiquimod, which are able to activate myeloid DC and/or pDC.[9]

*Correspondence to: Jean-François Fonteneau; Email: jean-francois.fonteneau@inserm.fr
Submitted: 03/01/13; Accepted: 03/06/13
Citation: Fonteneau J-F, Guillerme J-B, Tangy F, Gregoire M. Attenuated measles virus used as an oncolytic virus activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells. OncoImmunology 2013; 2:e24212; http://dx.doi.org/10.4161/onci.24212

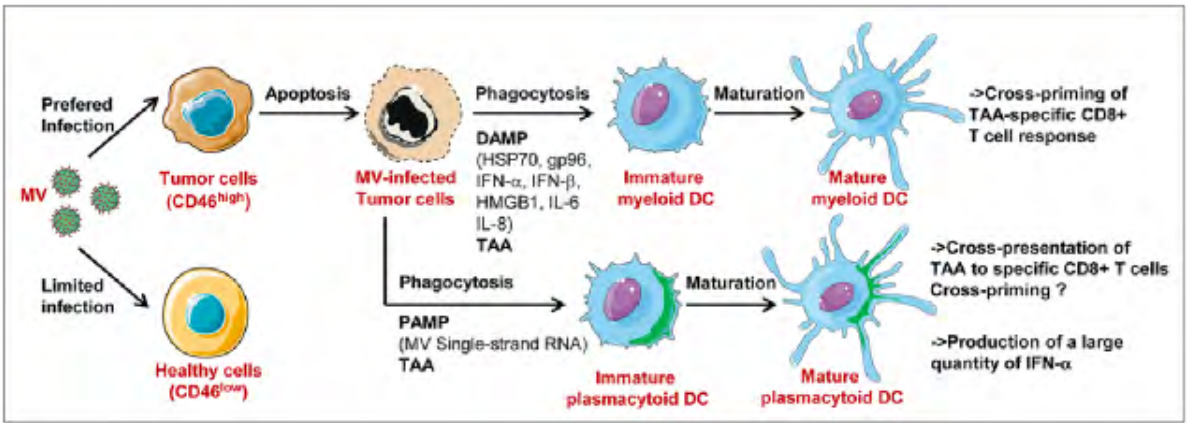


Figure 1. Attenuated measles virus (MV) antitumoral virotherapy activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells, notably their capacity to cross-present tumor-associated antigens (tAA): MV preferentially infects tumor cells due to their overexpression of CD46. MV-infected tumor cells are lysed. They induce maturation of myeloid DC, mainly by DAMP expression (hsP70, gp96, IFNα, IFNβ, hMGB1, IL-6, IL-8), and maturation of plasmacytoid DC, mainly by MV single-strand rNA, a pathogen associated molecular pattern (PAMP) that triggers tLr7 expressed by pDC. DC internalized fragments of MV-infected tumor cells and cross-present tAA to specific CD8+ T cells. It has been demonstrated for myeloid DC that this cross-presentation can result in cross-priming, whereas this has not been demonstrated for pDC. pDC also produce large amount of IFN-α in response to tumor infected cells. This figure has been made using servier Medical Art.

In our recent in vitro study, we showed using the Schwarz strain of MV engineered to express the enhanced-green fluorescent protein that MV does not infect pDC, whereas it infects and kills different tumor cell lines (melanoma, mesothelioma and lung adenocarcinoma).[7] We also observed that pDC exposed to MV-infected tumor cells express the maturation marker CD83, and produce huge amounts of IFNα. This IFNα production can be completely inhibited by the use of the TLR-7 specific inhibitor IRS661. Thus pDC activation is probably due to the triggering of TLR-7 by MV single-strand RNA. IFNα, and more generally Type I IFN, have positive effects on the antitumor immune response.[10] By confocal microscopy and flow cytometry, we observed that pDC internalized fragments of MV-infected tumor cells. To determine if this internalization allowed pDC to cross-present tumor antigens, we used a CD8+ T cell clone obtained from a melanoma tumor biopsy and specific for a peptide of New York esophageal-1 squamous cell carcinoma antigen (NY-ESO-1) presented in the HLA-A*0201 context. NY-ESO-1 is a TAA expressed by different types of cancer and not expressed by normal tissue except testis. We showed that HLA-A*0201pos pDC exposed to HLA-A*0201neg/NY-ESO-1pos melanoma tumor cells are able to activate IFN-γ production by the NY-ESO-1 specific CD8+ T cell clone. A similar cross-presentation was observed with mo-DC. In contrast, UV-irradiated tumor cells were not able to induce NY-ESO-1 cross-presentation by pDC or Mo-DC, nor IFNα production by pDC.

Taken together, these results show that attenuated strains of MV induce an immunogenic cell death of tumor cells capable of activating myeloid and plasmacytoid DC (Fig. 1). It also allows the release of tumor antigens for cross-presentation by both subsets of DC. Thus, attenuated MV are promising antitumor agents with interesting effects on the antitumor immune response.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

1. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. Nat Biotechnol 2012; 30:658-70; PMID:22781695; http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2287
2. Guillerme JB, Gregoire M, Tangy F, Fonteneau JF. Antitumor virotherapy by attenuated measles virus (MV). Biology 2013; 2:587-602; http://dx.doi.org/10.3390/biology2020587
3. 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; PMID:15256464; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0884
4. 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; PMID:12914817; http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890(03)00112-3
5. Gauvrit A, Brandler S, Sapede-Peroz 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; PMID:18559536; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6265
6. 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; PMID:22170342; http://dx.doi.org/10.1038/gt.2011.205
7. Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, Ménager J, Combredet C, Tangy F, et al. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. Clin Cancer Res 2013; 19:1147-58; PMID:23339127; http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2733
8. 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; PMID:18641647; http://dx.doi.org/10.1038/nri2358
9. Tel J, van der Leun AM, Figdor CG, Torensma R, de Vries IJ. Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. Cancer Immunol Immunother 2012; 61:1279-88; PMID:22294456; http://dx.doi.org/10.1007/s00262-012-1210-z
10. Aricò E, Belardelli F. Interferon-α as antiviral and antitumor vaccine adjuvants: mechanisms of action and response signature. J Interferon Cytokine Res 2012; 32:235-47; PMID:22490303; http://dx.doi.org/10.1089/jir.2011.0077

XIII. Annexe 3: Brevet MV-ΔC

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

European Patent Office
Postbus 5818
2280 HV RIJSWIJK
NETHERLANDS
Tel. +31 (0)70 340-2040
Fax +31 (0)70 340-3016

For any questions about this communication:
Tel.:+31 (0)70 340 45 00

Guillerme, Jean-Baptiste
50, rue Niclos Appert
44100 Nantes
FRANCE

Date
19.03.13

Reference	Application No./Patent No.
	13305086.4 - 1403
Applicant/Proprietor	
INSTITUT PASTEUR, et al	

Designation as inventor - communication under Rule 19(3) EPC

You have been designated as inventor in the above-mentioned European patent application. Below you will find the data contained in the designation of inventor and further data mentioned in Rule 143(1) EPC:

DATE OF FILING : 24.01.13

PRIORITY : / /

TITLE : Use of a genetically modified infectious measles virus with enhanced pro-apoptotic properties (MV-Deltac virus)

DESIGNATED STATES : AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR

INVENTOR (PUBLISHED = 1, NOT PUBLISHED = 0):

1/Tangy, Frédéric/60, rue du Garde Chasse/93260 Les Lilas/FR
1/Grégoire, Marc/40, rue de la Gaudinière/44300 Nantes/FR
1/Fonteneau, Jean-François/2, rue Pierre Audige/44000 Nantes/FR
1/Guillerme, Jean-Baptiste/50, rue Niclos Appert/44100 Nantes/FR
1/Combredet, Chantal/124, avenue de Villiers/75017 Paris/FR

DECLARATION UNDER ARTICLE 81 EPC:
The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent as employer(s).

Receiving Section

Europäisches Patentamt • European Patent Office • Office européen des brevets

EPO Form 1048 10.09

Étude des propriétés cytotoxiques et immuno-adjuvantes du virus oncolytique de la rougeole

Le virus atténué de la rougeole est proposé comme agent oncolytique pour infecter et lyser les cellules tumorales sans affecter les cellules saines. Les propriétés immuno-adjuvantes du virus pourraient aussi contribuer à l'efficacité de la virothérapie anti-tumorale. Dans cette étude nous avons évalué les propriétés cytotoxiques et immuno-adjuvantes du virus oncolytique de la rougeole (MV). Dans une première étude, nous avons démontré que le MV infecte et tue efficacement des lignées d'adénocarcinome pulmonaire et de carcinome colorectal *in vitro* et *in vivo*, dans des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines sur des souris immunodéficientes. Dans une seconde étude, je me suis intéressé aux propriétés immuno-adjuvantes du MV sur les cellules dendritiques plasmacytoides (pDC). Après avoir mis au point l'obtention et la culture des pDC humaines dans le laboratoire, j'ai démontré que les cellules tumorales infectées induisent la maturation des pDC et une large production d'IFN-α. En utilisant un inhibiteur spécifique, j'ai mis en évidence que cette production d'IFN-α est due à l'engagement du Toll-Like Receptor 7 (TLR-7) probablement par l'ARN simple brin du MV. Enfin, j'ai montré que les pDC sont capables de réaliser, à partir des cellules tumorales infectées, la présentation croisée de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 à un clone de lymphocyte T CD8+ spécifique à un niveau équivalent aux cellules dendritiques dérivées de monocytes (Mo-DC). Ces résultats suggèrent que l'utilisation du MV en virothérapie anti-tumorale induit une mort cellulaire immunogène permettant la maturation, la sécrétion de grandes quantités d'IFN-α, et la cross-présentation d'antigènes par les pDC.

Mots-Clés : Virus Oncolytique - Virus de la Rougeole - Virothérapie - Cellules dendritiques plasmacytoïdes - IFN-α - TLR7 - Cross-présentation.

Study of cytotoxicity and immuno-adjuvant properties of oncolytic Measles virus

Live attenuated and replicative competent measles virus (MV) has been proposed to specifically infect and kill tumor cells without, or limited if any, infection of healthy counterparts. Immuno-adjuvant properties of MV may also have a beneficial role on virotherapy efficacy. Here, we studied cytotoxicity and immuno-adjuvant properties of MV. In a first study, we showed that MV efficiently infects and kills pulmonary and colorectal adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*, in a human tumor xenografts model in immunodeficient mice. In a second study, I focused on MV immuno-adjuvant properties on pDC. I developed sorting and culture of human pDC in our laboratory. Then, I showed that MV-infected tumor cells induce pDC maturation and large production of IFN-α. Using a specific inhibitor, I demonstrated that IFN-α production was due to Toll-like Receptor 7 (TLR7) triggering probably by MV single stranded ARN. Finally, I showed that pDC cross-present NY-ESO-1 tumor antigen to a specific CD8+ T cell clone, from MV-infected tumor cells, at a similar level than monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC). Altogether, this work suggests 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 antigens.

Keywords : Oncolytic Virus - Measles Virus - Virotherapy - Plasmacytoid dendritic cells - IFN-α - TLR7 - Cross-presentation.