
UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS DIAGNOSTIQUES ET D'APPROCHES THÉRAPEUTIQUES POUR LE MÉSOTHÉLIOME PLEURAL MALIN

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Chimie - Biologie
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Immunologie - Cancérologie

présentée et soutenue publiquement par

Carole SAPEDE-PEROZ

le 30 avril 2008, devant le jury ci-dessous

Président : Mme COPIN Marie-Christine, Professeur des Universités, Centre de Biologie-Pathologie de Lille

Rapporteurs : Mme COPIN Marie-Christine, Professeur des Universités, Centre de Biologie-Pathologie de Lille
M. SCHERPEREEL Arnaud, Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier, CHRU de Lille

Examineur : M. GUILLOUX Yannick, Maître de Conférences des Universités, INSERM U892 Nantes

Directeur de thèse : M. GREGOIRE Marc, Directeur de Recherche, INSERM U892 Nantes

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	6
INTRODUCTION.....	8
I. Le mésothéliome pleural malin.....	8
I. 1. Définition et situation anatomique.....	8
I. 2. Données épidémiologiques.....	9
I. 3. Facteurs étiologiques et mécanismes pathogéniques.....	10
I.3.1. Les fibres minérales.....	10
I.3.2. Le virus SV40.....	12
I.3.3. Autres facteurs étiologiques.....	13
I.3.4. Mécanismes moléculaires	14
I. 4. Etablissement du diagnostic.....	17
I.4.1. Analyses immunocytochimiques.....	17
I.4.2. Analyses immunohistochimiques.....	17
I.4.3. Dosage de marqueurs solubles.....	19
I.4.3. a) Dosage de formes solubles de la mésothéline.....	20
I.4.3. b) L'ostéopontine.....	21
I.4.3. c) Autres marqueurs.....	22
I. 5. Modalités thérapeutiques.....	23
I.5.1. Les traitement conventionnels.....	23
I.5.1. a) La chirurgie.....	23
I.5.1. b) La chimiothérapie.....	24
I.5.1. c) La radiothérapie.....	25
I.5.1. d) L'approche dite multimodale.....	25
I.5.2. Les nouvelles stratégies	26
I.5.2. a) Les nouvelles molécules.....	26
I.5.2. b) La thérapie génique.....	28
I.5.2. c) La virothérapie.....	30
I.5.2. d) L'immunothérapie.....	30
II. L'immunité anti-tumorale.....	33
II.1 Emergence d'une théorie: de l'immunosurveillance à l'immunoédition.....	33
II.2 Les effecteurs de la surveillance immunitaire anti-tumorale.....	35
II. 2. 1. L'immunité innée.....	36
II. 2. 2. Les cellules dendritiques.....	36
II. 2. 2. a. Les différentes populations de DC	36

II. 2. 2. b. Capacités de migration des DC.....	38
II. 2. 2. c. Capture des antigènes et intégration des signaux environnementaux.....	39
II. 2. 2. d. Apprêtement et présentation des antigènes.....	41
II. 2. 2. f. Activation ou maturation des DC.....	45
II. 2. 2. g. Activation des effecteurs par les DC.....	46
II. 2. 3. Les lymphocytes T cytotoxiques.....	49
II. 2. 3. a. Activation des cellules T CD8, synapse immunologique et signaux d'activation..	49
II. 2. 3. b. Mécanismes d'action des lymphocytes T cytotoxiques.....	50
II. 2. 4. Les autres cellules effectrices de l'immunité anti-tumorale adaptative.....	53
II.3 Les antigènes de tumeurs	56
II.3.1 Groupe I : Les antigènes spécifiques de patients.....	57
II.3.2 Groupe II : Les antigènes spécifiques de tumeurs.....	57
II.3.3 Groupe III : Les antigènes partagés à expression tissulaire restreinte.....	58
II.3.4 Groupe IV : Antigènes de différenciation (MSLN) et sur-exprimés (MUC-1).....	58
II.4 Les mécanismes d'échappement à la réponse antitumorale.....	62
II. 4. 1 Vue d'ensemble des mécanismes d'échappement.....	62
II. 4. 1. a) Diminution de la présentation des antigènes tumoraux.....	62
II. 4. 1. b) Echappement à la lyse.....	63
II. 4. 1. c) Induction d'une tolérance.....	64
II. 4. 2 Les mécanismes d'échappement développés par le MPM.....	66
OBJECTIFS.....	68
RESULTATS.....	69
I. Amélioration des outils diagnostiques disponibles.	69
I.1. Etablissement de lignées de MPM et identification d'antigènes.....	69
I.2. Mécanismes impliqués dans la production de formes solubles de la MSLN.....	80
II. Stratégies d'immunothérapies.....	89
II.1. Immunogénicité des DC ayant phagocyté des cellules tumorales apoptotiques stressées par un choc thermique.....	90
II. 2. Immunogénicité de DC ayant phagocyté des cellules tumorales apoptotiques préalablement infectées par le virus de la rougeole (MV).....	101
III. Isolement de clones de lymphocytes T CD8 dirigés contre des épitopes de MUC-1 et de MSLN	129
CONCLUSIONS.....	145
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	146
ANNEXES.....	169
Séquences protéiques des différents variants de la MSLN.....	169
Séquence protéique de MUC-1.....	170

Liste des figures

Figure 1: Représentation de la plèvre.....	8
Figure 2: Estimation de l'incidence du mésothéliome dans le monde.....	10
Figure 3: Principales caractéristiques biologiques des cellules de mésothéliome.....	16
Figure 4: Processus de maturation de la mésothéline.....	20
Figure 5: Les trois phases de l'immunoédition.....	35
Figure 6: Voies d'ontogenèse à l'origine des DC.....	38
Figure 7: Origines possibles des peptides présentés sur les molécules du CMH de classe I.....	43
Figure 8: Les différentes voies de présentation utilisées par les DC.....	44
Figure 9: Théories de polarisation Th1/Th2 par les DC.....	47
Figure 10 : Mécanismes d'action des CTL.....	52
Figure 11 : Implication des lymphocytes T CD4 dans l'élimination des tumeurs.....	54
Figure 12: Implication des lymphocytes B dans l'immunité anti-tumorale.....	55
Figure 13: Classification des antigènes de tumeur reconnus par les CTL.	56
Figure 14: Représentation schématique de la protéine MUC-1.....	60
Figure 15 : Analyse morphologiques des cellules tumorales obtenues par élutriation.....	71
Figure 16 : Caractérisation immunocytochimique des cellules mises en culture.....	72
Figure 17: Exemples de PCR réalisées sur des lignées de MPM et des lignées contrôles.....	74
Figure 18: Caractérisation de l'expression de MUC-1 par les lignées.....	77
Figure19: Les différents variants de la mésothéline.....	81
Figure 20: Zymographie réalisée sur les surnageants de culture des lignées de MPM.....	83
Figure 21: Fractions obtenues après élutriation des PBMCs.....	135
Figure 22 : Contrôle de la maturation des DC.....	136
Figure 23: Caractérisation des lymphocytes obtenus après tri sur colonne.....	136
Figure 24 : Détection des lymphocytes T CD8 spécifiques des peptides de MUC-1 et MSLN.....	137
Figure 25: Dosage du TNFalpha dans les surnageants de co-culture CD8 / T2.....	138
Figure 26: Confirmation des puits par analyse de la sécrétion d'IFN gamma.....	138
Figure 27: Marquage V beta des CD8.....	139
Figure 28: Expression de MUC-1 par les cellules tumorales.....	140
Figure 29 : Test d'activation des clones 8 et K7.2 contre les lignées tumorales.....	141

Liste des tableaux

Tableau 1: Arguments en faveur ou en défaveur du rôle du SV40 dans l'étiologie du MPM.....	13
Tableau 2: Marqueurs disponibles pour le diagnostic immunohistochimique du mésothéliome.....	18
Tableau 3: Molécules en cours d'étude clinique pour le traitement du MPM.....	27
Tableau 4: Epitopes de la MSLN pour lesquels des CTL spécifiques ont été décrits.....	59
Tableau 5: Epitopes de MUC-1 pour lesquels des CTL spécifiques ont été décrits.....	61
Tableau 6: Mécanismes de résistance à la réponse immunitaires décrits pour le mésothéliome.....	67
Tableau 7: Marquages des marquages des différentes lignées de MPM.....	73
Tableau 8: Résultats des PCR.....	75
Tableau 9: Caractéristiques des amorces utilisées.....	75
Tableau 10: Informations concernant les épitopes de MUC-1 et de la MSLN étudiés.....	129
Tableau 11: Expression de MUC-1 et restriction HLA des 3 lignées d'adénocarcinome.....	140
Tableau 12: Affinité du peptide MUC-1(950-958) pour différentes molécules HLA.....	142

ABREVIATIONS

a.a.: acides aminés
ADAMs: A disintegrin and metalloproteinase domain
ADNc: ADN complémentaires
AAT: antigènes associés aux tumeurs

β2M: Beta2-microglobuline
bFGF: basic Fibroblast Growth Factor
bp: paires de bases
BSA: Bovine Serum Albumine

CA: Carbohydrate Antigen (CA 15-3, CA 19-9, CA-125)
CCR: Chemokine CC-motif Receptor
CEA: CarcinoEmbryonic Antigen
CK 5/6: Cytokeratines 5 et 6
CLR: C-type Lectin Receptors
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CP: présentation croisée
CPA: Cellules Présentatrices d'Antigènes
CR: Récepteurs au complément
CTL: Lymphocyte T cytotoxique

DC: cellules dendritiques

EGF: Epidermal Growth Factor
EMA: Epithelial Membrane Antigen

Fas-L: ligand de Fas
FcR: Récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines
FGF: Fibroblast Growth Factor
FLIP (FLICE inhibitory Protein)

GPI: GlycosylPhosphatidyl Inositol
GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor

HLA: Human Leucocyte Antigen
HSP: Heat Shock Proteins
HSV: Herpes virus simplex
HSVtk: thymidine kinase de l'herpes virus simplex

IFN: Interferon
Ig: immunoglobuline
IL: Interleukine

MAGE: Melanoma Antigen
MICA/B: MHC class I-related Chain A/B
MMP: matrix metalloroteinases
MoDC : Monocyte-derived dendritic cells
MPM: Mésothéliome Pleural Malin
MSLN: Mésothéline
MUC: Mucine
MV: Measles Virus (virus de la rougeole)

NK: Natural Killer
NKG2D: Natural Killer Group protein 2 D

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS: Phosphate Buffered Saline
pCMH: peptide-molécule du CMH

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PRR : Pattern Recognition Receptor

RCAS1: Receptor-binding Cancer Antigen expressed on SiSo cells 1

rpm: rotations par minute

SMRP: Soluble Mesothelin Related Proteins

SR: Scavenger Receptor

SV: Simian Virus

SVF: Sérum de Veau Fétal

TAP: Transporter associated with Antigen Processing

TERT: TElomerase Reverse Transcriptase

TGF β : Transforming Growth Factor beta

TLR: Toll-Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

Treg: lymphocyte T régulateur

UV: Ultra-Violet

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats

WT-1: Wilms' tumor 1 gene

INTRODUCTION

I. Le mésothéliome pleural malin

I. 1. Définition et situation anatomique

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

La plèvre est constituée d'un double feuillet qui isole les poumons de la paroi interne du thorax (figure 1, page 8). Ces deux feuillets, dont l'un adhère à la paroi thoracique (feuillet pariétal), et l'autre au poumon (feuillet viscéral), délimitent un espace : la cavité pleurale. La mono-couche de cellules mésothéliales qui tapissent chacun des deux feuillets produit un liquide aux propriétés surfactantes (Mutsaers, 2004). La présence de ce liquide pleural autorise le glissement des deux feuillets l'un sur l'autre lors des mouvements respiratoires.

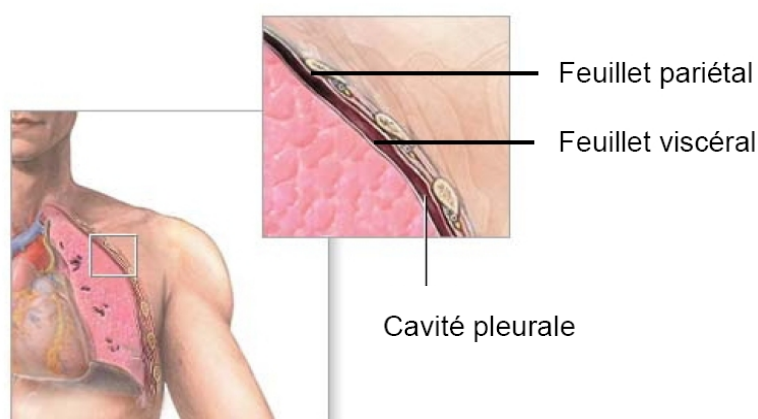


Figure 1: Représentation de la plèvre.

Dans les conditions physiologiques, l'espace pleural délimité par les deux feuillets (viscéral et pariétal) est quasiment virtuel et ne contient que peu de liquide pleural. Source: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100008_1.htm

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

I. 2. Données épidémiologiques

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

L'utilisation massive de l'amiante et de ses dérivés dans différents secteurs de l'industrie et du bâtiment à partir du début du XXème ainsi que l'application tardive des mesures d'interdiction concernant l'utilisation de l'amiante (1997 en France) ont abouti à des expositions importantes à ces fibres dans de nombreux secteurs d'activités. De plus, le délai qui sépare l'exposition de la survenue d'un mésothéliome est long (30 à 40 ans). L'ensemble de ces facteurs explique l'augmentation constante de l'incidence du MPM dans les pays industrialisés depuis les années 1960 (figure 2, page 10) (Bianchi & Bianchi, 2007; Montanaro et al., 2003).

Une étude récente prédisait un doublement du nombre de décès annuel en Europe d'ici 2020 (incidence annuelle estimée en France en 2020 : 2000 cas par an) (Peto et al., 1999). Toutefois, cette équipe a par la suite étudié les données cliniques devenues disponibles pour les années 1995 à 1999 et il s'est avéré que l'incidence réelle était inférieure à leurs prévisions (Pelucchi et al., 2004). Malgré tout, on s'attend à voir apparaître de plus en plus de cas de MPM au cours des prochaines décennies.



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

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

I. 3. Facteurs étiologiques et mécanismes pathogéniques

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

I.3.1. Les fibres minérales

Comme nous l'avons déjà vu, la relation entre une exposition aux fibres d'amiante et l'apparition d'un MPM est connue depuis plus de 50 ans déjà (Wagner *et al.*, 1960). Les fibres d'amiante sont des minéraux aux propriétés physiques et chimiques exceptionnelles : ils ne brûlent pas, résistent remarquablement à diverses agressions chimiques et présentent une résistance mécanique élevée à la traction. Ces propriétés ont favorisé le développement de l'utilisation des fibres d'amiante (serpentes et amphiboles) sous de multiples formes, que ce soit pour la fabrication de nombreux produits industriels de grande consommation ou dans la construction des bâtiments.

Des expositions naturelles sont également possibles. En Turquie, des populations exposées à l'érionite, une fibre minérale naturelle reconnue comme cancérigène depuis plusieurs années (IARC-1 et IARC-2), présentent des taux de MPM très importants (Metintas *et al.*, 2002).

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

- La longueur et l'épaisseur des fibres influent sur leur pouvoir cancérigène. Il semblerait qu'un ratio longueur / diamètre élevé soit favorable à la pénétration des fibres dans la cavité pleurale et donc au développement ultérieur d'un mésothéliome (Dodson *et al.*, 2003; Zucali & Giaccone, 2006).
- Les fibres d'amiantes sont capables d'interagir de manière directe avec les chromosomes des cellules. Elles interfèrent ainsi avec le processus de mitose, générant des modifications importantes dans le caryotype des cellules (aneuploïdie, réarrangements chromosomiques) (Ault *et al.*, 1995; Lechner *et al.*, 1985; Yegles *et al.*, 1993). Certaines de ces modifications sont fréquemment rencontrées et semblent nécessaires au développement du MPM (Sandberg & Bridge, 2001).
- Des dérivés oxygénés ou des radicaux libres formés par oxydoréduction à la surface de la fibre ou au cours de processus de phagocytose exerceraient un effet génotoxique (rupture de l'ADN et mutations) sur les cellules (Dong *et al.*, 1994; Jaurand, 1997; Kamp *et al.*, 1992; Upadhyay & Kamp, 2003).
- Enfin, les fibres d'amiantes entraînent la phosphorylation de certaines MAPK (Mitogen-Activated protein kinases), notamment ERK1 et ERK2 (extracellular signal-regulated kinases 1 et 2) (Berken *et al.*, 2003; Zanella *et al.*, 1996). La phosphorylation des protéines ERK induit l'activation du programme de division cellulaire.

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

I.3.2. Le virus SV40

Le SV40 (Simian Virus 40) appartient à la famille des *Papovaviridae*. Son rôle éventuel dans le développement du mésothéliome est très controversé, et ce, depuis de nombreuses années. Le débat quant au rôle du SV40 dans l'oncogenèse du MPM reste ouvert puisque certains arguments semblent indiquer que le SV40 est impliqué dans l'étiologie du MPM tandis que d'autres indiquent le contraire (tableau 1, page 13). Il est aussi envisageable que ce virus intervienne en tant que co-facteur facilitant la mutagenèse de l'amiante en cas d'une double exposition.

Arguments positifs	Arguments négatifs
Le SV40 induit l'immortalisation et la transformation maligne de cellules humaines (Carbone <i>et al.</i>, 2003b). Les cellules mésothéliales sont très sensibles à une transformation par le SV40 : elles sont peu lysées et la fréquence de transformation est élevée) (Bocchetta <i>et al.</i>, 2000; Carbone <i>et al.</i>, 2003a). Action sur la transformation des cellules via la protéine Tag (large T antigen) qui inactive des protéines inhibitrices de tumeur (protéine p53 et la protéine du rétinoblastome (pRb)) ou encore d'induire l'activité télomérase (Carbone <i>et al.</i>, 1997; Foddis <i>et al.</i>, 2002).	Certaines études incriminant le SV40 dans l'étiologie du MPM sont basées sur des modèles animaux (Cicala <i>et al.</i>, 1993). Or, le type cellulaire et l'espèce à laquelle appartiennent les cellules modifient considérablement l'impact de l'infection virale. Il paraît donc difficile de se fier à de telles expérimentations pour affirmer ou infirmer le rôle éventuel du SV40 en tant que facteur responsable de l'apparition du MPM.
De nombreuses personnes ont pu être infectées par ce virus de par l'utilisation entre 1955 et 1963 de vaccins antipoliomyélitiques contaminés et ce, dans de nombreux pays.	La prévalence des personnes contaminées n'est pas clairement établie à ce jour (Gazdar <i>et al.</i>, 2002). La cohorte de personnes potentiellement infectées correspond à celle qui développe des MPM, mais il s'agit aussi d'une population exposée à l'amiante. Aucune étude n'a apporté la preuve irréfutable de l'implication du SV40 dans le développement d'un MPM chez ces personnes (Leithner <i>et al.</i>, 2006).
Depuis les années 1970, la présence de séquences de l'ADN ou de produits de gènes du SV40 a été fréquemment détectée dans différents types de tumeurs humaines, et en particulier dans le mésothéliome (Carbone <i>et al.</i>, 2003b; Gazdar <i>et al.</i>, 2002).	Certaines équipes n'ont pas pu mettre en évidence la présence du SV40 dans les tumeurs (Carbone <i>et al.</i>, 2003b; Jasani <i>et al.</i>, 2001). L'existence de faux positifs et de faux négatifs peuvent expliquer les divergences observées (les différentes techniques ne sont pas équivalentes) (Jasani <i>et al.</i>, 2001; Leithner <i>et al.</i>, 2006; López-Ríos <i>et al.</i>, 2004; Pilatte <i>et al.</i>, 2000).

Tableau 1: Arguments en faveur ou en défaveur du rôle du SV40 dans l'étiologie du MPM.

Compte tenu des différents arguments, il semble difficile de conclure quant à la véritable implication du SV40 dans le développement du MPM. Aucune preuve irréfutable qui permettrait d'exclure le SV40 des facteurs étiologiques ou au contraire d'affirmer qu'il en fait partie n'a été apportée.

I.3.3. Autres facteurs étiologiques

Certaines anomalies génétiques contribueraient aussi à l'étiologie du MPM. Dans une région de la Turquie, deux villages exposés à l'erionite présentent des fréquences de mésothéliome très différentes : dans l'un des deux villages, la moitié des hommes sont morts des suites d'un mésothéliome alors que dans l'autre, un seul cas a été rapporté (Roushdy-Hammady *et al.*, 2001). La réalisation d'arbres génétiques dans ces populations a permis de mettre en évidence une prédisposition génétique au développement de MPM (Dogan *et al.*, 2006; Roushdy-Hammady *et al.*, 2001). Des pertes chromosomiques ont été détectées dans des familles avec plusieurs cas de

mésothéliomes sans que les gènes présents sur ces loci n'aient été identifiés (Ascoli *et al.*, 2001). Une équipe a démontré que les sujets présentant une délétion homozygote du gène GSTM1 (glutathion S-transférase M1) ou possédant des allèles de NAT2 (N-acetyltransferase 2) à l'origine d'un phénotype « acétyleur lent » présenteraient un risque accru de survenue de mésothéliome malin. (Hirvonen *et al.*, 1995; Hirvonen *et al.*, 1996). Une autre étude a au contraire permis d'observer une proportion plus importante de sujets « acétyteurs rapides » chez les patients atteints de mésothéliome que chez les sujets normaux (Neri *et al.*, 2005). Pour l'instant, on ne dispose d'aucune explication concernant ces différences. Ces exemples illustrent le fait qu'il existe des marqueurs de susceptibilité génétique, présents chez des populations à risque accru, mais qu'il est nécessaire de les étudier encore.

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

I.3.4. Mécanismes moléculaires

Les mécanismes par lesquels les cellules mésothéliales donnent naissance à des cellules malignes de mésothéliome sont eux-aussi loin d'être complètement élucidés. Néanmoins, la durée élevée de la période de latence (30-35 ans) (Selikoff *et al.*, 1980) suggère que le processus de transformation résulte de l'acquisition de nombreuses mutations et spécificité biologiques avant que ces cellules deviennent des cellules de MPM (figure 3, page 16) (Hanahan & Weinberg, 2000; Robinson & Lake, 2005; Spugnini *et al.*, 2006; Zitvogel *et al.*, 2006).

- **Capacité à induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse).** Les cellules de mésothéliome, comme toutes les cellules tumorales qui se multiplient de manière importante, ont des besoins en nutriments élevés. Elles produisent des facteurs angiogéniques puissants, comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le FGF (Fibroblast

Growth Factor) et l'IL-8 (interleukine 8) par exemple (Galffy *et al.*, 1999; Masood *et al.*, 2003).

- **Autosuffisance en facteurs de croissance.** Ces cellules produisent et répondent à de nombreux facteurs de croissance comme le PDGF (Platelet-Derived growth factors) A et B (Langerak *et al.*, 1996; Versnel *et al.*, 1991), l'EGF (epidermal growth factor) (Dazzi *et al.*, 1990), le TGF- β (Fitzpatrick *et al.*, 1994; Marzo *et al.*, 1997) ou encore l'IGF (Insulin-like growth factor) (Lee *et al.*, 1993).
- **Perte de sensibilité vis-à-vis des signaux d'inhibition de la croissance cellulaire.** Les gènes p16 et p14, impliqués dans les voies de signalisation de Rb (RetinoBlastoma protein) et p53, ne sont généralement plus exprimés par les cellules de MPM (Cheng *et al.*, 1994; Hirao *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002). La conséquence qui en résulte se traduit par une perte de la régulation du cycle cellulaire et l'acquisition de mécanismes de résistance à l'apoptose.
- **Possibilité de se diviser indéfiniment (immortalisation).** La Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) est une enzyme dont la fonction est de rajouter des motifs d'acides nucléiques (TTAGGG) à l'extrémité des chromosomes et maintient ainsi leur intégrité au cours des divisions cellulaires (Stewart & Weinberg, 2006). Les cellules somatiques saines perdent l'expression de la TERT, et, à partir d'un certain nombre de division, entrent dans un processus de dégénérescence dû au raccourcissement des chromosomes. Environ 90% des mésothéliome présentent une activité télomérase qui participe à leur immortalisation (Dhaene *et al.*, 2000; Kumaki *et al.*, 2002). De plus, la transcription de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et du développement tumoral sont sous contrôle de la voie Wnt activée dans les cellules de mésothéliome (Lee *et al.*, 2004; Uematsu *et al.*, 2003).
- **Acquisition de mécanismes de résistance à l'apoptose.** Certaines protéines anti-apoptotiques, comme les protéines de la famille Bcl-2 ou des IAP sont sur-exprimées par le mésothéliome tandis que l'expression des molécules pro-apoptotiques diminue (Falleni *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2007; Kleinberg *et al.*, 2007; O'Kane *et al.*, 2006; Segers *et al.*, 1994; Soini *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005; Zaffaroni *et al.*, 2007). Ces cellules

présentent donc une résistance vis-à-vis des signaux inducteurs de l'apoptose (dommages sur l'ADN, retrait de facteurs de croissance, stress hypoxique ou thermique, système perforine / granzyme B, ligation de Fas ou TNF α (tumor necrosis factor alpha) (Riedl & Shi, 2004).

- **Invasion des tissus voisins et interactions avec la matrice extracellulaire.** Les cellules du MPM sont caractérisées par une invasion rapide des structures intrathoraciques. L'expression de protéases leur permet de moduler la matrice extracellulaire riche en collagène qui constitue leur environnement (Edwards *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001).

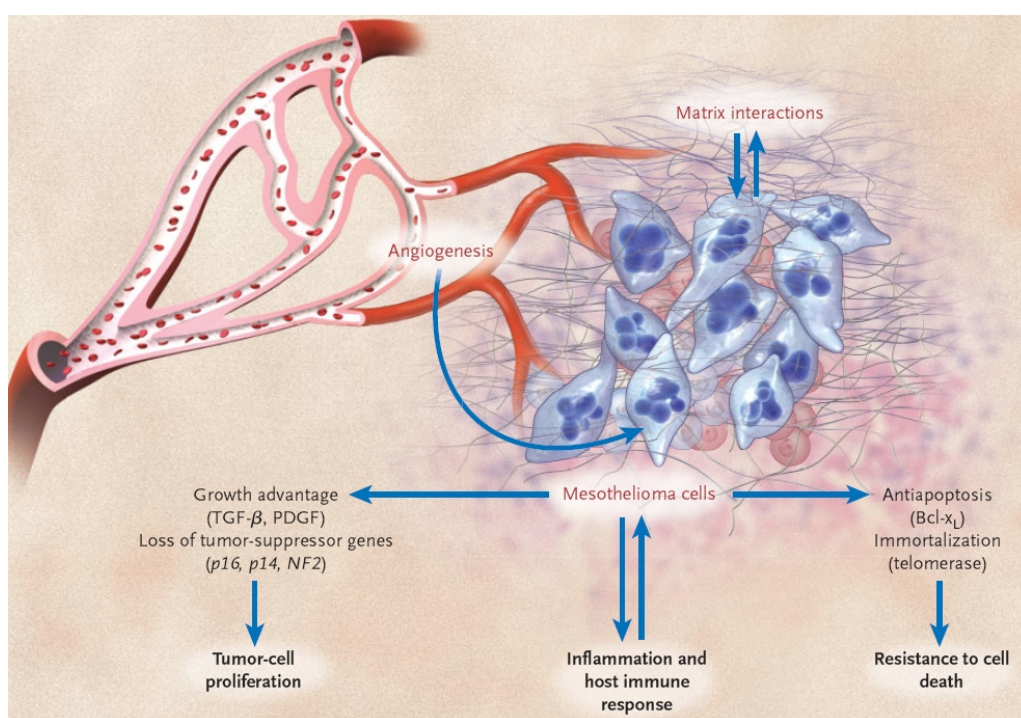


Figure 3: Principales caractéristiques biologiques des cellules de mésothéliome.

L'approvisionnement des cellules de mésothéliome en nutriments indispensables à leur croissance est assuré par la formation de vaisseaux sanguins (angiogenèse). La matrice extracellulaire fournit un support au développement de la tumeur. La prolifération cellulaire est aussi assurée par des facteurs de croissance (PDGF, TGF β) et la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeur comme p16, p14 et NF2 (NeuroFibromatosis type 2). L'activation de la télomérase et les mécanismes de résistance à l'apoptose les rendent moins sensibles à l'induction de la mort cellulaire et à l'élimination par l'hôte. TGF β : Transforming Growth Factor beta. (D'après Robinson & Lake, 2005)

I. 4. Etablissement du diagnostic

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

I.4.1. Analyses immunocytochimiques

Les analyses immunocytochimiques consistent à réaliser des marquages sur les cellules présentes dans le liquide d'épanchement. Malgré l'amélioration des techniques et des appareillages disponibles, ces marquages ne permettent pas toujours de conclure quant à la nature des cellules. Il est en effet très difficile de faire la distinction entre des cellules de MPM et des cellules mésothéliales bénignes. De plus, il arrive qu'il n'y ait pas de cellule dans l'épanchement, auquel cas l'analyse n'est évidemment pas réalisable! Il est donc souvent nécessaire de prélever des échantillons de tissus en vue de réaliser des marquages sur ces derniers.

I.4.2. Analyses immunohistochimiques

Ce type d'analyse représente à l'heure actuelle l'un des meilleurs outils diagnostiques dans le cadre du MPM. Il permet notamment de différencier un mésothéliome d'autres affections malignes (adénocarcinomes, carcinomes et même sarcomes) ou bénignes (hyperplasie mésothéliale).

C'est en 1979 que l'utilité de réaliser des marquages histologiques afin de différencier les MPM d'autres types de cancers a été démontrée pour la première fois (Wang *et al.*, 1979). Dans cette étude, les auteurs ont démontré qu'un marquage sur le CEA (CarcinoEmbryonic Antigen), exprimé par les adénocarcinomes mais pas par les MPM, peut s'avérer utile pour établir un diagnostic différentiel entre ces deux pathologies. Depuis, de nombreux marqueurs ont été décrits. Les marqueurs dits négatifs (exprimés par des cancers comme les adénocarcinomes par exemple mais pas par le mésothéliome) ont été identifiés en premier. Puis, dans les années 1990, des marqueurs dits positifs (exprimés uniquement par le mésothéliome) ont fait leur apparition et de nombreux marqueurs sont maintenant disponibles (tableau 2, page 18) (Ordóñez, 2002; Ordóñez, 2007). Devant le nombre croissant de marqueurs disponibles et afin d'homogénéiser les procédures de diagnostic en France, un groupe d'experts, le MESOPATH, a défini les marqueurs à utiliser pour établir le diagnostic de MPM (Scherpereel, 2007).

Marqueurs positifs	Marqueurs négatifs
Podoplanine (reconnu par l'anticorps monoclonal D2-40)	Epithelial cell adhesion molecule
<u>Calretinine</u>	Anticorps monoclonal MOC-31
<u>CK 5/6 ou kératines</u>	<u>Anticorps monoclonal Ber-Ep4</u>
<u>WT1 (Wilms' Tumor 1 gene)</u>	Anticorps monoclonal HEA 125
Thrombomoduline	Anticorps monoclonal AUA1
N-cadherine	<u>CEA</u>
Mésotheline	<u>Anticorps monoclonal B72.3</u>
<u>EMA (epithelial membrane antigen) (marquage membranaire)</u>	Anticorps monoclonal BG-8
	CD15
	Anticorps monoclonal CA 19-9
	<u>EMA (marquage cytoplasmique)</u>
	<u>TTF1 (Thyroid Transcription Factor 1)</u>
	E-cadherine
	<u>CD34</u>
	<u>Bcl-2</u>
	<u>Desmine</u>
	<u>PS-100</u>

Tableau 2: Marqueurs disponibles pour le diagnostic immunohistochimique du mésothéliome.

Les marqueurs dont l'utilisation est recommandée par le groupe MESOPATH apparaissent en gras et sont soulignés. Au minimum, deux marqueurs positifs et deux marqueurs négatifs doivent être associés pour établir un diagnostic de certitude.

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

I.4.3. Dosage de marqueurs solubles

Le dosage de marqueurs sériques est fréquemment réalisé pour aider à établir le diagnostic ou pour suivre les réponses aux traitements dans différents types de cancers (Duffy, 2006; Perkins *et al.*, 2003; Seregini *et al.*, 2004; Steinbach *et al.*, 2006; Tarro *et al.*, 2005; Yuen & Lai, 2005). Les marqueurs tels que CEA, CA15-3 (Carbohydrate Antigen 15-3, une forme soluble de la protéine Mucine-1 (MUC-1)), CA 19-9, CYFRA 21-1 (cytokeratine fragment 19), acide hyaluronique, Tissue Plasminogen Activator (TPA), CA125 ont été dosés dans les sérums et/ou les liquides pleuraux de patients (Alataş *et al.*, 2001; Frebourg *et al.*, 1987; Fuhrman *et al.*, 2000; Hedman *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1999; Miédougé *et al.*, 1999; Paganuzzi *et al.*, 2001; Schouwink *et al.*, 1999; Thylén *et al.*, 2001; Villena *et al.*, 2003). Malgré le fait que certains permettent de distinguer des épanchements d'origine maligne ou bénigne, leur utilisation semble peu pertinente dans le cadre du MPM du fait de leur manque de sensibilité ou de spécificité vis-à-vis de ce cancer.

La recherche de nouveaux marqueurs est toujours d'actualité et des techniques allant de l'analyse des protéines sériques par spectrométrie de masse à l'analyse des gènes exprimés par les cellules tumorales sont actuellement employées afin d'y arriver (Posadas *et al.*, 2005). Malgré les efforts intensifs fournis ces dernières années pour identifier le marqueur idéal, il n'y a finalement que peu de protéines qui pourraient s'avérer intéressantes pour établir le diagnostic de MPM, donner un pronostic ou encore suivre la réponse tumorale suite à la mise en oeuvre d'un traitement chez les patients. Parmi les marqueurs les plus étudiés figurent l'ostéopontine, le CA125, RCAS1

(Receptor-binding Cancer Antigen expressed on SiSo cells 1), le MPF et surtout, les formes solubles de la mésothéline (MSLN) qui semblent de loin être les plus prometteuses.

I.4.3. a) Dosage de formes solubles de la mésothéline

La MSLN est une glycoprotéine de 40-kDa exprimée à la surface des cellules mésothéliales tapissant la plèvre, le péricarde et le péritoine. Cette protéine est sur-exprimée par les cellules du mésothéliome, du cancer pancréatique et du cancer de l'ovaire (Chang & Pastan, 1996; Hassan *et al.*, 2004).

La protéine codée par le gène de la MSLN est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 69-kDa clivé ensuite par la furine en deux protéines distinctes : une protéine soluble de 31-kDa, le MPF (Megakaryocyte-Potentiating Factor), et la MSLN, ancrée à la membrane par le biais d'un groupement GPI (GlycosylPhosphatidyl Inositol) (figure 4, page20) (Hassan *et al.*, 2004).

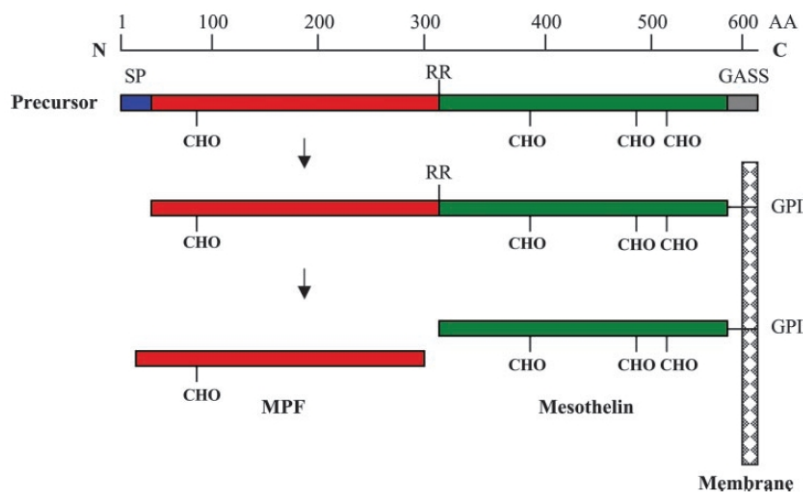


Figure 4: Processus de maturation de la mésothéline.

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

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

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

I.4.3. b) L'ostéopontine

Cette protéine, exprimée par les ostéoblastes, a été récemment suggérée comme pouvant être utile dans le suivi de patients exposés à l'amiante (Pass *et al.*, 2005). En effet, dans cette étude,

les taux d'ostéopontine sériques étaient plus élevés chez les patients atteints de MPM que chez les patients exposés à l'asbestos et d'autres travaux ont par ailleurs confirmé ces résultats (Grigoriu *et al.*, 2007). Cependant, l'ostéopontine est décrite dans de nombreux autres types de cancers, comme les cancers de l'ovaire, du poumon, du sein, etc. (Fedarko *et al.*, 2001; Rittling & Chambers, 2004). Elle n'est donc a priori pas spécifique du MPM et le dosage de l'ostéopontine semble par conséquent peu pertinent dans le cadre du diagnostic différentiel du MPM.

I.4.3. c) Autres marqueurs

La protéine CA-125 est une protéine transmembranaire de grande taille appartenant à la famille des mucines. Elle est exprimée à la surface des cellules des trompes de fallope, de l'endomètre et d'autres épithélia et des cellules mésothéliales (Kabawat *et al.*, 1983). Une équipe a suggéré qu'il pourrait avoir un intérêt dans le suivi de la progression tumorale du MPM (Hedman *et al.*, 2003). Cependant, une étude portant sur une cohorte constituée de plus de 200 patients (dont 117 atteints de MPM, 33 exposés à l'amianté mais n'ayant développé aucune pathologie au moment de l'étude et 83 souffrant de pathologies bénignes ou non liées aux fibres d'amianté) a démontré que ce marqueur ne présentait que peu d'intérêt dans le diagnostic du MPM du fait de sa trop faible sensibilité (Creaney *et al.*, 2007; Miralles *et al.*, 2003).

Une étude réalisée sur 38 patients atteints de MPM a montré que la plupart des cellules de mésothéliome exprimaient RCAS1 et une forme soluble de cette protéine a pu être mise en évidence dans les liquides pleuraux de patients atteints de MPM et de cancers du poumon (Hiraki *et al.*, 2005). D'autres études sont nécessaires afin de préciser et valider son utilité en clinique dans le cadre du MPM.

Comme nous l'avons vu précédemment, le précurseur de la MSLN est clivé en deux protéines, dont l'une, le MPF, est relarguée dans l'environnement cellulaire. Deux études réalisées sur ce marqueur ont montré que ce marqueur pouvait représenter un outil intéressant pour le diagnostic du MPM (Onda *et al.*, 2005; Shiomi *et al.*, 2008). De plus, le taux de MPF diminuerait après une chirurgie, suggérant un intérêt potentiel de ce marqueur dans le suivi des patients suite à un traitement, mais cela reste à confirmer (Onda *et al.*, 2005).

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

I. 5. Modalités thérapeutiques

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

I.5.1. Les traitement conventionnels

I.5.1. a) La chirurgie

Différents protocoles de chirurgie sont disponibles, certains plus invasifs que d'autres. Ils sont généralement utilisés à des fins palliatives (réduction de la masse tumorale et des signes cliniques) plutôt que curatives. En effet, l'exérèse étant souvent incomplète, il est fréquent de voir le mésothéliome se redévelopper par la suite. Une pleurectomie (exérèse complète de plèvre) ne peut être envisagée qu'en cas de stade précoce de MPM (Scherpereel, 2007). Il a été rapporté que la réduction chirurgicale par pleuropneumonectomie élargie (exérèse « en bloc » de la coupole diaphragmatique, du péricarde, de la plèvre et du poumon touchés par le processus tumoral) pouvait apporter un bénéfice aux patients traités (Sugarbaker *et al.*, 1999). Cependant, d'autres équipes n'ont pu confirmer ces résultats (Maziak *et al.*, 2005). Le taux de mortalité lié à l'intervention chirurgicale n'est pas négligeable et a pour conséquence de limiter le nombre de candidats potentiels ainsi que le nombre de centres capables de proposer cette thérapie. Enfin, il

est admis qu'un tel traitement doit s'accompagner d'une thérapie adjuvante, de type chimiothérapie ou radiothérapie, ayant pour but de détruire les cellules tumorales résiduelles.

I.5.1. b) La chimiothérapie

Les nombreux essais réalisés ont montré que l'emploi simultané de plusieurs drogues donnait de meilleurs résultats que lors de l'utilisation d'une seule (Ellis *et al.*, 2006; Steele & Klabatsa, 2005). Pour le moment, le seul traitement recommandé en France est l'association de pemetrexed et de cisplatine (Scherpereel *et al.*, 2006).

La cisplatine est une drogue utilisée depuis presque 30 ans en thérapie anti-cancéreuse. Elle peut se lier aux acides nucléiques et interférer ainsi avec les mécanismes de transcription et de réplication de l'ADN. L'activité toxique de la cisplatine s'exercerait également via des interactions avec d'autres cibles, comme des protéines cytoplasmiques, l'activation de la voie de stress du reticulum endoplasmique etc. (Rabik & Dolan, 2007). Le pemetrexed appartient à la famille des anti-folate(s). Après une accumulation rapide dans les cellules cancéreuses, il inhibe plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des folates et de la thymidine (Chattopadhyay *et al.*, 2007). Les cellules du mésothéliome pourraient être particulièrement sensibles à cette molécule puisqu'elles expriment toutes, quelle que soit leur nature histologique, un récepteur de haute affinité aux alpha-folates (Wang *et al.*, 2002). L'association de ces deux drogues a été étudiée dans le cadre du MPM il y a peu de temps, au cours notamment d'un essai de phase III réalisé sur 448 patients (Vogelzang *et al.*, 2003). Avec des taux de réponses avoisinant les 40% et une médiane de survie de 12,1 mois, l'association pemetrexed – cisplatine s'est révélée plus efficace que la cisplatine utilisée seule (taux de réponse de 17% et 9,3 mois de médiane de survie). Une étude plus récente réalisée sur plus de 1000 patients a en partie confirmé ces résultats avec une médiane de survie de 11 mois environ mais des taux de réponses inférieurs (de l'ordre de 20%) (Obasaju *et al.*, 2007). L'emploi d'un autre anti-folate, le raltitrexed, combiné à la cisplatine a démontré une efficacité à peu près équivalente en terme d'allongement de médiane de survie au cours d'un autre essai clinique de phase III (van Meerbeeck *et al.*, 2005). Ainsi, l'association cisplatine-anti-folates, et plus particulièrement le pemetrexed, semble intéressante dans le cadre du MPM. D'autres essais sont actuellement en cours afin de tester l'association des anti-folates avec d'autres agents (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials>) (Fizazi *et al.*, 2003) et d'autres associations, du type gemcitabine-cisplatine (Byrne *et al.*, 1999; Castagneto *et al.*, 2005;

Kalmadi *et al.*, 2007; Nowak *et al.*, 2002; Utkan *et al.*, 2006; van Haarst *et al.*, 2002) ou encore oxaliplatine et gemcitabine (Schutte *et al.*, 2003) font aussi l'objet de recherches intensives. Cependant, leur emploi n'est pas encore validé pour le traitement du MPM.

Seule l'association cisplatine-pemetrexed est recommandée en première intention. L'administration simultanée de dexaméthasone, d'acide folique et de vitamine B12 réduirait les effets secondaires et la toxicité liés à ce protocole de chimiothérapie (Vogelzang *et al.*, 2003). La limite de la chimiothérapie apparaît donc puisque ce protocole, qui est le meilleur dont on dispose actuellement, ne permet qu'un allongement limité de la durée de survie des patients et moins de la moitié d'entre eux répondent partiellement à ce traitement. De plus, en cas d'absence de réponse, aucun autre protocole de chimiothérapie ne peut être préconisé.

I.5.1. c) La radiothérapie

Les résultats obtenus par l'emploi de la radiothérapie se sont révélés décevants et cette alternative ne peut être utilisée qu'à des fins palliatives ou préventives (Waite & Gilligan, 2007). La radiothérapie palliative est utilisée afin de diminuer la douleur ressentie par les patients souffrant d'un MPM. La radiothérapie ne peut être utilisée seule dans le traitement des patients atteints de ce cancer du fait de la nature diffuse de la tumeur et de l'importance des doses à utiliser, à l'origine d'effets secondaires importants, allant jusqu'à des complications parfois fatales. La radiothérapie dite préventive permet quant à elle de lutter contre la dissémination des cellules de MPM au niveau des sites d'interventions médicales (Baldini, 2004; Boutin *et al.*, 1995; Waite & Gilligan, 2007).

I.5.1. d) L'approche dite multimodale

Comme nous venons de le voir, aucune des modalités décrites précédemment n'est satisfaisante si elle est utilisée seule. Cependant, il est possible de les associer pour obtenir de meilleurs résultats ; c'est ce que l'on appelle l'approche multimodale. Concrètement, cette approche consiste à réaliser une chirurgie (pleurectomie ou, le plus souvent, pleuropneumonectomie élargie) puis une radiothérapie post-opératoire, le tout étant éventuellement précédé d'une chimiothérapie néo-adjuvante (protocole cisplatine-pemetrexed) (Neragi-Miandoab, 2006;

Ruffié, 2006). Des études sont en cours afin de préciser la faisabilité et les bénéfices pour les patients de ce protocole. Pour l'instant, ce traitement n'est pas envisageable en routine.

I.5.2. Les nouvelles stratégies

I.5.2. a) Les nouvelles molécules

Les différentes voies modifiées (activées ou au contraire inhibées) au cours du développement tumoral font l'objet de recherches intensives car elles constituent des cibles pour de nouveaux protocoles de chimiothérapie.

L'angiogénèse joue un rôle important dans la progression tumorale des tumeurs solides (Folkman, 1990), et son inhibition devrait permettre de limiter la croissance tumorale, même s'il paraît peu probable qu'on puisse éradiquer en totalité la tumeur. De nombreuses molécules sont impliquées dans l'angiogénèse du mésothéliome, dont le VEGF, l'EGF, le bFGF (basic fibroblast growth factor), le PDGF, l'IL-6 ou encore l'IL-8 et des recherches importantes concernant l'utilisation de drogues «anti-angiogéniques ont été réalisées dans le mésothéliome (Catalano *et al.*, 2004; Nowak *et al.*, 2002). Des essais cliniques sont actuellement en cours afin de tester l'intérêt de diverses molécules inhibitrices de l'angiogénèse (tableau 3, page 27).

La dérégulation de l'expression des gènes est un autre mécanisme important dans l'initiation puis la progression tumorale. Les histones acetyltransferases et les histones deacetylases sont des familles d'enzymes qui, en modifiant le niveau d'acétylation des histones, changent l'organisation de la chromatine et influent sur l'expression génique. Schématiquement, les histones acetyltransferases augmentent la transcription des gènes tandis que les histones deacetylases sont à l'origine de leur répression. Il a donc été envisagé d'utiliser des drogues inhibitrices de ces enzymes afin de perturber l'expression de certains gènes par les cellules cancéreuses. La plupart des données disponibles actuellement concernent les inhibiteurs des histones deacetylases (Pan *et al.*, 2007). Les représentants des inhibiteurs des histones deacetylases testés pour le traitement du mésothéliome sont indiqués dans le tableau 3 (page 27).

Molécules	Cibles	Type d'essai et résultats	Références
SU5416	Inhibiteur de la tyrosine kinase du récepteur au VEGF	Phase II, réponses faibles à modérées	(Kindler, 2004)
Bevacizumab (Avastin)	Anticorps monoclonal dirigé contre VEGF	Essai pré-clinique chez la souris (association avec pemetrexed) phase II en cours (association avec chimiothérapie)	(Li <i>et al.</i> , 2007) http://www.cancer.gov/clinicaltrials
ZD1839 (gefitinib)	Inhibiteur de la tyrosine kinase du récepteur à l'EGF	Phase II pas de réponse	(Govindan <i>et al.</i> , 2005)
Thalidomide	Inhibiteur angiogénèse via EGF, bFGF et TNF α	Phase II Stabilisation: 27%	(Baas <i>et al.</i> , 2005)
Erlotinib	Inhibiteur voie EGRF	Phase II; pas de réponse	(Garland <i>et al.</i> , 2007)
Imatinib mesylate (glivec, gleevec, STI-571)	Inhibiteur PDGF	Phase II pas d'activité anti-tumorale phase II en cours (association)	(Mathy <i>et al.</i> , 2005) http://www.cancer.gov/clinicaltrials
BMS-690514	Inhibiteur des récepteurs du VEGF	Phase I (USA)	http://www.cancer.gov/clinicaltrials
AZD2171	Inhibiteur des récepteurs 1, 2 et 3 du VEGF	Phase II en cours (USA et Canada)	http://www.cancer.gov/clinicaltrials
Vandetanib	Inhibiteur du récepteur 2 du VEGF	Phase II en cours (Suisse)	http://www.cancer.gov/clinicaltrials
Sunitinib	Inhibiteur des récepteurs 2 et 3 du VEGF et du récepteur β du PDGF	Phase I en cours (association avec radiothérapie) (USA) Phase II en cours (Canada)	http://www.cancer.gov/clinicaltrials
Pazopanib	Inhibiteur des récepteurs 1, 2 et 3 du VEGF, récepteurs α et β du PDGF et c-kit	Phase II en cours (USA)	http://www.cancer.gov/clinicaltrials
BMS-690514	Inhibiteur des récepteurs au VEGF	Phase I (USA, Canada, Europe)	http://www.cancer.gov/clinicaltrials
Dasatinib	Inhibiteur de SFKs (Src family kinases)	In vitro: arrêt du cycle cellulaire, induction apoptose, inhibition invasion Phase II (USA)	(Tsao <i>et al.</i> , 2007) http://www.cancer.gov/clinicaltrials
Bortezomib	Inhibiteur du protéasome	In vitro Phase II en cours seul (Europe) et en association avec la cisplatine (Angleterre)	(Gordon <i>et al.</i> , 2008) (Sartore-Bianchi <i>et al.</i> , 2007) http://www.cancer.gov/clinicaltrials
SAHA	Inhibiteur des histones deacetylases	Phase II et III	http://www.cancer.gov/clinicaltrials
LBH589	Inhibiteur des histones deacetylases	Phase I	http://www.cancer.gov/clinicaltrials
FR901228 (romidepsin)	Inhibiteur des histones deacetylases	Phase I (association avec decitabine)	http://www.cancer.gov/clinicaltrials
Flavopiridol	Inhibiteur Cyclin-dependent kinase	In vitro Phase I	(Nguyen <i>et al.</i> , 2004) http://www.cancer.gov/clinicaltrials

Tableau 3: Molécules en cours d'étude clinique pour le traitement du MPM.

Un nombre important de molécules agissant sur l'angiogénèse, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, de l'expression génique, les capacités d'invasion tumorale ou encore le protéasome sont actuellement en cours d'étude, à des stades plus ou moins avancés.

D'autres processus dérégulés dans le mésothéliome peuvent être ciblés de façon analogue. Ainsi, des drogues agissant au niveau du cycle cellulaire (flavopiridol, dasatinib), du protéasome (bortezomib), de l'apoptose (dasatinib), de la capacité de migration et d'invasion cellulaire (dasatinib) peuvent être utilisées (voir tableau 3 page 29).

Pour l'instant, les études concernant toutes ces nouvelles molécules n'en sont qu'à leurs débuts et il faut attendre le résultat des essais afin de déterminer leur efficacité et l'intérêt que ces stratégies pourraient avoir dans le traitement du mésothéliome.

I.5.2. b) La thérapie génique

La thérapie génique consiste à introduire des gènes « thérapeutiques » au sein d'une tumeur afin de limiter son expansion. Du fait de sa localisation intra-pleurale, le MPM est relativement accessible et semble être un bon candidat pour la mise en place d'une telle stratégie *in vivo* (Nelson *et al.*, 2005; van der Most *et al.*, 2006). Les vecteurs utilisés pour transporter les gènes sont généralement des virus. Les cellules tumorales infectées vont alors produire la protéine encodée par ce gène et plusieurs stratégies sont envisageables en fonction de l'effet du gène sur la tumeur.

Le remplacement de gènes suppresseurs de tumeurs ou l'inactivation d'oncogènes sont envisageables dans de nombreux types de cancers. Cependant, les modifications génétiques ne sont pas bien caractérisées pour le mésothéliome et cette approche n'a pas encore été testée.

La thérapie génique permet d'augmenter la sensibilité des cellules tumorales à certaines drogues. Par exemple, il est possible d'introduire au sein de la tumeur le gène codant la thymidine kinase de l'herpex simplex virus (HSVtk), une enzyme qui est responsable de la destruction de la tumeur après administration de ganciclovir. L'enzyme en elle-même n'est pas toxique mais elle permet la conversion du ganciclovir en un métabolite toxique pour les cellules qui la synthétisent ainsi que les cellules avoisinantes. Ce type de protocole a été testé dans le cadre du MPM et semble plutôt prometteur : les patients ont bien toléré l'administration du vecteur viral, un adenovirus, au cours d'essais de phase I (Stermann *et al.*, 1998) et des réponses à long-terme ont été observées chez 2 patients à l'aide d'un adenovirus optimisé (Lanuti *et al.*, 1999; Stermann *et*

al., 2005). L'avantage de ce type de protocole est que les cellules voisines des cellules transfectées deviennent également sensibles à l'action du ganciclovir. Les mécanismes sous-jacents à cet effet « bystander » ne sont pas encore totalement élucidés mais ils feraient intervenir des communications entre les cellules via les jonctions gap par exemple (Nicholas *et al.*, 2003). Ainsi, même si l'ensemble des cellules tumorales n'est pas transfecté par le vecteur viral (du fait de la mise en place d'une réponse dirigée contre ce vecteur, de l'absence de réplication de celui-ci, ou encore du manque d'accessibilité de la tumeur), l'action du transgène s'étend malgré tout aux cellules voisines.

Un autre type d'approche est l'activation de la réponse immunitaire par le gène introduit dans la tumeur. Des essais réalisés sur des modèles murins de mésothéliome ont montré que la transfection des tumeurs avec des cytokines telles que l'IL-2 ou l'IL-12 pouvait induire l'induction d'une réponse immunitaire et le rejet de tumeurs (Caminschi *et al.*, 1999; Leong *et al.*, 1997). Chez l'homme, le protocole étudié dans le cadre du MPM est l'administration intra-tumorale du gène codant l'IL-2 par le virus de la vaccine. La tolérance s'est avérée excellente car aucune toxicité n'a été rapportée. En revanche, malgré l'induction d'une réponse immunitaire et une infiltration du site tumoral par des lymphocytes T, aucune réponse clinique n'a pu être observée (Mukherjee *et al.*, 2000). Un essai de phase I avec un adenovirus contenant de l'IFN β (interferon beta) a réactivé la réponse immunitaire contre le mésothéliome et sur les 10 patients inclus dans l'étude, 4 réponses ont été observées (Sternan *et al.*, 2007).

La combinaison des deux stratégies précédentes a été testée dans des essais de phase I chez des patients atteints de MPM : des cellules tumorales allogéniques (cancer ovarien) infectées par un retrovirus contenant le gène de l'HSVtk puis irradiées ont été injectées dans la cavité pleurale (Harrison *et al.*, 2000). Les patients ont reçu un traitement au ganciclovir au bout de 24h. Le but de cette approche était de stimuler la réponse immunitaire induite par la mort des cellules cancéreuses ovariennes. Peu d'effets secondaires ont été rapportés et le pourcentage de lymphocytes T CD8 présents sur le site tumoral a effectivement augmenté mais malheureusement, aucune réponse clinique n'a été rapportée non plus.

Il reste de nombreux paramètres à améliorer pour augmenter l'efficacité de ce type de traitement, à commencer par le choix du vecteur ainsi que les gènes à utiliser (van der Most *et al.*, 2006).

Néanmoins, la thérapie génique suscite de grands espoirs pour le traitement du MPM car il s'agit sans doute d'un des cancers les plus adaptés à ce genre de stratégie thérapeutique.

I.5.2. c) La virothérapie

Cette approche est basée sur la destruction des cellules tumorales par des virus dits oncolytiques (Parato *et al.*, 2005; Russell & Peng, 2007). Pour être considérés comme potentiellement intéressants, ces virus doivent être spécifiques des tumeurs afin de ne pas causer la destruction des tissus sains. Si certains virus possèdent naturellement cette qualité, c'est loin d'être le cas pour tous et il est possible de les modifier génétiquement afin de leur conférer une plus grande spécificité. La capacité du virus à atteindre le site tumoral est également importante mais le MPM restant généralement confiné au sein de la cavité pleurale, il suffirait d'y introduire directement le virus pour atteindre les cellules cancéreuses.

Des études réalisées sur des lignées cellulaires de MPM ont montré que l'infection des cellules par un HSV en association avec une radiothérapie (Adusumilli *et al.*, 2007) ou avec une chimiothérapie (cisplatine) (Adusumilli *et al.*, 2006) induisait une forte cytotoxicité. Des adenovirus ont aussi démontré une capacité de lyse importante vis-à-vis du mésothéliome *in vitro* mais aussi sur un modèle murin (Zhu *et al.*, 2006). L'essai de phase I réalisé avec un adenovirus contenant de l'IFN β déjà cité auparavant (paragraphe thérapie génique) peut aussi être considéré comme un protocole de virothérapie (Stermann *et al.*, 2007). Les études réalisées sur le mésothéliome sont récentes et encore peu nombreuses mais il s'agit d'une approche prometteuse pour le traitement de ce cancer.

I.5.2. d) L'immunothérapie

Le principe de l'immunothérapie repose sur la reconnaissance puis la destruction des cellules cancéreuses par les effecteurs du système immunitaire. La stimulation non spécifique via l'apport de cytokines, que ce soit par injection ou par thérapie génique, a été largement étudiée (Grégoire & Ebstein, 2007; Nowak *et al.*, 2002). Les résultats demeurent assez décevants et des protocoles visant à induire une réponse plus forte et plus ciblée ont été envisagés.

- **Immunothérapie passive basée sur l'injection d'anticorps.** Les cellules tumorales expriment à leur surface des protéines particulières pouvant être reconnues par les anticorps de manière spécifique. La MSLN est exprimée par les cellules du MPM et il a été envisagé d'utiliser des anticorps spécifiques de cette protéine dans le but de détruire les cellules exprimant la MSLN. Un anticorps chimérique humanisé (MORAb-009) a démontré une activité cytotoxique *in vitro* (Hassan *et al.*, 2007) et un essai de phase I est actuellement en cours aux Etats-Unis afin d'étudier la toxicité de cet anticorps (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials>). Une immunotoxine (SS1P) constituée d'une toxine bactérienne tronquée (l'exotoxine A de *Pseudomonas*) et d'un fragment variable d'un anticorps spécifique de la MSLN a aussi été développée (Hassan *et al.*, 2004). L'immunotoxine SS1P se fixe sur les cellules qui expriment la MSLN via le fragment de l'anticorps ce qui permet à l'exotoxine d'exercer son action toxique sur ces cellules. L'activité de SS1P a été testée *in vivo* chez la souris (Fan *et al.*, 2002) et *in vitro* sur des lignées tumorales humaines (cancer de l'ovaire et mésothéliome péritonéal) (Hassan *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004). Les essais de phase I ont révélé l'induction de pleurites réversibles et surtout, ils ont permis d'observer des réponses chez certains patients inclus (Hassan & Ho, 2008).
- **Vaccination thérapeutique.** Ce type d'approche repose sur la stimulation active d'effecteurs dirigés spécifiquement contre la tumeur. L'injection de lysats cellulaires a été envisagée par l'équipe de Robinson qui a réalisé une étude de phase I reposant sur l'injection de lysats tumoraux autologues et de GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor) pour l'activation *in situ* des cellules dendritiques (DC) (Powell *et al.*, 2006). Ce traitement a été plutôt bien toléré puisqu'il n'a pas entraîné d'effet secondaire important. Une réponse immunologique a été observée chez environ un tiers des patients inclus mais aucune réponse objective n'a pu être objectivée. Cette stratégie pourrait néanmoins se placer dans le contexte d'une thérapie multimodale.
- **Injection de DC chargées en antigènes de tumeurs.** Les DC sont de bonnes candidates pour une utilisation en immunothérapie du fait de leur rôle central dans la réponse anti-tumorale. De nombreux essais basés sur l'injection de DC sont réalisés pour différents types de cancers (Fong & Engleman, 2000). Néanmoins, dans la mesure où peu d'antigènes du MPM ont été identifiés, cette stratégie est encore assez limitée pour ce cancer.

L'efficacité de l'activation de la réponse immunitaire a été démontrée dans un modèle murin (Hegmans *et al.*, 2005). Au cours de cette étude, le développement d'un mésothéliome péritonéal de souris a pu être inhibé après injection de DC chargées en lysats tumoraux. Récemment, une autre équipe a démontré qu'il était possible d'activer *in vitro* des lymphocytes T spécifiques de WT-1 capables de lyser des cellules de mésothéliome en chargeant des DC avec des peptides dérivés de cette protéine (May *et al.*, 2007). Enfin, la vaccination de patients atteints de MPM avec des DC autologues chargées en lysats tumoraux fait l'objet d'un essai clinique de phase I aux Pays-Bas. Cette étude a pour but de tester la faisabilité et l'inocuité de cette approche en tant que thérapie adjuvante du mésothéliome (<http://www.mesotheliomainternational.org>).

Quel que soit le protocole d'immunothérapie mis en place, celui-ci ne pourra a priori pas être curatif à lui seul. En revanche, une combinaison entre un protocole de thérapie conventionnelle (chimiothérapie et/ou chirurgie par exemple) et un protocole d'immunothérapie pourrait apporter un réel bénéfice aux patients.

II. L'immunité anti-tumorale

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

Paul Ehrlich fut le premier à envisager que le système immunitaire pouvait réprimer une fréquence potentiellement importante de cancers (Ehrlich, 1909). Toutefois, l'idée que le système immunitaire puisse exercer un contrôle sur le développement tumoral n'a été réellement poursuivie qu'à partir de la seconde moitié du XX^{ème} siècle. Le concept de surveillance immunitaire a alors été repris et il a été suggéré qu'une des fonctions principales de l'immunité cellulaire était de maintenir l'homéostasie des organismes multicellulaires complexes en les protégeant des développements éventuels de néoplasies (Burnet, 1957; Thomas, 1959). L'ensemble de ces idées a finalement abouti à la théorie selon laquelle les lymphocytes pouvaient agir telles des sentinelles dans la reconnaissance et l'élimination des cellules transformées (Burnet, 1970).

Cette théorie a cependant fait l'objet de nombreuses critiques, notamment à cause de données expérimentales démontrant que des souris *nude*, bien que déficientes sur le plan immunitaire, ne présentaient pas plus de tumeurs que des souris normales. Ce n'est que plus tard que les limites de ce modèle et des résultats qui en découlent ont été identifiés : les souris *nude* se sont avérées ne pas être totalement dépourvues de lymphocytes T et elles possèdent des composants de l'immunité innée capables de compenser, au moins en partie, leur déficit immunitaire. Le fait que de nombreuses cellules et molécules effectrices du système immunitaire jouent un rôle dans le contrôle du développement tumoral a finalement été établi chez l'animal puisque des souris déficientes en composants essentiels du système immunitaire inné ou acquis se sont révélées être plus sensibles au développement de tumeurs spontanées ou induites (Dunn *et al.*, 2004b). Des expériences similaires réalisées à l'aide d'anticorps afin de dépléter les populations de cellules NK (Natural Killer) ou NKT, ou de neutraliser le TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) (Takeda *et al.*, 2002) ou le NKG2D (Natural Killer Group protein 2 D) (Raulet, 2003), ont confirmé ces résultats. Enfin, l'activation de certains composants du système immunitaire comme les cellules NK ou NKT (Smyth *et al.*, 2005) ou une sous-population de DC particulière produisant de l'IFN γ (Taieb *et al.*, 2006) ont abouti à réduire le développement de tumeurs dans des modèles murins.

Chez l'homme, plusieurs observations cliniques permettent de confirmer un rôle actif de la surveillance immunitaire contre les tumeurs. Par exemple, des patients transplantés et sous traitement immunosuppresseur présentent une fréquence plus importante de cancers par rapport à la population générale (Euvrard *et al.*, 2003; Hollenbeak *et al.*, 2005). De plus, une infiltration tumorale par certaines populations lymphocytaires corrèle souvent avec une meilleure survie des patients atteints de cancer. La présence de lymphocytes infiltrant la tumeur au sein de mélanomes (Clark *et al.*, 1989; Clemente *et al.*, 1996), cancers pulmonaires (Villegas *et al.*, 2002), ovariens (Zhang *et al.*, 2003), ou encore du tractus gastro-intestinal (Ishigami *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2001), a en effet été associée à une survie plus élevée des patients.

Malgré l'existence de ce processus d'immunosurveillance, des cancers peuvent apparaître chez des individus immunocompétents. Plusieurs travaux réalisés sur divers modèles murins ont démontré que des tumeurs qui se développent chez des hôtes sans pression du système immunitaire sont globalement plus immunogènes que des tumeurs issues d'hôtes immunocompétents (Dunn *et al.*, 2005; Shankaran *et al.*, 2001; Smyth *et al.*, 2000; Street *et al.*, 2002). Ainsi, bien que le système immunitaire semble capable de lutter contre le développement tumoral, il semble aussi être à l'origine de la sélection de tumeurs moins immunogènes.

L'équipe de Schreiber a récemment proposé un concept, l'immunoédition, qui tient compte du fait que l'immunosurveillance ne constitue qu'une partie des relations entre le système immunitaire et les cancers (Dunn *et al.*, 2002; Dunn *et al.*, 2004a). L'immunoédition est décrite comme étant la résultante de trois processus : élimination, équilibre et échappement (figure 5, page 35). L'immunosurveillance proprement dite correspond à la phase d'élimination. La sélection des variants tumoraux se passe pendant la phase dite d'équilibre, et peut conduire à l'échappement, et par conséquent, au développement de tumeurs avec un impact clinique.

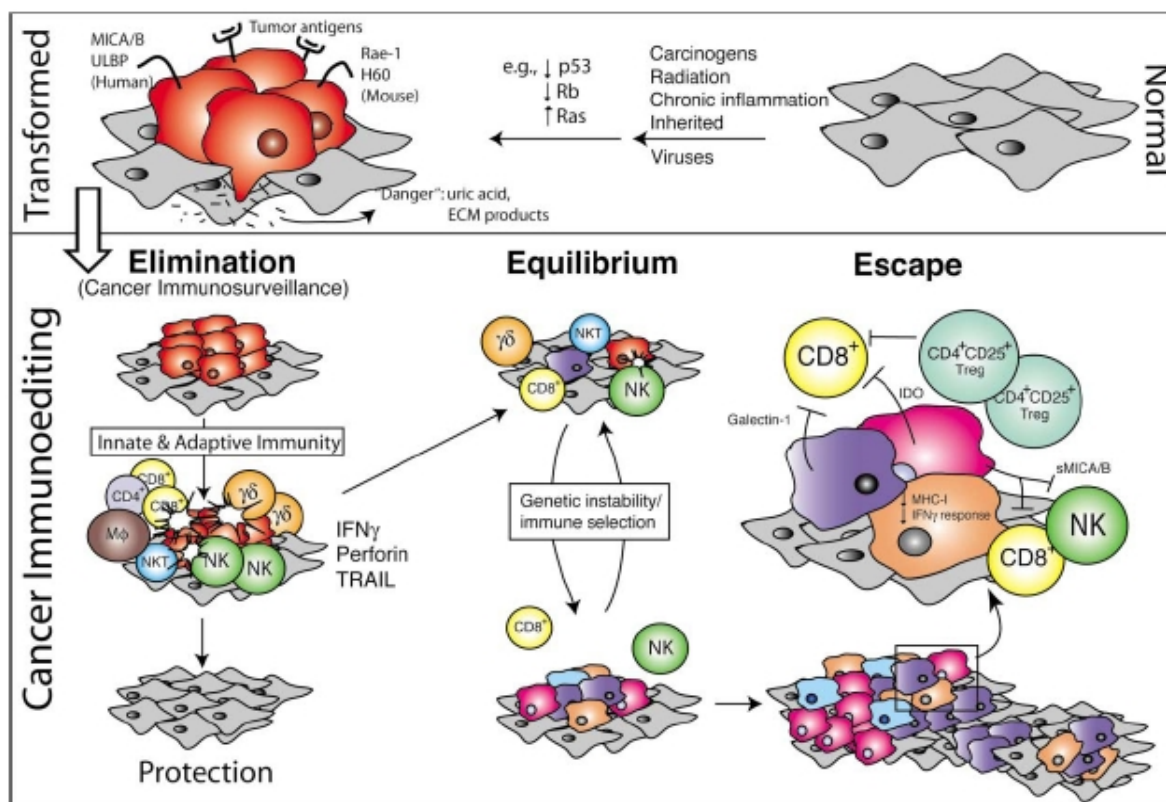


Figure 5: Les trois phases de l'immunoédition.

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

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

De nombreux types de cellules ou de molécules effectrices, appartenant aux versants inné et acquis de l'immunité, sont impliqués dans l'immunosurveillance des cancers. Dans la mesure où mon travail de thèse a porté sur les DC en tant que vecteurs d'antigènes tumoraux et leur capacité à induire une réponse cellulaire et sur la génération de clones de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) par des DC chargées en peptides, les mécanismes concernant les CTL et des DC seront décrits plus en détail que ceux des autres effecteurs.

II. 2. 1. L'immunité innée

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les cellules tumorales. Elle n'implique pas la reconnaissance spécifique de l'antigène et de ce fait elle nécessite pas de sensibilisation préalable. Les macrophages, les DC, les cellules NK, les granulocytes et les neutrophiles sont les principaux acteurs de cette première ligne de défense. Dans le cadre de l'immunité anti-tumorale, leur fonction est de répondre immédiatement afin de limiter la prolifération des cellules cancéreuses. Des travaux effectués chez la souris ont montré que bien qu'indispensable au rejet tumoral, l'immunité naturelle est une réponse précoce qui précède et prépare le développement de l'immunité adaptative, via la mise en place d'un réseau cytokinique impliqué dans l'activation de nombreuses cellules immunitaires et par l'intermédiaire de certaines cellules, comme les DC (Palucka & Banchereau, 1999).

II. 2. 2. Les cellules dendritiques

Parmi les trois types de CPA (cellules présentatrices d'antigènes) décrits (macrophages, lymphocytes B et DC), les DC sont les plus spécialisées dans la fonction de présentation et de stimulation des lymphocytes T naïfs. Les DC sont caractérisées par une extrême plasticité phénotypique et fonctionnelle, ce qui leur permet d'intervenir à la fois dans le développement de réponses immunitaires acquises et innées, mais aussi dans l'induction de phénomènes de tolérance (Banchereau *et al.*, 2000; Reis e Sousa, 2006; Steinman, 2003).

II. 2. 2. a. Les différentes populations de DC

Depuis la découverte des cellules de Langerhans en 1868, plusieurs types de DC ont été décrits. Le terme DC regroupe aujourd'hui plusieurs populations cellulaires issues de voies d'ontogenèse distinctes (fig. 6, page 38) (Schott, 2006). L'existence de toutes ces populations mettent en évidence la diversité des DC chez l'homme.

La voie myéloïde donne naissance, sous l'influence du GM-CSF et du TNF α , aux DC dites conventionnelles ou myéloïdes : les cellules de Langerhans, situées au niveau des épithéliums stratifiés, et les DC interstitielles, situées dans les autres tissus. Ces deux populations expriment

de nombreux marqueurs en commun, dont la molécule CD11c, mais différent quant à l'expression d'autres marqueurs comme le CD1a (Caux *et al.*, 1996). Les MoDC (Monocyte-derived dendritic cells), apparentées aux DC myéloïdes et plus particulièrement à la population des DC interstitielles, sont dérivées de monocytes *in vitro*. Bien que les contributions relatives de ces sous-populations de DC au cours de la réponse immunitaire anti-tumorale ne soient pas clairement établies, leurs capacités à capturer puis présenter les antigènes aux cellules effectrices de l'immunité en font des acteurs centraux dans l'établissement d'une telle réponse (Banchereau *et al.*, 2000).

Les DC plasmacytoïdes sont issues de la voie lymphoïde et leur localisation est généralement restreinte aux tissus lymphatiques et au sang périphérique. La principale caractéristique de ces cellules est qu'elles sont capables de produire d'importantes quantités d'IFN de type I suite à une infection virale (Cella *et al.*, 1999; Siegal *et al.*, 1999). Les DC plasmacytoïdes ont été considérées comme étant impliquées quasi-exclusivement dans la réponse anti-virale (Barchet *et al.*, 2005; Liu, 2005). Cependant, une équipe a récemment démontré chez la souris que cette population de DC plasmacytoïdes était capable d'induire l'expansion de CTL spécifiques d'antigènes *in vivo*, le rejet de tumeurs et d'agir en synergie avec les DC myéloïdes (Lou *et al.*, 2007).

Une autre population de DC a été identifiée récemment chez la souris : il s'agit des Interferon-producing Killer Dendritic Cells (IKDC) (Chan *et al.*, 2006; Taieb *et al.*, 2006). Elles pourraient jouer un rôle dans le cadre de l'immunité anti-tumorale mais celui-ci reste encore à préciser, notamment chez l'homme. Leur origine ontogénique n'est cependant pas encore identifiée et leur existence même est aujourd'hui controversée (Caminshi *et al.*, 2007; Vosshenrich *et al.*, 2007).

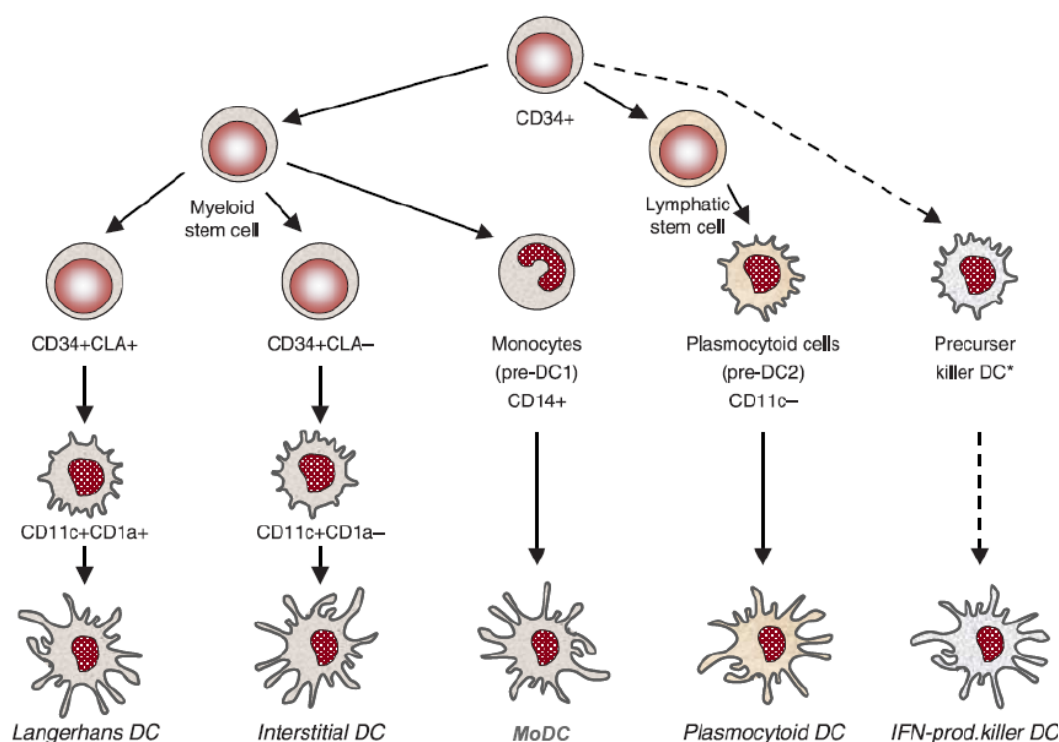


Figure 6: Voies d'ontogénèse à l'origine des DC.

La voie de différenciation myéloïde donne naissance à deux sous-populations de DC : les cellules de Langerhans et les DC interstitielles. Les DC plasmacytoïdes sont générées à partir de la voie lymphoïde. In vitro, il est également possible d'obtenir des MoDC à partir de monocytes. Enfin, une dernière population de DC, les IKDC, a été identifiée récemment et leur origine ontogénique n'est pas connue. (D'après Schott, 2006)

II. 2. 2. b. Capacités de migration des DC

D'une manière simplifiée, les DC sont considérées comme des sentinelles disséminées dans tout l'organisme. Elles internalisent des antigènes au niveau des tissus périphériques puis sont capables de les transporter jusqu'aux ganglions lymphatiques. Les capacités de migration des DC sont indispensables à leur déplacement au sein des tissus périphériques puis à l'atteinte des noeuds lymphatiques.

Lors du développement d'un processus tumoral, les DC sont attirées par certaines molécules synthétisées par les cellules cancéreuses (Rollins, 2006). Une fois arrivées sur le site tumoral, les

DC peuvent prélever des antigènes sur place. Les signaux qu'elles reçoivent dans cet environnement induiraient ensuite des modifications du profil de CCR (Chemokine CC-motif receptor) qu'elles expriment, et leur permettrait d'atteindre les ganglions lymphatiques (Dieu *et al.*, 1998; Randolph *et al.*, 2005; Sallusto *et al.*, 1998; Sozzani *et al.*, 1998). D'autres types de récepteurs, comme les CLR (C-type Lectin Receptors) (Figdor *et al.*, 2002), ou la capacité à sécréter des MMP (Matrix MetalloProteinases) (Ratzinger *et al.*, 2002) sont aussi impliqués dans la migration des DC. Les différentes sous-populations de DC exprimant des panels CCR distincts, elles possèdent des capacités de migration qui diffèrent d'une population à l'autre (Penna *et al.*, 2001; Penna *et al.*, 2002).

II. 2. 2. c. Capture des antigènes et intégration des signaux environnementaux

La nature du matériel antigénique prélevé par les DC est variée : micro-organismes (virus et bactéries), particules opsonisées, protéines ou encore cellules mortes (apoptose ou nécrose). La capacité d'internalisation des DC repose sur les mécanismes d'endocytose, de phagocytose et de macropinocytose qui se distinguent par les récepteurs utilisés, les mécanismes cellulaires mis en jeu, ainsi que par la nature du matériel internalisé.

Les récepteurs intervenant dans la capture des antigènes assurent la reconnaissance des structures antigéniques, le recrutement des éléments du cytosquelette pour réaliser l'internalisation et la transduction de signaux en vue de moduler l'activité cellulaire. Parmi ces récepteurs, certains appartiennent à la famille des lectines (CLR), comme le DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Nonintegrin = CD209), le CD205, le MMR (Macrophage Mannose Receptor) (CD206) (Geijtenbeek *et al.*, 2004) ; des SR (Scavenger Receptors) comme le CD36 (Peiser *et al.*, 2002) ; ou encore des intégrines (CD11b, CD18). Les particules pathogènes opsonisées peuvent aussi être internalisées par des récepteurs au complément (Bajtay *et al.*, 2006). L'ensemble de ces récepteurs n'intervient pas seulement dans l'internalisation de pathogènes mais aussi dans celle de matériel dérivé du soi, comme des composants de cellules tumorales. Par exemple, les lectines permettent aux DC de reconnaître des motifs de glycosylation présents sur des glycoprotéines d'origine tumorale. Elles permettent leur internalisation (Aarnoudse *et al.*, 2006; Figdor *et al.*, 2002) et transmettent des signaux qui dépendent du récepteur impliqué (Mahnke *et al.*, 2003). Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ et certains récepteurs au complément sont

capables de reconnaître des composants spécifiques des cellules apoptotiques (Albert *et al.*, 1998a; Morelli *et al.*, 2003; Nauta *et al.*, 2004). Les récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines (FcR) permettent quant à eux l'internalisation de complexes immuns (Cioca *et al.*, 2006; Dhodapkar *et al.*, 2002).

Tous ces exemples montrent à quel point la diversité des récepteurs exprimés à la surface des DC est importante. Les différentes sous-populations de DC n'expriment pas des panels de récepteurs identiques et leurs capacités de capture antigéniques varient d'une population à l'autre (Villadangos & Schnorrer, 2007).

Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont permis d'établir que l'induction de la maturation des DC avait lieu suite à l'exposition de ces cellules à des signaux externes (De Smedt *et al.*, 1996; Roake *et al.*, 1995; Sallusto & Lanzavecchia, 1994). Simultanément à l'internalisation des antigènes, une DC reçoit des signaux qui « l'informent » sur le type de situation à laquelle elle est confrontée. Certains des récepteurs décrits dans le paragraphe sur l'internalisation des antigènes transmettent des signaux qui dépendent du type d'antigène internalisé. Les DC expriment aussi des récepteurs de type PRR (Pattern Recognition Receptor) spécialisés dans la reconnaissance de structures spécifiques de pathogènes (PAMP = Pathogen Associated Molecular Patterns) puis dans l'induction de l'activation des DC (Janeway, 1992; Medzhitov & Janeway, 2002). Les TLR (Toll-Like Receptors), impliqués principalement dans la reconnaissance micro-organismes dont les virus, font partie des PRR (Akira *et al.*, 2006; Delneste *et al.*, 2007; Takeda & Akira, 2004).

En plus des signaux issus des pathogènes, les DC peuvent intégrer des signaux issus du soi (signaux endogènes). Le système immunitaire a été initialement décrit comme assurant la discrimination entre le soi et le non soi jusqu'à ce que ce concept soit réactualisé par Matzinger qui a proposé la théorie des signaux de danger (Matzinger, 1994). Ces signaux de danger peuvent être représentés par des molécules du soi produites lors d'une inflammation ou de la perte de l'intégrité cellulaire ou tissulaire. C'est le cas des HSP (Heat Shock Proteins), reconnues par de nombreux récepteurs (de type SR, CTR, certains TLR, CD91...) (Basu *et al.*, 2001; Delneste *et al.*, 2002; Srivastava, 2002), des cytokines inflammatoires (TNF α), de l'acide urique (Shi *et al.*, 2003) ou autres (O'Neill *et al.*, 2004). C'est ce type de signaux qui intervient principalement dans le cadre d'une réponse dirigée contre une tumeur.

Enfin, les DC prennent également en compte des informations transmises par les autres cellules du système immunitaire. Par exemple, les cellules NK sont attirées au niveau des sites où l'intégrité de l'organisme est menacée par une infection virale ou le développement d'une tumeur grâce à des chimiokines et les IFN de type I (Moretta *et al.*, 2006). Une fois rendues sur ce site, les cellules NK intègrent elles aussi les signaux environnementaux et en particulier, il a été montré que des cellules NK exposées à l'IL-12 étaient capables d'activer des DC elles-mêmes capables par la suite d'induire une réponse de type Th1 (Marcenaro *et al.*, 2005). L'activation des DC par les NK repose sur la capacité de ces dernières à sécréter des cytokines, en particulier le TNF α et l'IFN γ , suite à l'engagement d'un de leur récepteur activateur, le NKp30, avec des ligands exprimés à la surface des DC (Vitale *et al.*, 2005). Un autre mécanisme impliquant la sécrétion d'IL-18 par les DC immatures et le relargage en retour du facteur de maturation HMGB1 (High-Mobility Group B1) par les NK a été décrit (Semino *et al.*, 2005). L'effet des interactions DC/NK dépendrait aussi du ratio entre ces cellules et pourrait parfois aboutir, non pas à l'activation des DC, mais à leur destruction (Piccioli *et al.*, 2002). Les cellules NKT (Chung *et al.*, 2004; Fujii *et al.*, 2003; Hermans *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2002) et les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Born *et al.*, 2006; Conti *et al.*, 2005; Dieli *et al.*, 2004; Leslie *et al.*, 2002) peuvent aussi induire l'activation des DC par des contacts cellulaires et/ou la production de cytokines. Les lymphocytes B transmettent quant à eux des signaux aux DC via la production de cytokines (sans doute l'IL-10) et d'anticorps et la formation de complexes immuns (Bayry *et al.*, 2005).

II. 2. 2. d. Apprêtement et présentation des antigènes

Les DC présentent des peptides en association avec des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité, aussi appelé HLA, pour Human Leucocyte Antigen, chez l'homme) de classe I et II (CMH-I et -II). L'apprêtement de peptides exogènes pour une présentation sur les molécules du CMH-I, ou présentation croisée (CP), est une spécificité des DC.

Les CMH-I sont des molécules exprimées de manière constitutive par l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme. Elles présentent aux lymphocytes T CD8 des peptides issus de la dégradation de protéines endogènes (c'est à dire synthétisées par les cellules qui présentent le peptide). Les peptides sont pour la plupart issus de protéines du cytosol mais peuvent aussi provenir de protéines défectueuses ou de protéines retrotransloquées depuis le réticulum endoplasmique (figure 7, page 43). Quelle que soit leur origine, ces protéines sont ubiquitinilées (Nandi *et al.*, 2006) puis dégradées par un complexe enzymatique, le protéasome (Janeway Charles A. Jr. and Travers Paul, 1997; Trombetta & Mellman, 2005; van Endert & Villadangos, 2007) (figure 8, page 44). Les peptides qui en résultent accèdent ensuite au réticulum endoplasmique via le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing) (Abele & Tampé, 1999) (figure 8, page 44). Ils sont clivés en peptides de 8 à 10 a.a. puis apprêtés sur les molécules du CMH-I grâce à l'intervention de diverses protéines chaperonnes (calreticuline, ERAAP (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated With Aantigen Processing)) (Paulsson & Wang, 2003; Serwold *et al.*, 2002). Les complexes pCMH-I sont finalement exportés à la surface de la cellule et sont exposés aux lymphocytes T CD8.

Les complexes peptides CMH de classe II (pCMH-II) présentent des épitopes aux lymphocytes T CD4. Si toutes les cellules de l'organisme présentent des peptides en association avec leur CMH-I, seules les CPA possèdent un mécanisme de présentation par le CMH-II aux lymphocytes T CD4 (Germain, 1994). La plupart des peptides présentées dans ce contexte sont issus de la dégradation de protéines internalisées (Neijssen *et al.*, 2005) (figure 8, page 44). Néanmoins, certaines protéines endogènes ont accès aux lysosomes et peuvent être chargées sur des molécules de CMH-II. La dichotomie initialement établie entre la présentation de protéines endogènes par le CMH-I et la présentation de protéines exogènes par le CMH-II ne peut donc pas être appliquée de façon systématique.

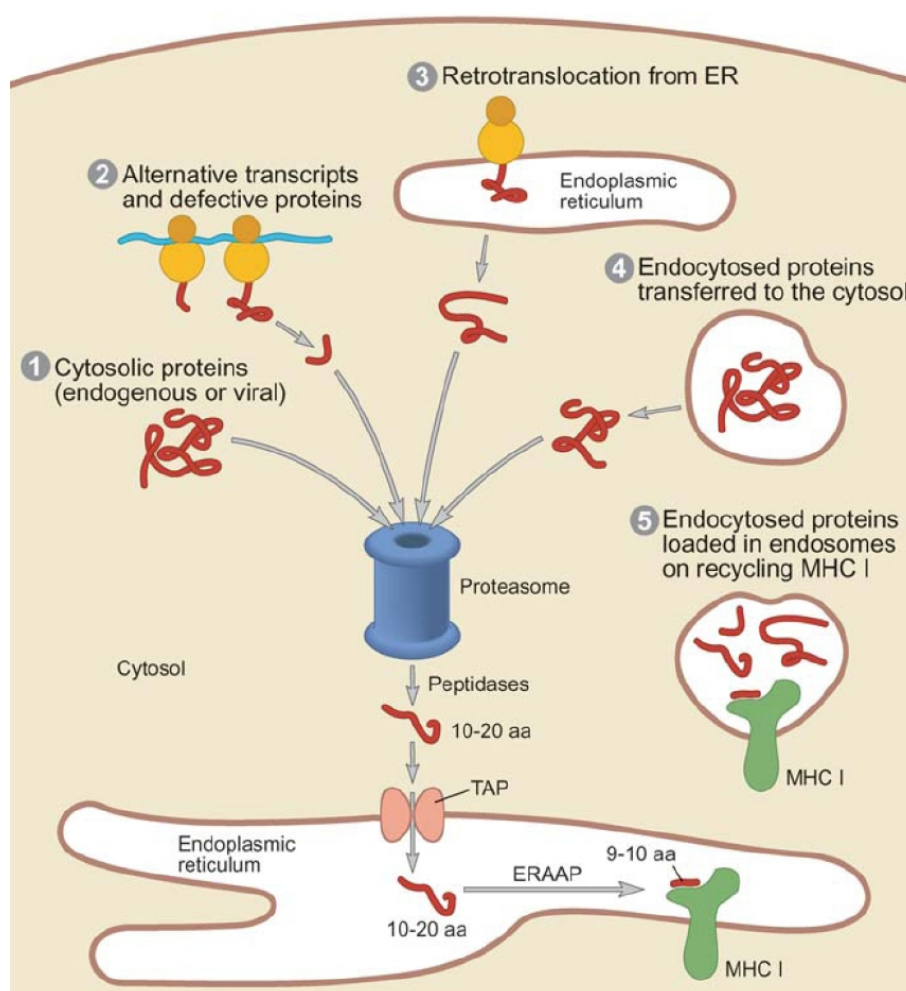


Figure 7: Origines possibles des peptides présentés sur les molécules du CMH de classe I.

Les protéines présentées en association aux molécules de CMH-I dans un contexte de présentation directe peuvent provenir (1) de protéines du cytosol, (2) de produits d'épissage alternatifs ou de protéines défectueuses, ou (3) de protéines retrotransloquées du réticulum endoplasmique (ER) au cytosol. La CP permet de présenter sur le CMH-I (4) des protéines internalisées transférées au cytosol par une voie dépendant du transporteur TAP ou (5) d'une façon indépendante de TAP, directement dans les vésicules d'endocytose, dans lesquelles les molécules de CMH de classe I seraient recyclées à partir de la membrane plasmique. (D'après Trombetta & Mellman, 2005).

Les DC sont capables de présenter des peptides exogènes internalisés sur le CMH-I grâce au processus de CP (Albert *et al.*, 1998b). Plusieurs mécanismes permettant d'expliquer ce phénomène ont été décrits. Les antigènes pourraient être transférés des vésicules d'endocytose vers le cytoplasme des DC (Inaba & Inaba, 2005) ou transiter de cellule à cellule (Neijssen *et al.*,

2005). Une fois dans le cytoplasme, les protéines suivent la voie classique protéasome/TAP/reticulum endoplasmique précédemment décrite (figures 7 et 8, pages 43 et 44). Un autre processus repose sur la fusion des vésicules d'endocytose avec le ER (Guermontprez *et al.*, 2003; Tewari *et al.*, 2005), procurant ainsi aux antigènes internalisés toute la machinerie nécessaire pour le chargement sur le CMH-I. La contribution de cette voie dans le processus de CP reste controversée (Groothuis & Neefjes, 2005; Touret *et al.*, 2005). D'autres modalités sont envisageables mais encore peu explicitées, comme l'échange d'exosomes (vésicules sécrétées par de nombreux types cellulaires dont les cellules tumorales) (Neijssen *et al.*, 2005; Wolfers *et al.*, 2001)

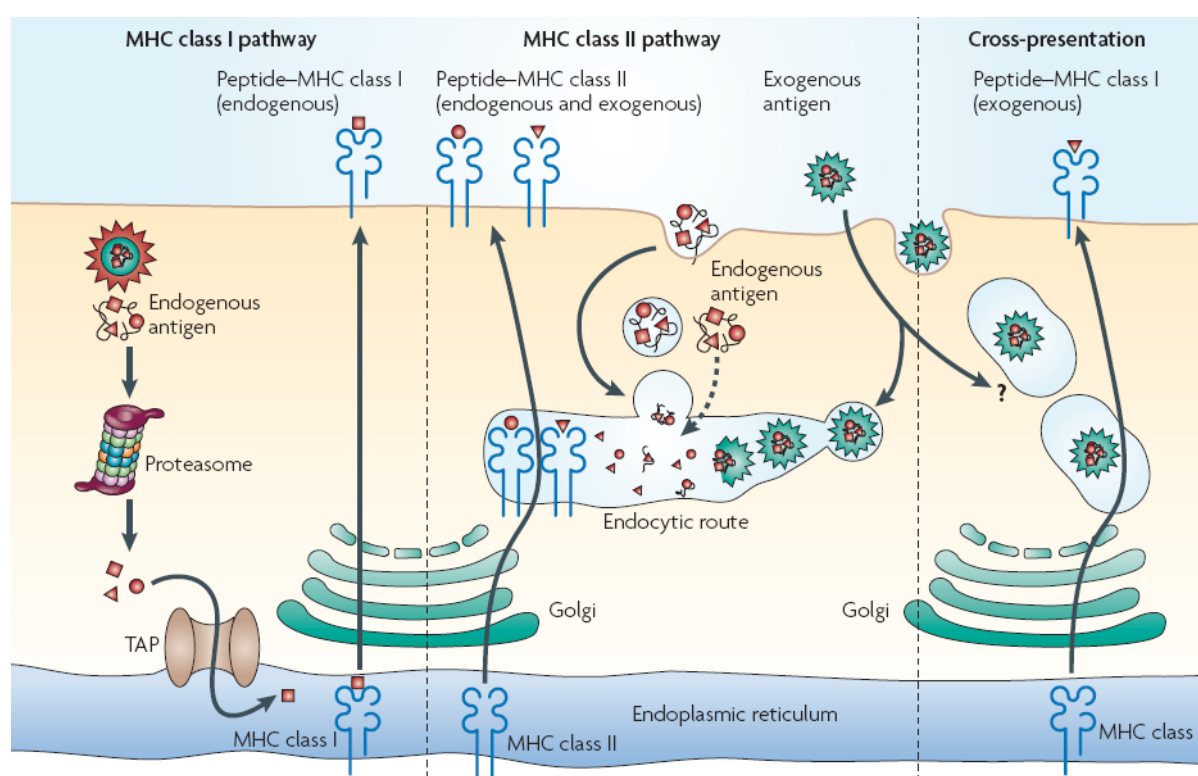


Figure 8: Les différentes voies de présentation utilisées par les DC.

Les molécules CMH-I présentent des peptides issus de la dégradation de protéines provenant du cytosol principalement et synthétisées par la cellule présentatrice. Les molécules CMH-II présentent des peptides provenant de la dégradation de peptides dans les endosomes. Ces peptides proviennent de protéines internalisées, c'est à dire de matériel exogène mais aussi de protéines synthétisées par la cellule elle-même. Les DC présentent en plus la capacité de présenter des antigènes exogènes sur le CMH-I. Les mécanismes impliqués dans ce phénomène de CP sont peu connus. (D'après Villadangos & Schnorrer, 2007)

Outre les molécules CMH-I et CMH-II, les DC expriment une troisième classe de molécules impliquées dans la présentation aux lymphocytes T, les molécules CD1 (Brigl & Brenner, 2004). Les molécules CD1 sont impliquées dans la présentation d'antigènes lipidiques à des effecteurs variés : lymphocytes T $\alpha\beta$, $\gamma\delta$, cellules NK et iNKT (De Libero & Mori, 2005). Les antigènes présentés peuvent être endogènes ou exogènes, et appartenir au soi ou au non-soi (De Libero & Mori, 2006; Hava et al., 2005).

II. 2. 2. f. Activation ou maturation des DC

Parallèlement aux phénomènes d'apprêtement des antigènes, les DC entrent dans un processus d'activation, également qualifié de maturation. L'hypothèse selon laquelle les DC existent sous deux états (immature et mature) (Steinman, 1991) permet d'expliquer de façon simple une réalité biologique qui est en réalité bien plus complexe. Selon cette hypothèse, les DC immatures résident en périphérie, sont douées de capacités de phagocytose importantes mais n'activent pas la prolifération de lymphocytes T naïfs. Les DC immatures sont équipées en récepteurs pour intégrer des signaux environnementaux de type pathogène ou inflammatoire. L'activation de ces récepteurs induit la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires. Au cours de leur migration, les DC deviennent matures, c'est à dire qu'elles acquièrent la capacité à stimuler les lymphocytes T naïfs. D'après ce modèle, le phénomène de maturation est défini par une série de modifications phénotypiques permettant à la DC d'initier une réponse immunitaire efficace.

Cependant, il a été démontré que des DC avec un phénotype mature pouvaient s'avérer incapables d'induire une réponse (Spörri & Reis e Sousa, 2005), voire même d'induire une tolérance (Albert *et al.*, 2001). La notion de maturation doit donc être considérée avec précaution : une DC mature est une DC qui a acquis les moyens de communiquer avec les autres effecteurs du système immunitaire en vue d'induire un certain type de réponse, allant du rejet des antigènes internalisés à l'induction d'une tolérance.

II. 2. 2. g. Activation des effecteurs par les DC

Du fait de leur rôle central dans le déclenchement de réponses immunes, les DC communiquent avec de nombreux types cellulaires de l'immunité adaptative et innée. La transmission des informations des DC aux effecteurs peut s'effectuer par l'intermédiaire des lymphocytes T CD4 ou bien de manière directe.

Après avoir été activés, les lymphocytes T CD4 sont en effet spécialisés dans la fonction de transmission des informations aux différents effecteurs de l'immunité. En fonction des signaux reçus, les lymphocytes T CD4 vont orienter le type de réponse : les lymphocytes T CD4 dits Th1 sécrètent des cytokines favorisant le maintien de l'activité des CTL (IL-12, IFN γ ...) alors que les lymphocytes Th2 sécrètent d'IL-4 et d'IL-10 principalement, favorisent le développement de réponses humorales en stimulant les lymphocytes B (Hung *et al.*, 1998).

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment les DC permettent le recrutement de lymphocytes T CD4 avec un profil Th1 ou Th2 (Reis e Sousa, 2006) (figure 9, page 47). Le modèle de la lignée stipule que chaque sous-population de DC est spécialisée, après activation, dans l'induction d'une immunité de type Th1 ou de type Th2 (Liu, 2001) (figure 9 a, page 47). Le modèle temporel propose qu'une même DC puisse induire successivement une polarisation Th1 puis Th2, en fonction de ses propriétés de présentation et de stimulation qui diffèrent suivant son avancée dans son programme d'activation (Langenkamp *et al.*, 2000) (figure 9 b, page 47). Enfin, dans le modèle de la plasticité, les DC immatures peuvent donner naissance à des cellules capables d'orienter les lymphocytes vers une réponse de type Th1 ou bien Th2 (Kalinski *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2000) (figure 9 c, page 47). Il est probable que la capacité des DC à orienter une réponse de type Th1 ou Th2 dépende à la fois des propriétés intrinsèques de la DC (origine ontogénique), des signaux qu'elle a perçus et de son stade d'activation.

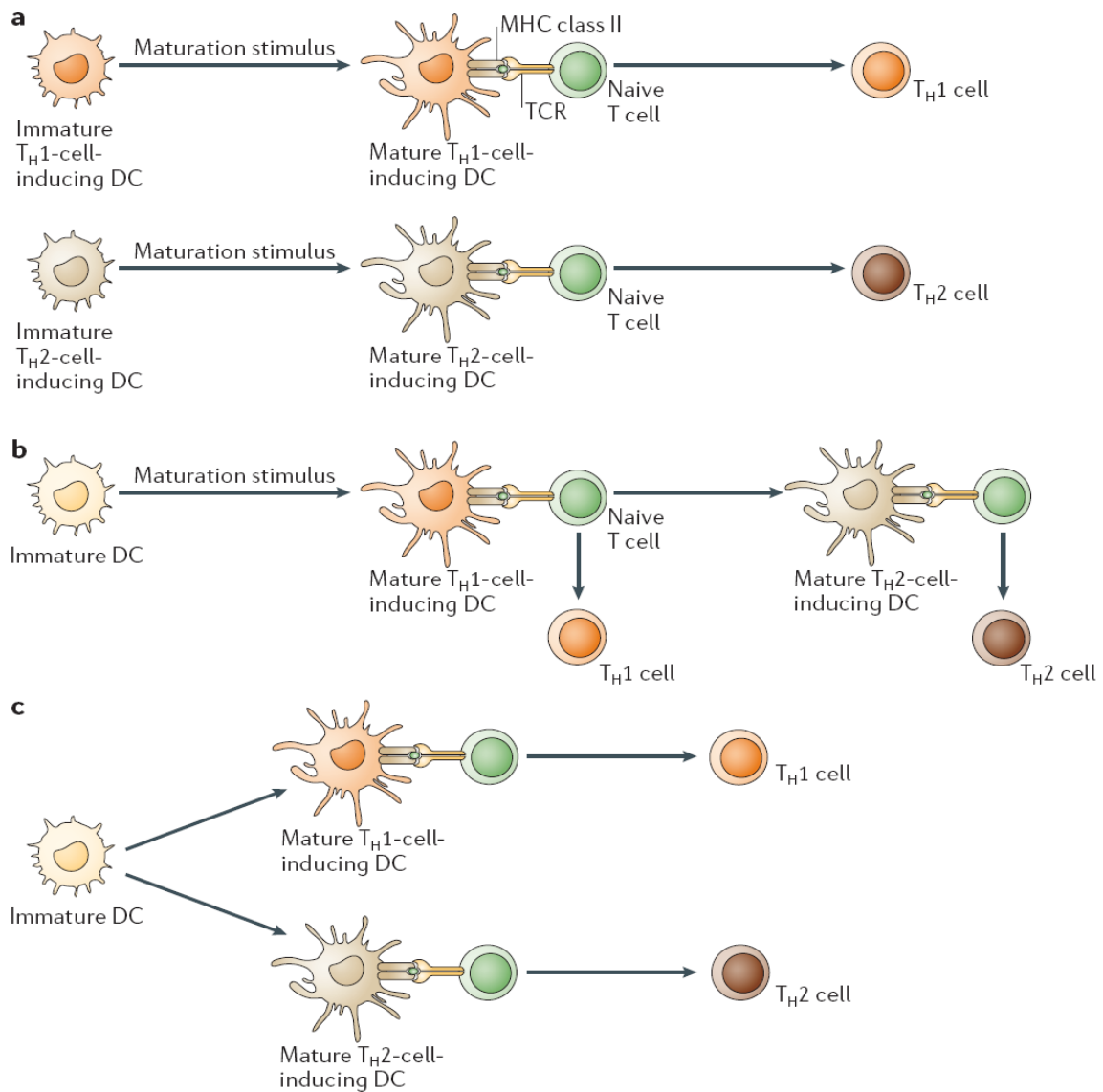


Figure 9: Théories de polarisation $Th1/Th2$ par les DC.

Le modèle de la lignée (a), le modèle temporel (b) et le modèle de la plasticité (c) font partie des modèles qui ont été proposés pour expliquer la capacité des DC à induire la polarisation de la réponse lymphocytaire vers un type $Th1$ ou $Th2$. (D'après Reis e Sousa, 2006)

Les DC sont aussi capables d'interagir de manière directe avec les effecteurs. Ainsi, les DC ont un impact direct sur la survie, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. La communication entre ces deux types cellulaires se ferait soit par contacts cellulaires via des récepteurs d'activation et de survie (Balazs *et al.*, 2002; Litinskiy *et al.*, 2002;

MacLennan & Vinuesa, 2002), soit par le biais de la sécrétion de cytokines (IFN de type I et IL-6) (Jego *et al.*, 2003). L'essentiel de ces communications a été étudié dans le cadre de la réponse immunitaire contre des agents infectieux mais il est probable que les DC interagissent aussi de cette manière avec les lymphocytes B dans le cadre d'une réponse anti-tumorale. Concernant les effecteurs de la branche innée de l'immunité, les interactions entre cellules NK et DC ont fait l'objet de nombreuses études. Nous avons déjà vu que ces deux types cellulaires pouvaient communiquer sur le site périphérique où l'organisme est agressé, ce qui aboutit soit à l'activation, soit à la lyse des DC. Mais la communication peut également avoir lieu dans l'autre sens puisque les DC matures, une fois arrivées dans les organes lymphoïdes secondaires, interagissent avec les cellules NK résidant dans ces organes (Moretta *et al.*, 2006). En effet, il a été montré que les DC peuvent activer les NK et induire chez ces dernières l'acquisition de mécanismes de cytotoxicité *in vitro* (Ferlazzo *et al.*, 2002; Gerosa *et al.*, 2002; Nishioka *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001) et l'augmentation de leur activité anti-tumorale *in vivo* (Fernandez *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2001). Cette activation a lieu par le biais de la sécrétion de cytokines (IL-12, d'IL-18, d'IL-15 ou d'IFN de type I) (Borg *et al.*, 2004; Walzer *et al.*, 2005) ou par contacts cellulaires *via* des interactions entre les molécules MICA/B (MHC class I-related Chain A/B) exprimées par les DC et le récepteur activateur NKG2D exprimé par les NK (Jinushi *et al.*, 2003). Les communications entre DC et NK nécessitent même l'établissement d'une synapse (Borg *et al.*, 2004). Parmi les autres effecteurs de l'immunité innée activables par les DC figurent les NKT et les L γ δ (Conti *et al.*, 2005; Dieli *et al.*, 2004).

En conclusion, les DC jouent un rôle central dans l'induction de réponses immunitaires. Elles sont capables de stimuler de nombreux effecteurs comme d'induire la tolérance vis-à-vis de certains antigènes. Les différents points abordés dans ce chapitre (origine des DC, type d'antigène internalisé et signaux environnementaux, voie d'apprêtement, état d'activation) se sont révélés être liés les uns aux autres et ont un impact crucial sur le type de réponse que la DC induira.

II. 2. 3. Les lymphocytes T cytotoxiques

La partie adaptative du système immunitaire est constituée d'une branche cellulaire, médiée par les lymphocytes T, et d'une branche humorale, qui fait intervenir les lymphocytes B. Les lymphocytes T subissent une étape de maturation dans le thymus : seuls les lymphocytes T capables de reconnaître le CMH du soi sont sélectionnés (sélection positive). Les lymphocytes T présentant une haute affinité pour un peptide du soi associé au CMH sont quant à eux éliminés (sélection négative). A l'issue de cette maturation, les lymphocytes T entrent dans la circulation et gagnent les organes lymphoïdes secondaires. A ce stade, les cellules T CD8 ne sont pas encore capables de lyser des cellules cibles : elles doivent d'abord être activées par des CPA.

II. 2. 3. a. Activation des cellules T CD8, synapse immunologique et signaux d'activation

Le contact entre DC et lymphocyte T conduit à une polarisation du cytosquelette des cellules et aboutit à la concentration de molécules de présentation, de co-stimulation et d'adhésion au sein d'une synapse immunologique. La synapse immunologique s'organise en régions concentriques. La partie centrale, appelée cSMAC (central Supramolecular Activation Cluster), comprend principalement le TCR (T Cell Receptor), interagissant avec les complexes pCMH-I, et les molécules de costimulation. A la périphérie se trouve la région pSMAC (peripheral Supramolecular Activation Cluster), composée des molécules d'adhésion (Friedl *et al.*, 2005).

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

Les signaux de costimulation consistent en l'interaction entre des molécules exprimées à la surface des CPA et leurs ligands exprimés par les lymphocytes T CD8. C'est le cas par exemple de la liaison entre des molécules de la famille B7 (CD80 ou CD86), exprimées par la CPA, au CD28, exprimé par le lymphocytes T (Andersen *et al.*, 2006; Mescher *et al.*, 2006). Une étude réalisée sur des cellules humaines a cependant montré que des CPA exprimant des niveaux élevés d'antigènes et de molécules de costimulation de la famille de B7 n'étaient pas pour autant capables d'induire des CTL efficaces (Albert *et al.*, 2001). Des signaux supplémentaires doivent être apportés par les CPA et / ou les lymphocytes T CD4 pour éviter l'induction d'un état de tolérance (Baxevanis *et al.*, 2000; Mescher *et al.*, 2006), via des interactions entre des molécules appartenant à la famille des TNF / TNFR (TNF / TNF Receptor)(Croft, 2003; O'Neill *et al.*, 2004; Watts, 2005). Certaines molécules, comme le CD28, sont exprimées constitutivement par les lymphocytes T naïfs et seraient parmi les premières à intervenir dans l'interaction avec les DC. L'expansion clonale et la survie des lymphocytes T nécessiteraient ensuite des interactions séquentielles via d'autres protéines (CD28, CD27, OX40 etc.) (Croft, 2003; Kroczeck *et al.*, 2004). Les cytokines interviennent également dans les phénomènes de costimulation. En effet, une équipe a démontré que l'IL-12 (Curtsinger *et al.*, 1999) ainsi que les IFN de type I (Curtsinger *et al.*, 2005) sont nécessaires à la différenciation et à l'amplification clonale des lymphocytes T CD8.

II. 2. 3. b. Mécanismes d'action des lymphocytes T cytotoxiques

La présentation de l'antigène et les signaux de costimulation induisent l'expansion clonale de la cellule T naïve puis la différenciation d'une partie de sa descendance en cellules effectrices, capables de synthétiser les protéines requises pour leur fonction de CTL. Les cellules effectrices migrent alors vers les tissus périphériques grâce à l'expression d'un ensemble de molécules d'adhésion. Lorsqu'un CTL reconnaît l'antigène pour lequel il est spécifique à la surface d'une cellule, il va détruire cette cellule cible. Trois mécanismes différents peuvent être impliqués dans les mécanismes de cytotoxicité des CTL (Andersen *et al.*, 2006; Russell & Ley, 2002).

Le premier d'entre eux est médié par des cytokines, comme l'IFN γ et le TNF, produites et sécrétées tant que la stimulation via le TCR est maintenue (figure 10 a, page 52). Ces cytokines affectent à la fois la cellule en contact avec le CTL mais aussi les cellules situées à distance. Le TNF se fixe sur son récepteur situé sur la cellule cible et induit son entrée en apoptose. L'IFN γ est quant à lui à l'origine de l'augmentation de la présentation de peptides endogènes par les molécules de CMH de classe I et de la synthèse de Fas (CD95) par les cellules cibles. Il inhibe l'angiogénèse (Ikeda *et al.*, 2002), exerce une action anti-proliférative sur les cellules tumorales, effet qui a été décrit dans certaines lignées cellulaires humaines de MPM (Buard *et al.*, 1998), et enfin, agit sur d'autres effecteurs du système immunitaire.

Les deux autres mécanismes font intervenir des contacts directs. Le ligand de Fas (Fas-L), exprimé à la surface des CTLs se lie à son récepteur (Fas ou CD95) situé à la surface de la cellule cible (figure 10 b, page 52) et induit le recrutement de molécules adaptatrices qui conduit à l'induction de l'apoptose de la cellule cible (Krammer, 2000).

Dans le dernier cas, le CTL relargue des protéines (perforines et granzymes) dans l'espace intercellulaire (figure 10 c, page 52). Le mécanisme d'action du système perforines / granzymes repose lui aussi sur l'induction de la cascade apoptotique chez la cellule cible (Talanian *et al.*, 1997).

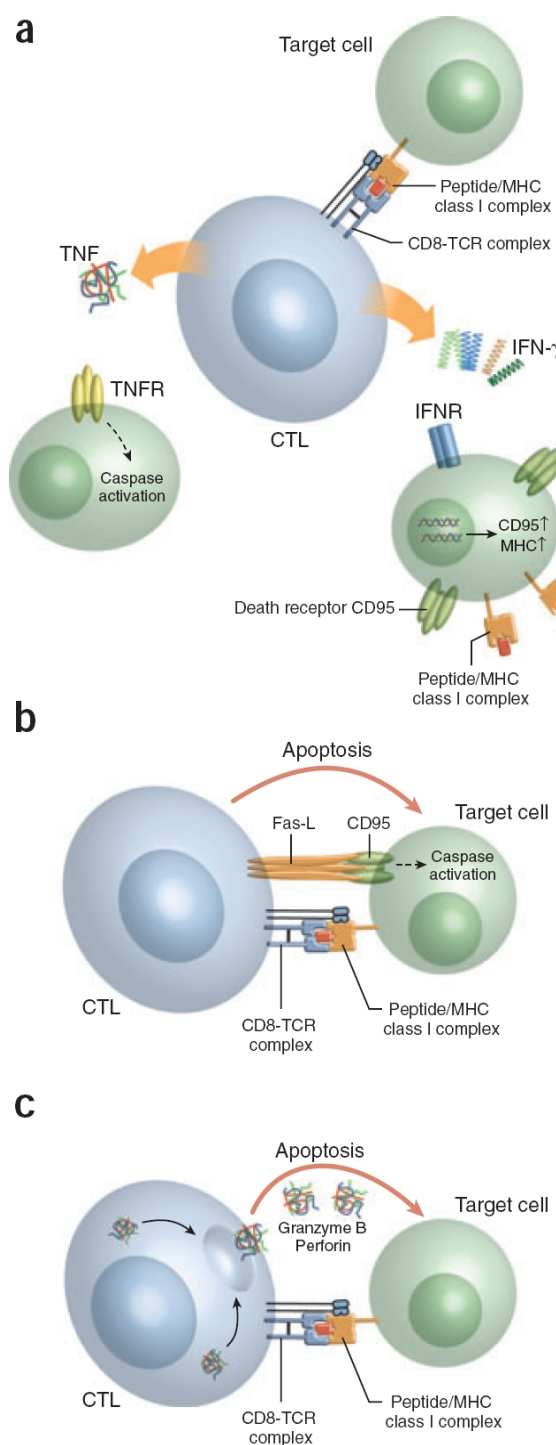


Figure 10 : Mécanismes d'action des CTL.

(a) Les CTL sécrètent du TNF et de l'IFN γ qui induisent l'entrée en apoptose des cellules cibles.

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

(c) Lyse directe par relargage de perforines et de granzyme B dans l'espace intercellulaire.

(D'après Andersen et al., 2006)

II. 2. 4. Les autres cellules effectrices de l'immunité anti-tumorale adaptative

Les lymphocytes T CD4 ont un rôle essentiel dans l'établissement et le maintien d'une réponse anti-tumorale (Assudani *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 1998; Wang, 2001). A l'instar des lymphocytes T CD8, les lymphocytes T CD4 activés sont capables d'induire la lyse de cellules par des systèmes tels que TRAIL, FasL ou encore perforine / granzyme (Echchakir *et al.*, 2000; Ju *et al.*, 1994; Thomas & Hersey, 1998) (figure 11 c, page54). Cependant, la plupart des tumeurs n'expriment pas de molécules de CMH-II à leur surface et ne peuvent donc pas être reconnues directement comme cibles par les lymphocytes T CD4. Le rôle des lymphocytes T CD4 consiste en réalité à orchestrer la réponse immunitaire en communiquant avec les différents effecteurs. Les lymphocytes T de type Th1 produisent des cytokines favorables à l'activité des CTL ou des macrophages (figure 11 b, page54) (Hung *et al.*, 1998). On a longtemps supposé que la capacité des CD4 à induire la génération de CTL était médiée par la sécrétion de cytokines uniquement mais des études ont par la suite montré que les CD4 pouvaient agir directement sur les DC, par l'intermédiaire de l'interaction CD40 / CD40 ligand (Bennett *et al.*, 1998; Ridge *et al.*, 1998; Schoenberger *et al.*, 1998). Ce type de contact a pour effet d'activer la DC à présenter des antigènes aux lymphocytes T CD8 et à les stimuler (figure 11 a, page54). Les lymphocytes Th2 favorisent le développement de réponses humorales en stimulant les lymphocytes B (figure 11 d, page54).

En plus des voies de différenciation Th1 ou Th2, les lymphocytes T CD4 peuvent être orientés vers la voie des lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Treg ne jouent pas un rôle dans l'élimination des cellules tumorales, bien au contraire, puisqu'ils sont à l'origine d'un état de tolérance (Assudani *et al.*, 2007).

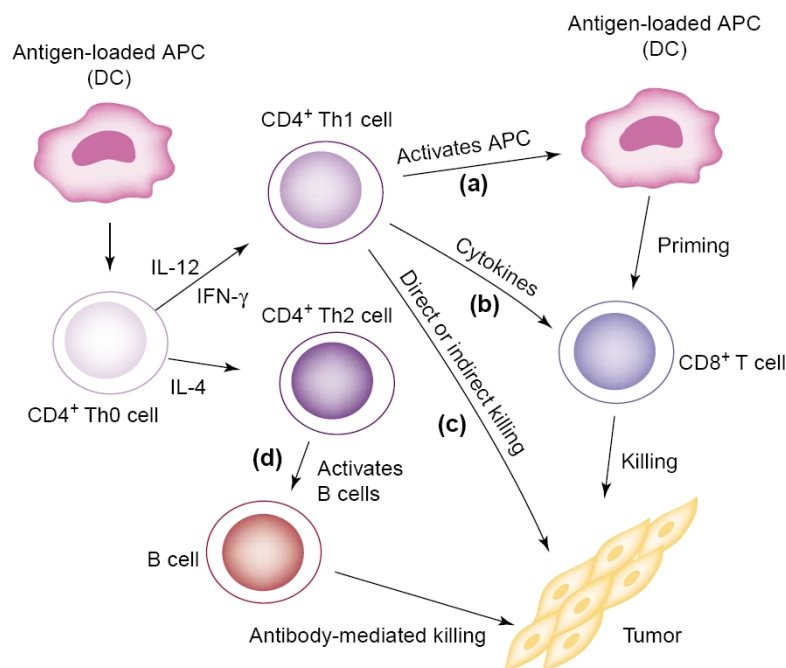


Figure 11 : Implication des lymphocytes T CD4 dans l'élimination des tumeurs.

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

Les lymphocytes B sont les effecteurs de la réponse immunitaire humorale. Une fois activés, ils sont en mesure de se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps dirigés contre des antigènes solubles ou portés par des pathogènes et des cellules cibles. Des anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes tumoraux ont été mis en évidence chez des patients porteurs de tumeurs, y compris dans le cas du MPM (Ho *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 1998). Ces anticorps permettent aux CPA de capter des antigènes de tumeur par l'intermédiaire de leurs FcR puis de présenter ces antigènes aux lymphocytes T. Les cellules tumorales recouvertes d'anticorps peuvent aussi être phagocytées par des CPA par opsonisation, lysées par des cellules de l'immunité innée (NK, macrophages...), par cytotoxicité dépendante des anticorps ou encore par l'action du complément (figure 12, page 55).

Cependant, l'importance de ces lymphocytes B spécifiques dans la réponse anti-tumorale n'a pas été clairement établie. Si la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux est relativement fréquente dans les sérums de patients atteints de cancer, la corrélation avec une

meilleure survie n'est pas évidente et on ne sait pas trop à quel point l'induction d'une réponse humorale est bénéfique pour le patient (Canevari *et al.*, 1996; Gilboa, 1999).

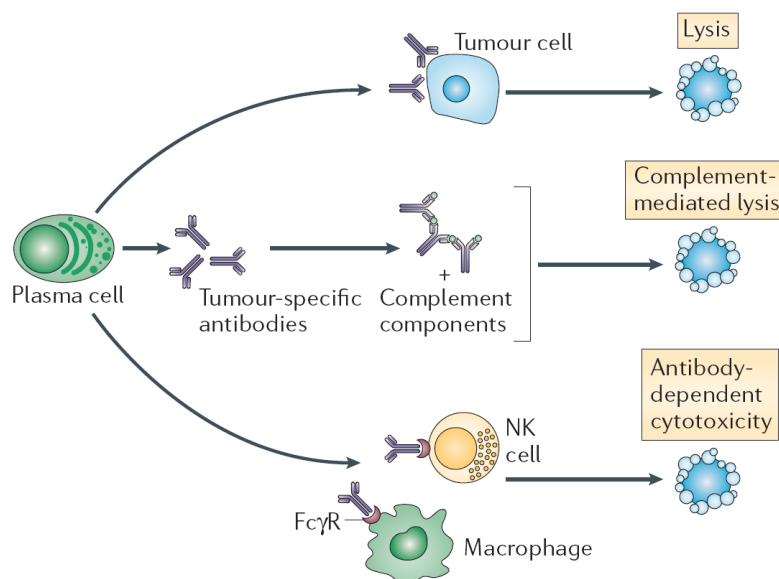


Figure 12: Implication des lymphocytes B dans l'immunité anti-tumorale.

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

Grâce à un réseau de communication basé sur des molécules ou des contacts cellulaires, la réponse immunitaire adaptative se met en place et est orientée vers l'activation de différents types d'effecteurs en fonction des situations rencontrées. Les différents effecteurs et mécanismes de l'immunité adaptative nécessitent plus de temps que ceux de l'immunité innée pour être activés mais ils ont l'avantage d'induire une destruction extrêmement ciblée et spécifique, qui repose sur la reconnaissance de structures propres aux tumeurs.

II.3 Les antigènes de tumeurs

Les cellules tumorales expriment des protéines qui sont peu, voire pas du tout, exprimées par les cellules normales. Ces protéines, ou antigènes associés aux tumeurs (AAT) sont des sources de peptides antigéniques permettant aux CTL de distinguer les cellules tumorales des cellules normales puis de les détruire. Des techniques basées sur des approches génétique, biochimique, sérologique ou encore d'immunologie inverse ont été mises au point et ont permis l'identification d'un nombre important d'épitopes dérivés de ces AAT.

Historiquement, les premiers AAT identifiés étaient exprimés par les cellules de mélanome. Depuis, de nombreuses études ont été réalisées dans d'autres types de cancers et la liste des antigènes de tumeurs humains connus ne cesse de s'allonger (<http://www.cancerimmunity.org/static/databases.htm>). Il est possible de classer les AAT de nombreuses façons, par exemple en tenant compte de leur profil d'expression dans les tumeurs et les tissus (figure 13, page 56).

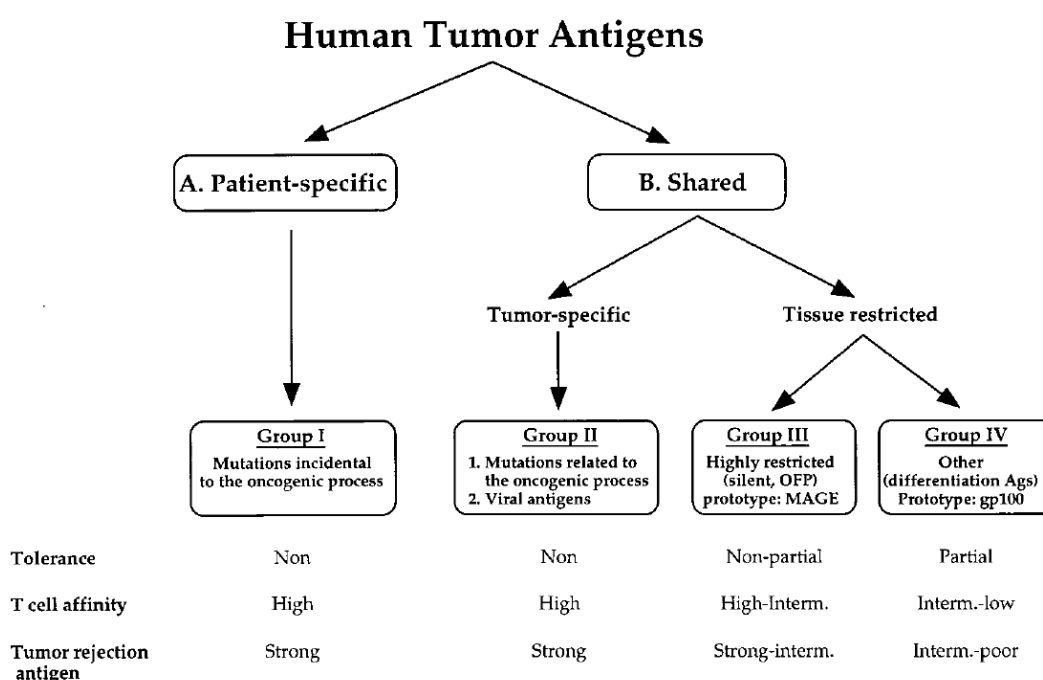


Figure 13: Classification des antigènes de tumeur reconnus par les CTL.

Quatre groupes d'AAT peuvent être définis en fonction de leur profil d'expression. (Gilboa, 1999)

II.3.1 Groupe I : Les antigènes spécifiques de patients

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

II.3.2 Groupe II : Les antigènes spécifiques de tumeurs

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

- les antigènes issus de mutations participant au processus oncogénique et donc susceptibles d'être partagées par plusieurs individus. Par exemple, des mutations affectant le gène codant pour la β -caténine, une protéine impliquée dans l'adhérence cellulaire et dans la voie de signalisation Wnt, sont décrites dans différents types de cancers humains (Ilyas *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997; Rubinfeld *et al.*, 1997). Les mutations décrites concernent des sites de phosphorylation et sont à l'origine d'une augmentation de la stabilité de la protéine mutée. Elle forme alors de manière constitutive des complexes avec des facteurs de transcription comme le TCF (T-Cell Factor) / LEF-1 (Lymphoid Enhancer Factor-1) (Eastman & Grosschedl, 1999) et induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et du développement tumoral (une liste de gènes cibles est disponible à l'adresse suivante : <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>).

- les antigènes viraux dérivés des virus oncogènes. Ils constituent une autre catégorie d'AAT potentiellement pertinents pour l'immunothérapie anti-tumorale. Un certain nombre d'antigènes viraux a été étudié en détails dans des modèles de tumeurs viro-induites chez la souris et ils se sont avérés efficace pour induire le rejet tumoral (Kast *et al.*, 1989; Kast & Melief, 1991; Klarnet *et al.*, 1989; Plata *et al.*, 1987). Chez l'homme, des CTL spécifiques de tumeur peuvent être induits *in vitro* via des sensibilisations de lymphocytes T CD8 naïfs par des peptides E7 du HPV16 (Human PapillomaVirus, présent dans la plupart des carcinomes cervicaux) (Ressing *et al.*, 1995).

II.3.3 Groupe III : Les antigènes partagés à expression tissulaire restreinte

La famille des CTA (Cancer Testis Antigens), à laquelle appartiennent les antigènes codés par les familles multigéniques MAGE (melanoma antigens) ou NY-ESO-1 par exemple, en sont les principaux représentants. Ces antigènes sont codés par des gènes silencieux dans les tissus sains, à l'exception des testicules et pour certains, du placenta, mais ré-exprimés dans de nombreux types de tumeurs (Scanlan *et al.*, 2004). Dans la mesure où les cellules germinales testiculaires et les cellules du trophoblaste n'expriment pas de molécule du CMH-I (Haas *et al.*, 1988), l'expression de ces antigènes peut être considérée comme spécifique de tumeur. L'activation des gènes de la famille MAGE résulte généralement d'une déméthylation de leurs promoteurs (De Smet *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 1996) et est partagée par différents types de tumeurs (mélanomes, carcinomes ovarien et rénal, cancer de la vessie). Ces antigènes représentent des cibles intéressantes en immunothérapie.

II.3.4 Groupe IV : Antigènes de différenciation (MSLN) et sur-exprimés (MUC-1)

Les antigènes de différenciation sont exprimés par des tissus sains et par plusieurs types de tumeurs. La plupart des antigènes de différenciation ont été identifiés dans le mélanome (tyrosinase, gp100, Melan-1/MART1) mais il en existe un qui a été décrit dans le MPM : la MSLN, initialement décrite comme l'antigène reconnu par l'anticorps K1 (Chang *et al.*, 1992a). L'expression tissulaire de cet antigène s'est révélée être relativement limitée (plèvre, péricarde et péritoine) ce qui en fait une cible idéale pour l'immunothérapie (Chang *et al.*, 1992b).

La MSLN est une protéine assez immunogène puisque des réponses humorales et cellulaires ont été détectées vis-à-vis de cet antigène chez des patients atteints de cancer. Ainsi, il a été rapporté qu'environ 40% des patients atteints d'un mésothéliome ou d'un cancer de l'ovaire présentent des taux élevés d'anticorps dirigés contre cet antigène (Ho *et al.*, 2005). De plus, au cours d'un essai de vaccination basé sur l'injection de lignées tumorales autologues sécrétant du GM-CSF réalisé sur des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique, une réponse immunologique a été détectée chez certains patients (Jaffee *et al.*, 2001). L'étude des populations lymphocytaires de ces patients a par la suite permis d'établir que cette réponse était associée à une réponse CTL dirigée contre la protéine MSLN dans trois contextes HLA différents (HLA-A2, -A24 et -A3) (tableau 4, page 59) (Thomas *et al.*, 2004). Les CTL d'un des patients de cette étude ont même démontré leur capacité à lyser des lignées tumorales. Une autre équipe a réussi à générer des lignées de CTL à partir de PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de donneurs sains et de patients atteints de cancer (Yokokawa *et al.*, 2005). Ces lignées sont dirigées contre l'épitope (447-456) de la MSLN et sont capables de lyser des lignées tumorales de diverses origines quand celles-ci sont HLA-A2 et expriment la MSLN. Enfin, une équipe a récemment induit une réponse CTL dirigée contre un épitope de la MSLN chez des souris transgéniques HLA-A2 en les vaccinant avec de l'ADN codant pour un trimère constitué de la β 2-microglobuline (β 2M), une molécule HLA-A2 et de l'épitope MSLN₍₅₄₀₋₅₄₉₎ (Hung *et al.*, 2007). Ce protocole de vaccination a en outre conféré à des souris une protection vis-à-vis de cellules tumorales exprimant la molécule HLA-A2 et la MSLN. L'ensemble de ces études montre donc l'intérêt potentiel de cet antigène en immunothérapie.

Séquence épitope	Position	Éléments de restriction	Références
SLLFLLFSL	20-28	HLA-A2	(Thomas <i>et al.</i> , 2004)
KLLGPHVEGL	447-456	HLA-A2	(Yokokawa <i>et al.</i> , 2005) (Hung <i>et al.</i> , 2007)
VLPLTVAEV	530-538	HLA-A2	(Thomas <i>et al.</i> , 2004) (Yokokawa <i>et al.</i> , 2005)
ELAVALAQK	83-91	HLA-A3	(Thomas <i>et al.</i> , 2004)
ALQGGGPPY	225-233	HLA-A3	(Thomas <i>et al.</i> , 2004)
FYPGYLCSL	435-443	HLA-A24	(Thomas <i>et al.</i> , 2004)
LYPKARLAF	475-483	HLA-A24	(Thomas <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 4: Epitopes de la MSLN pour lesquels des CTL spécifiques ont été décrits.

Les numéros des positions ont été attribués d'après la séquence de la MSLN variant 1 (voir annexe 1).

MUC-1 appartient à la famille des mucines, famille caractérisée par le niveau extrêmement élevé de motifs glycaniques liés à la protéine par des liaisons O-glycosidiques (fixation sur les a.a. T et S). MUC-1 fait partie des mucines attachées à la membrane cellulaire et est constituée d'un domaine intracellulaire de 69 a.a.; d'un domaine transmembranaire et d'une région extracellulaire qui constitue la partie la plus importante de la protéine. Ce domaine extracellulaire contient une région appelée VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), formée par un nombre élevé de répétitions (entre 20 et 120 selon les individus et les tissus dans lesquels la protéine est exprimée) d'une séquence de 20 a.a. (figure 14, page 60). (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 2002). MUC-1 est exprimée par de nombreux types de tissus et elle est sur-exprimée par de nombreuses cellules tumorales.

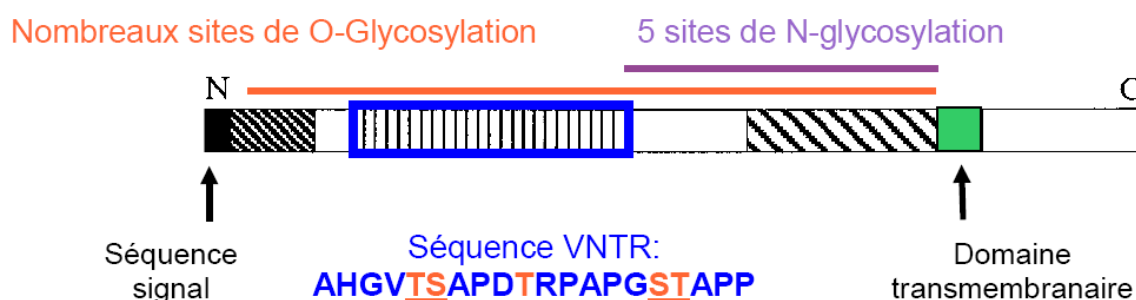


Figure 14: Représentation schématique de la protéine MUC-1.

La zone extracellulaire est la plus importante de la protéine, et la région VNTR (en bleu) en constitue la majeure partie. La protéine présente de nombreux sites de O-glycosylation sur l'ensemble du domaine extracellulaire (en rouge) mais la fréquence la plus élevée de ces sites se situe dans la zone VNTR. 5 sites de N-glycosylation sont aussi répartis sur l'ensemble de la partie extracellulaire (en violet). La séquence peptidique de la protéine MUC-1 figure en annexe 2.

La protéine MUC-1 est responsable de l'induction de réponses humorales dans plusieurs types de cancers (Burchell *et al.*, 1984; Gourevitch *et al.*, 1995; Kotera *et al.*, 1994; Snijdwint *et al.*, 1999; von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 1996). Les cellules tumorales présentent des modifications importantes de la glycosylation sur MUC-1 et certains de ces anticorps reconnaissent donc spécifiquement des formes dites « tumorales » de cette protéine (Wittel *et al.*, 2001; ten Berge *et al.*, 2001).

Les premières réponses CTL détectées contre la protéine MUC-1 étaient non restreintes à une molécule du CMH de classe I (Barnd *et al.*, 1989; Jerome *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1994). Il est possible en effet que les TCR de ces CTL soient engagés de manière directe aux nombreuses répétitions du domaine VNTR présentes sur la partie extracellulaire de la protéine (Finn *et al.*, 1995). En 1995 cependant, une équipe a réussi à isoler des CTL spécifiques d'un épitope de MUC-1 restreint dans plusieurs contextes HLA (Doménech *et al.*, 1995). Puis, d'autres études réalisées sur des modèles de souris transgéniques (Carmon *et al.*, 2000; Heukamp *et al.*, 2001) ou chez l'homme (Brossart *et al.*, 1999; Milazzo *et al.*, 2003; Tsang *et al.*, 2004) ont permis de générer des CTL spécifiques d'autres épitopes et les capacités de lyse de certains ont été testées sur des lignées tumorales *in vitro* (tableau 5, page 61).

Séquence épitope	Position	Éléments de restriction	Références
GTQSPFFLL	4-13	HLA-A2	(Tsang <i>et al.</i> , 2004)
LLLLTVLTV	12-20	HLA-A2	(Brossart <i>et al.</i> , 1999) (Carmon <i>et al.</i> , 2000) (Brossart <i>et al.</i> , 2001) (Milazzo <i>et al.</i> , 2003)
LLLTVLTVV	13-21	HLA-A2	(Carmon <i>et al.</i> , 2000)
STAPPAHGV	9 à 17 (du VNTR)	HLA-A1, -A0201, -A3, -A11	(Doménech <i>et al.</i> , 1995)
TLAPATEPA	79-87	HLA-A0201	(Heukamp <i>et al.</i> , 2001)
ATWGQDVTSV	92-101	HLA-A2	(Tsang <i>et al.</i> , 2004)
WGQDVTSVPV	94-103	HLA-A2	(Tsang <i>et al.</i> , 2004)
ALGSTAPPV	167-175	HLA-A0201	(Heukamp <i>et al.</i> , 2001)
FLSFHISNL	264-272	HLA-A0201	(Carmon <i>et al.</i> , 2000) (Heukamp <i>et al.</i> , 2001)
STAPPVHNV	950-958	HLA-A2	(Brossart <i>et al.</i> , 1999) (Brossart <i>et al.</i> , 2001) (Milazzo <i>et al.</i> , 2003)
TLASHSTKTD	1004-1013	HLA-A2	(Tsang <i>et al.</i> , 2004)
LQRDISEMFL	1069-1078	HLA-A2	(Tsang <i>et al.</i> , 2004)
NLTISDVSV	1133-1141	HLA-A2	(Carmon <i>et al.</i> , 2000)
TISDVSVSDV	1135-1144	HLA-A2	(Tsang <i>et al.</i> , 2004)
ALLVLVCVL	1162-1170	HLA-A2	(Carmon <i>et al.</i> , 2000)
LLVLVCVLV	1163-1171	HLA-A2	(Carmon <i>et al.</i> , 2000)
SLSYTNPAV	1240-1248	HLA-A2	(Carmon <i>et al.</i> , 2000)

Tableau 5: Épitopes de MUC-1 pour lesquels des CTL spécifiques ont été décrits.

Les épitopes indiqués en gras ont démontré une activité cytotoxique sur des lignées tumorales variées *in vitro*.

Il semble donc possible d'induire des réponses CTL efficaces contre plusieurs épitopes de MUC-1 et cela renforce l'intérêt de cette protéine en tant que cible d'immunothérapie. Un des inconvénient de cette protéine réside dans le fait qu'elle est exprimée par la quasi-totalité des cellules de l'organisme (manque de spécificité).

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

Comme nous l'avons vu, l'organisme dispose de nombreux moyens afin de lutter contre les tumeurs, mais celles-ci acquièrent petit à petit des caractéristiques leur permettant d'échapper à la surveillance du système immunitaire.

II. 4. 1 Vue d'ensemble des mécanismes d'échappement

II. 4. 1. a) Diminution de la présentation des antigènes tumoraux

La reconnaissance des cellules tumorales dépend principalement de la reconnaissance d'AAT par les CTL. Plusieurs alternatives permettent de limiter ou d'empêcher cette reconnaissance et donc aux cellules tumorales d'échapper à la lyse par les CTL. Les cellules qui résistent survivent et leur prolifération aboutit à l'apparition de variants résistants :

- Inhibition de l'apprêtement et / ou de la présentation de peptides antigéniques. De tels phénomènes ont été fréquemment rapportés dans de nombreuses tumeurs (Chang *et al.*, 2004; Drake *et al.*, 2006; Garcia-Lora *et al.*, 2003). Des diminutions de l'expression des molécules du CMH-I (totales ou partielles) ont été décrites dans de nombreux types de cancers (Garcia-Lora *et al.*, 2003)(Drake *et al.*, 2006). De plus, des mutations ou des délétions des gènes codant les protéines du CMH-I (chaîne lourde ou $\beta 2M$) ou les protéines impliquées dans l'assemblage du complexe pCMH-I (enzymes du protéasome, protéines chaperonnes, TAP, etc.) peuvent être à l'origine d'une absence de présentation des peptides antigéniques aux CTL. Enfin, la perte de la capacité de réponse cellulaire aux IFN α ou γ est considérée comme un mécanisme d'échappement via la diminution d'expression du CMH-I (Garcia-Lora *et al.*, 2003).

- Absence d'expression d'AAT. Chez l'homme, la perte d'expression d'antigènes, et par conséquence leur absence de présentation, a été observée principalement chez des patients atteints de mélanome (Jäger *et al.*, 1997; Ohnmacht *et al.*, 2001; Riker *et al.*, 1999; Schmollinger *et al.*, 2003; Slingluff *et al.*, 2000). En outre, il n'est sans doute pas indispensable qu'un antigène ne soit plus du tout exprimé pour qu'il ne soit plus reconnu. En effet, l'avidité des TCR portés par les CTL spécifiques des antigènes tumoraux (dont certains sont dérivés de peptides du soi) peut être faible (Chang *et al.*, 2004). La densité en complexes pCMH-I exprimé à la surface de la cellule cible doit alors être suffisamment importante pour pouvoir dépasser le seuil d'activation des CTL. Il suffit donc que le nombre de pCMH-I soit suffisamment faible pour que le seuil d'activation des CTL ne soit pas atteint.
- Mutation des AAT. Un antigène muté peut toujours être exprimé par la cellule tumorale mais la mutation peut empêcher la génération des épitopes. Une mutation de la protéine p53 à l'origine d'un défaut de génération du peptide reconnu par les CTL a en effet été décrite (Hoffmann *et al.*, 2000).

II. 4. 1. b) Echappement à la lyse

Des interférences avec les voies de signalisation pro-apoptotiques, l'expression de molécules anti-apoptotiques (IAP et protéines appartenant à la famille de Bcl-2) ou la sous-expression de molécules pro-apoptotiques (Bax, Bid etc.) sont fréquemment rencontrées dans les tumeurs (Igney & Krammer, 2002). Or, la capacité des CTL et des NK à lyser les cellules tumorales passe par l'activation des voies de l'apoptose. Une résistance à l'apoptose aboutit donc à l'échappement de la tumeur à la surveillance du système immunitaire. En plus de ces mécanismes généraux de résistance à l'apoptose, des résistances spécifiques à la voie des perforines-granzymes et des récepteurs à domaines de mort cellulaire ont été décrites.

L'expression de la serpine PI9 (Protease Inhibitor 9) constituerait ainsi un mécanisme d'échappement tumoral à la réponse immunitaire (Medema *et al.*, 2001). Cette protéine est un inhibiteur du granzyme B. Son rôle physiologique serait de protéger les DC au cours de l'activation des CTL (Medema *et al.*, 2001) ou encore les CTL eux-mêmes au cours de la dégranulation (Hirst *et al.*, 2003). La cathepsine B, quant à elle, inactive la perforine et son

expression pourrait aussi constituer un mécanisme d'échappement (Yan *et al.*, 1998).

De nombreuses stratégies d'échappement à l'apoptose dépendante de la voie des récepteurs à domaine de mort (Fas-FasL) ont été rapportées (Malmberg & Ljunggren, 2006) : surexpression de FLIP (FLICE-[Fas-associated death domainlike IL-1 β -converting enzyme]-Inhibitory Protein), perte d'expression et / ou de fonction des récepteurs Fas ou TRAIL, ou encore relargage de facteurs solubles, tels que des récepteurs Fas ou DcR3 (Decoy Receptor 3).

Enfin, d'autres mécanismes permettent aux cellules tumorales d'échapper à la lyse induite par le complément (Jurianz *et al.*, 1999). Par exemple, parmi les mécanismes de résistance à cette voie, la sur-expression de protéines inhibitrices du complément (CD46, CD55, CD59) permet aux cellules tumorales de bloquer la cascade d'activation (Gorter & Meri, 1999; Macor & Tedesco, 2007).

II. 4. 1. c) Induction d'une tolérance

- Tolérance centrale. L'un des principaux obstacles à la génération d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace provient du fait que les tumeurs sont dérivées des tissus sains. En effet, le système immunitaire maintient un répertoire de lymphocytes T possédant une forte avidité pour les antigènes étrangers (du non-soi) mais limite l'activité des lymphocytes T capables de reconnaître les antigènes du soi (sélection négative). Dans la mesure où les tumeurs expriment essentiellement des antigènes proches du soi, la tolérance centrale est mise à profit par la tumeur pour échapper à la réponse. L'importance de ce phénomène de tolérance dépend bien évidemment de l'antigène considéré puisqu'ils sont plus ou moins proches des protéines du soi et donc plus ou moins immunogènes (voir précédemment les différents groupes d'antigènes) (McMahan & Slansky, 2007).
- Une stratégie développée par les tumeurs consiste à baisser le plus possible les signaux d'activation perçus par les effecteurs. En effet, les cellules NK et les lymphocytes T sont capables de percevoir et d'intégrer des signaux activateurs et des signaux inhibiteurs. C'est la balance entre l'ensemble des signaux qui détermine s'ils vont être activés ou au contraire inhibés au contact d'une cellule. Un défaut d'expression des molécules de co-stimulation

B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) ainsi que des molécules d'adhésion LFA-3 (Leucocyte Function Antigen-3) et ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecule-1) à la surface des cellules tumorales contribue ainsi à la faible immunogénicité des cancers (El Hage *et al.*, 2008).

- Les tumeurs sont aussi capables d'apporter des signaux d'inhibition aux effecteurs afin d'abolir leur réponse. Le récepteur NKG2D est exprimé entre autre par les cellules NK et les lymphocytes T. Ce récepteur est impliqué dans la reconnaissance des tumeurs exprimant MICA par les cellules NK et dans la costimulation des lymphocytes T et des cellules NK. La présence de formes solubles de MICA produites par les cellules tumorales a été associée à une sous-expression du récepteur NKG2D par les cellules NK et les lymphocytes T des patients (Groh *et al.*, 2002; Salih *et al.*, 2002) et est à l'origine d'une altération de l'activation des NK et des lymphocytes T (Chang & Ferrone, 2006). L'expression des molécules HLA-E, -G ou CD48 à la surface des tumeurs leur permet de faire pencher la balance vers l'inhibition et abolit la réponse de ces effecteurs (Malmberg & Ljunggren, 2006). Parmi les autres mécanismes immuno-suppresseurs utilisés par les cellules tumorales, on peut également citer la production de cytokines aux propriétés immuno-suppressives (TGF β , IL-10, IL-6, etc.) ou encore la synthèse de l'enzyme IDO (indoléamine 2,3 dioxygénase) (Kim *et al.*, 2007; Lu & Finn, 2008; Zamanakou *et al.*, 2007).
- Les cellules tumorales peuvent même contre-attaquer les effecteurs et induire leur destruction. L'expression de FasL par les cellules tumorales, en l'absence de facteurs de croissance, pourrait induire l'apoptose des lymphocytes T au contact de la tumeurs via le récepteur Fas (Igney & Krammer, 2005). La production de molécules HLA-G1 par les cellules tumorales induit une augmentation de Fas par les lymphocytes T et about finalement à la lyse de ces lymphocytes par des interactions de type Fas-FasL (Fournel *et al.*, 2000). La molécule B7-H1 (aussi connue sous le nom de PD-L1 pour Programed Death receptor Ligand 1) pourrait aussi induire la lyse des lymphocytes par l'intermédiaire de PD-1 ou d'autres récepteurs (Dong *et al.*, 2002; Dong & Chen, 2003). Enfin, la stimulation continue de lymphocytes T par les cellules cibles induirait la délétion de ces effecteurs par AICD (activation-induced cell death) (Molldrem *et al.*, 2003).

- Enfin, il est possible que l'immuno-suppression soit médiée par des cellules de l'immunité elles-mêmes. La présence de Treg dans l'environnement tumoral a été décrite dans de nombreux cancers. Ces T reg seraient attirés par certaines molécules (CCL20 (Chemokine CC-motif Ligand-20), TGF β) produites par les tumeurs (Betts *et al.*, 2006). Cette population lymphocytaire se caractérise par la sécrétion de cytokines immunosuppressives (TGF β et IL-10 principalement) et par l'expression de molécules de surfaces telles que Lag3 (Lymphocyte activation gene-3), CTLA-4 et GITR (Glucocorticoid induced TNF receptor) et du facteur de transcription FOXP3. Le mode d'action des Treg n'est pas encore totalement élucidé mais il est clair qu'ils agissent de plusieurs manières sur les effecteurs. Par exemple, ils sont capables d'inhiber les DC et les lymphocytes T et B par contact direct et par la production de cytokines (Mottet & Golshayan, 2007). Les Treg peuvent ainsi avoir une action générale mais aussi induire une tolérance spécifique d'un antigène. La déplétion de ces populations de Treg a permis d'induire le rejet de tumeurs chez des souris, soulignant l'importance des Treg dans l'échappement des tumeurs à la réponse immunitaire (Shimizu *et al.*, 1999; Turk *et al.*, 2004). Plusieurs approches thérapeutiques visant à dépléter une partie des Treg (utilisation d'anticorps ou de drogues) ont été envisagées en thérapie anti-cancéreuse afin de restaurer une réponse efficace contre les tumeurs (Beyer & Schultze, 2006; Mottet & Golshayan, 2007).

II. 4. 2 Les mécanismes d'échappement développés par le MPM

Dans la mesure où nous nous intéressons à la réactivation du système immunitaire afin d'éliminer les cellules de mésothéliome, il est important d'avoir une idée des mécanismes d'échappement développés par ce cancer.

Peu de données sont disponibles sur les capacités de présentation des antigènes tumoraux par les cellules de mésothéliome. Cependant, il semble que l'expression des molécules de CMH-I soit conservée (Christmas *et al.*, 1991; Kleinberg *et al.*, 2006). La sur-expression de molécules anti-apoptotiques ou au contraire la sous-expression de molécules pro-apoptotiques ont été décrites, ainsi que certains des mécanismes responsables de l'induction d'une tolérance (voir tableau 6, page 67).

Mécanisme(s)	Référence(s)
Diminution de la présentation des antigènes	
Les niveaux d'expression de molécules de CMH-I semblent normaux	(Kleinberg <i>et al.</i> , 2006) (Christmas <i>et al.</i> , 1991)
Mutation sur CMH-I, β 2-microglobuline, protéines intervenant dans l'apprêtement des antigène (TAP, calreticuline etc.)	(-)
Niveau d'expression des antigènes	(-)
Résistance à l'apoptose et à la lyse	
Perte d'expression de molécules pro-apoptotiques (Bad, Bak, Bax...)	(O'Kane <i>et al.</i> , 2006)
Expression de molécules anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2	(Segers <i>et al.</i> , 1994) (Soini <i>et al.</i> , 1999) (O'Kane <i>et al.</i> , 2006)
Expression d'IAP (Inhibitor of apoptosis protein) (XIAP, survivin...)	(Zaffaroni <i>et al.</i> , 2007) (Kleinberg <i>et al.</i> , 2007) (Gordon <i>et al.</i> , 2007) (Wu <i>et al.</i> , 2005) (Falleni <i>et al.</i> , 2005) (Gordon <i>et al.</i> , 2002)
Résistance à la voie granzyme/perforine	(-)
Surexpression de FLIP	(Rippo <i>et al.</i> , 2004)
Expression de Fas et de TRAIL non altérée	(Rippo <i>et al.</i> , 2004)
Surexpression de CD59	(Mohr & Rihn, 2001)
Sensibilité à la lyse médiée par des cellules T	(Ebstein <i>et al.</i> , 2004)
Tolérance	
Expression HLA G	(Kleinberg <i>et al.</i> , 2006)
Production de cytokines immunosuppressives (IL-6, TGF β , VEGF...)	(Garlepp & Leong, 1995) (Hegmans <i>et al.</i> , 2006) (Bielefeldt-Ohmann <i>et al.</i> , 1996) (Fitzpatrick <i>et al.</i> , 1995)
Treg	(Chen <i>et al.</i> , 2005) (DeLong <i>et al.</i> , 2005) (Hegmans <i>et al.</i> , 2006)
Diminution NKG2D (via MIC dans exosomes)	(Clayton <i>et al.</i> , 2005) (Clayton <i>et al.</i> , 2007)

Tableau 6: Mécanismes de résistance à la réponse immunitaires décrits pour le mésothéliome.

Les informations en vert indiquent les mécanismes qui ont fait l'objet d'études et qui se sont révélés ne pas être impliqués dans l'échappement à la réponse immunitaire de ce cancer. Le symbole (-) signifie qu'il n'y a pas de donnée disponible dans la littérature actuellement.

OBJECTIFS

Le MPM est un cancer difficile à diagnostiquer car peu de marqueurs spécifiques de ce cancer sont connus. L'identification de tels marqueurs pourrait améliorer les outils diagnostiques disponibles pour le moment. Le premier axe de mon travail de thèse a donc porté sur l'identification de protéines spécifiques du mésothéliome :

- en recherchant des antigènes exprimés par des cellules isolées à partir de liquides pleuraux de patients atteints de MPM,
- et en étudiant les mécanismes impliqués dans la production de formes solubles dérivés de la MSLN.

Le mésothéliome répond mal aux traitements conventionnels de type chirurgie, chimiothérapie ou radiothérapie. Le développement de nouveaux protocoles thérapeutiques est donc urgent. Le deuxième axe de mon travail concerne l'étude de nouvelles options thérapeutiques de type immunothérapie.

- Peu d'antigènes étant identifiés dans le mésothéliome, nous avons envisagé une approche d'immunothérapie active basée sur l'injection de DC ayant phagocyté des cellules tumorales mortes. Nous avons essayé de rendre les cellules tumorales plus immunogènes en leur faisant préalablement subir un stress de type « choc thermique ».
- Une infection virale induit généralement une activation forte de la réponse immunitaire. Nous avons donc étudié l'immunogénicité des cellules du mésothéliome infectées par le virus de la rougeole (MV).

Enfin, j'ai travaillé sur l'isolement de clones de lymphocytes T CD8 spécifiques d'épitopes de MUC-1 et de la MSLN. Ces clones nous permettront d'étudier la réponse immunitaire médiée par les CTL contre ces antigènes exprimés par le mésothéliome.

RESULTATS

I. Amélioration des outils diagnostiques disponibles.

I.1. Etablissement de lignées de MPM et identification d'antigènes

INTRODUCTION :

Etablir le diagnostic du mésothéliome n'est pas toujours aisé. C'est en particulier la distinction entre le mésothéliome et certaines affections bénignes de la plèvre ou d'autres affections tumorales qui peut s'avérer difficile (Robinson *et al.*, 2005). Parfois, même après avoir eu recours à des analyses histologiques, le diagnostic ne peut pas être posé avec certitude car aucun marqueur spécifique du mésothéliome n'a encore été identifié. Nous avons donc cherché à identifier de nouveaux marqueurs potentiellement exprimés par le MPM en travaillant sur des cellules isolées à partir de liquides pleuraux.

Malgré des études antérieures sur l'établissement de lignées cellulaires de MPM, peu d'informations sont finalement disponibles quant à l'expression de marqueurs tumoraux spécifiques permettant de s'assurer de la nature des cellules obtenues en culture. C'est pourquoi la caractérisation est en général effectuée grâce à des analyses du karyotype (Pass *et al.*, 1995). En nous inspirant des marquages réalisés en clinique pour l'établissement du diagnostic, nous avons décidé d'utiliser les marquages CK 5/6, vimentine, calrétinine et CEA pour différencier les cellules de MPM des autres types cellulaires que nous aurions pu isoler.

Par la suite, nous avons analysé l'expression d'AAT par RT-PCR. Peu d'études se sont focalisées sur l'expression d'antigènes de différenciation par les cellules de MPM. En 2002, une équipe italienne a observé que les cellules de MPM pouvaient exprimer des antigènes appartenant à la famille des CTA (MAGE, GAGE, SSX et NYESO-1) (Sigalotti *et al.*, 2002). Dans notre étude, seule une minorité des cellules exprime certains de ces antigènes (GAGE et TERT).

De manière intéressante, les ARNm codant pour la MSLN et MUC1 ont été détectés par PCR dans toutes les lignées de MPM. L'expression protéique de ces antigènes a ensuite été confirmée par cytométrie en flux et microscopie confocale. La MSLN avait déjà été identifiée à la surface des cellules de MPM en immunohistochimie. Nos résultats confirment l'expression homogène de

cet antigène dans ce type de cancer et montrent que MUC1 est également exprimé par nos lignées cellulaires.

En conclusion, cette étude montre que les lignées établies à partir des liquides pleuraux et caractérisées comme étant des cellules de MPM expriment des antigènes appartenant à la famille des CTA mais de façon limitée seulement. Les antigènes MUC1 et MSLN sont en revanche beaucoup plus fréquemment exprimés.

RÉSULTATS :

1. Isolement des cellules tumorales par élutriation

Les populations cellulaires présentes dans les liquides pleuraux sont assez hétérogènes (présence de cellules immunitaires, cellules mésothéliales, cellules tumorales). Nous avons pensé qu'il serait possible d'utiliser la technique de l'élutriation, qui permet de séparer les cellules selon leur taille et leur densité, afin d'isoler les cellules tumorales des autres types cellulaires (Almici *et al.*, 1992; Pretlow & Pretlow, 1979). Plusieurs fractions correspondant à des contre-courants de débits croissants ont été récupérées. L'analyse morphologique par cytométrie (figure 15, page 71) révèle que les populations de cellules sont séparées les unes des autres par cette technique. Les premières fractions (débit de contre-courant de 7 et 16 mL / minute) contiennent essentiellement des débris cellulaires, des érythrocytes et des lymphocytes. Les fractions suivantes (22 mL / minute et rotor off) contiennent principalement les cellules de taille plus importante (dont les cellules tumorales qui nous intéressent). Chaque liquide d'épanchement présente des caractéristiques uniques (en terme de nombre de cellules totales, de proportion entre les différentes populations, de taille des cellules etc.) et les résultats obtenus ne sont donc pas équivalents d'un prélèvement à l'autre. Ainsi, on voit bien sur la figure 15 que des lymphocytes sont toujours présents dans les dernières fractions du prélèvement meso62 mais que ce n'est pas le cas pour meso60. La séparation des différentes cellules n'est pas parfaite mais elle permet néanmoins d'obtenir une population de cellules tumorales plus pure.

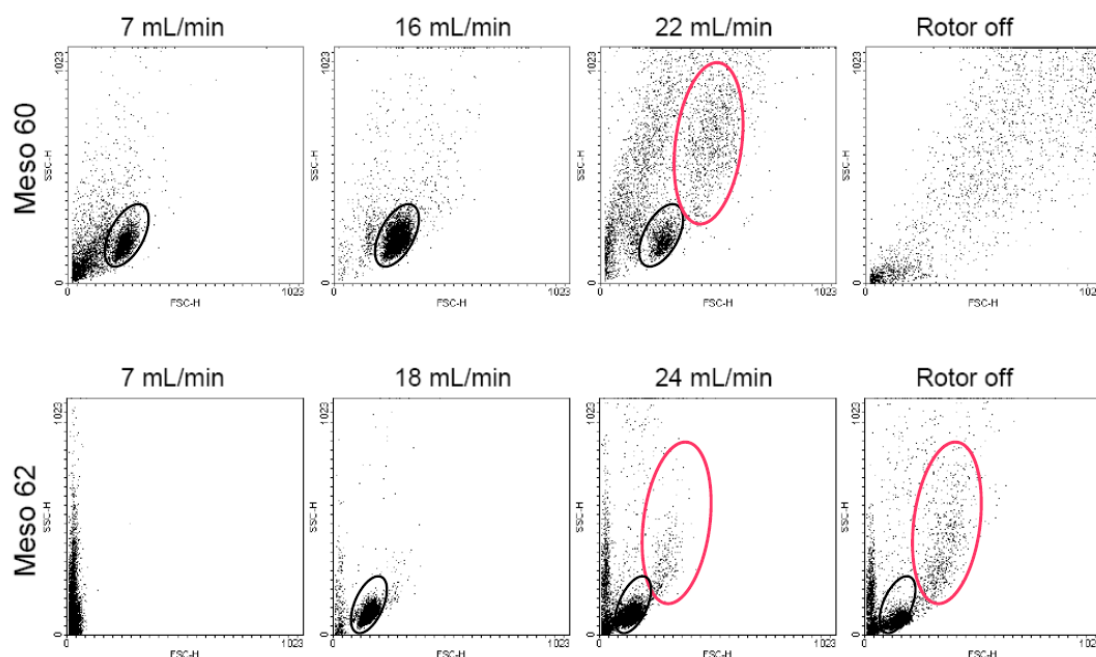


Figure 15 : Analyse morphologiques des cellules tumorales obtenues par élutriation.

La technique de l'élutriation à contre-courant a permis de séparer les cellules contenues dans les liquides pleuraux selon leur taille. Après centrifugation du liquide pleural (20 minutes à 1500 rpm soit 450 G), les cellules ont été reprises dans NaCl à 0,9 % stérile puis élutriées (vitesse de rotation du rotor : 2000 rpm). Les fractions obtenues avec un contre-courant de 7 mL / minute contiennent principalement des débris. Les fractions entre 16 et 24 mL / minute contiennent les cellules de petite taille de type lymphocytes (entouré en noir) et les cellules tumorales (en rouge) se retrouvent dans les fractions avec le plus fort contre-courant (22 mL / minute et rotor off pour meso60; 24 mL / minute et rotor off pour meso62). La séparation n'est pas parfaite entre les différentes fractions.

2. Caractérisation des lignées par marquage immunocytochimique.

Afin de nous assurer de la nature des cellules que nous avons en culture, nous avons effectué des marquages, en utilisant une association de marqueurs positifs (calrétinine, vimentine, CK 5/6) et négatif (CEA), comme lors de l'établissement du diagnostic de MPM. Les marquages ont été réalisés sur des lignées de mésothéliome et une lignée d'adénocarcinome utilisée comme contrôle (figure 16, page 72; tableau 7, page 73). Toutes ces lignées ont été obtenues à partir de liquides pleuraux, y compris ADK3. Comme attendu, la majorité des cellules de mésothéliome s'est avérée négative pour le CEA et positive pour la calrétinine. La lignée d'adénocarcinome ADK3, au contraire exprimait le marqueur CEA et quelques unes de ces cellules étaient

marquées par l'anti-calrétinine. La CK 5/6 a marqué environ 60 % (8 lignées sur 13) des mésothéliomes mais pas la lignée ADK3 (tableau 8) et enfin, toutes les cellules étaient positives vis-à-vis de la vimentine.

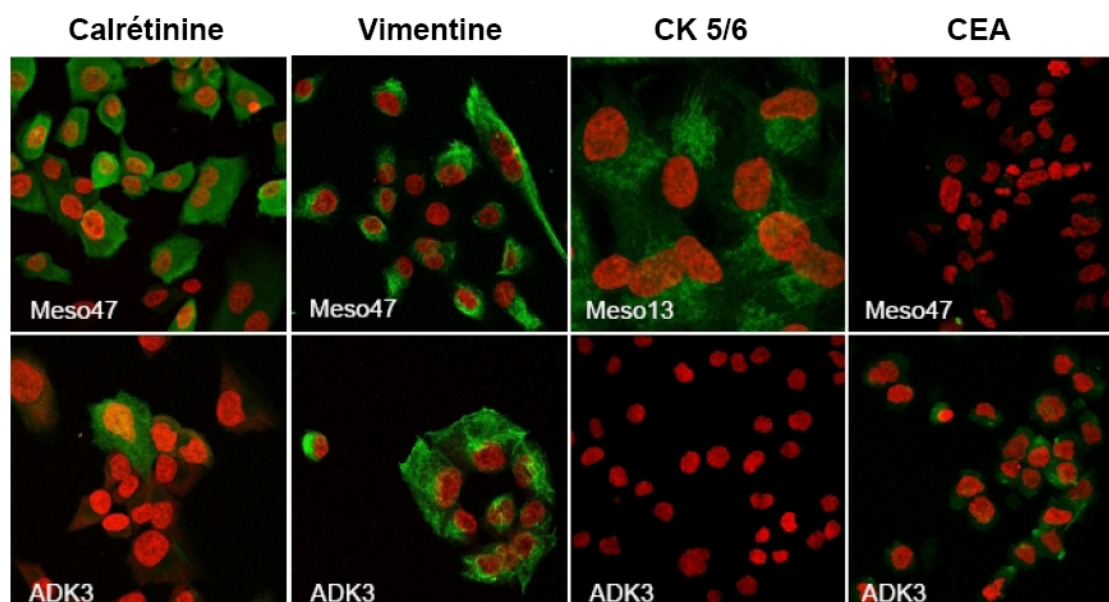


Figure 16 : Caractérisation immunocytochimique des cellules mises en culture.

Des marquages ont été réalisés sur les cellules afin de contrôler leur nature. Après avoir été cultivées sur des lames de verres stériles jusqu'à la confluence, les cellules ont été fixées avec du paraformaldehyde dilué à 4% dans du PBS pendant 30 minutes à température ambiante. Pendant les 5 dernières minutes, les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,5 % pour les marquages intracellulaires (calrétinine, vimentine et CK 5/6). Après des rinçages au PBS et une étape de saturation en PBS/BSA 1 % (20 minutes à température ambiante), les cellules ont été incubées avec les anticorps dilués dans du PBS/BSA 0,1% (anti-calrétinine au 1/100^{ème} (clone 5A5, Novocastra), anti-vimentine au 1/100^{ème} (clone V9, Novocastra), anti-CK 5/6 au 1/150^{ème} (clone D5/16B4, Zymed), anti-CEA au 1/40^{ème} (clone A5B7, DAKO)). Après un lavage en PBS, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome (goat anti-mouse IgG FITC-conjugated (Sigma-Aldrich)). Les cellules ont été lavées une dernière fois puis incubées avec du ToPRO-3 dilué au 1/1000^{ème} (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, California) pendant 30 minutes. Les lames ont enfin été montées avec du Prolong Antifading Kit (Molecular Probes). L'observation a été faite au microscope confocal (Leica TCS-SP1). Les photos du haut représentent des exemples de marquages réalisés sur des cellules de mésothéliome (meso13 et meso47) et celles du bas, ceux réalisés sur les cellules ADK3 (adénocarcinome peu différencié). Les noyaux apparaissent en rouge et les marquages en vert.

Lignée cellulaire	calrétinine	vimentine	CK 5/6	CEA
ADK3	+/-	+++	-	+/-
Meso11	+	+++	+	-
Meso13	+++	+++	+	-
Meso30	+++	NR	+/-	+/-
Meso34	+++	+++	-	-
Meso36	+++	+++	+	-
Meso47	+++	+++	+	-
Meso56	+++	NR	+	NR
15Trm	+++	+++	-	-
2CJ	+++	+++	-	-
12JH	+++	+++	-	-
18PM	+	+++	-	-
19DD	+++	+++	+	-
26KG	+++	+++	+	NR

Tableau 7: Marquages des marquages des différentes lignées de MPM.

Toutes les lignées testées expriment la vimentine et la plupart la calrétinine. Le marquage CK 5/6 est modéré, voire absent, selon les lignées. Seules les lignées ADK3 et Meso30 présentent un marquage pour le CEA. +++ : marquage intense sur la quasi-totalité des cellules observées ; + : marquage net observé sur la majorité des cellules ; +/- : marquage faible et/ou seulement quelques cellules marquées ; - : pas de marquage ; NR : marquage non réalisé.

3. Identification d'antigènes exprimés par les cellules de mésothéliome

Une fois caractérisées comme cellules de mésothéliome, nous avons cherché à identifier des antigènes qu'elles exprimaient par des expériences de PCR. L'expression de 11 antigènes, appartenant pour la plupart à la famille des CTA, a été étudiée par PCR sur les lignées de MPM (figure 17, page 74 et tableaux 8 et 9, page 75). Deux lignées de mélanome (M136 et BEU) ont été utilisées comme témoins positifs car les CTA sont fréquemment exprimés par ce type de cancer. La lignée ADK3 a été utilisée pour comparer le profil d'expression des antigènes par le mésothéliome avec une autre tumeur située au niveau de la cavité pleurale.

Certains CTA n'ont pu être détectés dans les lignées de mésothéliome. C'est le cas de NY-ESO-1, MAGE-1 et -2, BAGE et SSX-4. La présence d'ARNm de gènes appartenant à la famille des GAGE a été détectée de façon ponctuelle dans quelques lignées. La majorité des cellules de MPM étaient positives pour TERT et toutes l'étaient pour MUC-1 et MSLN.

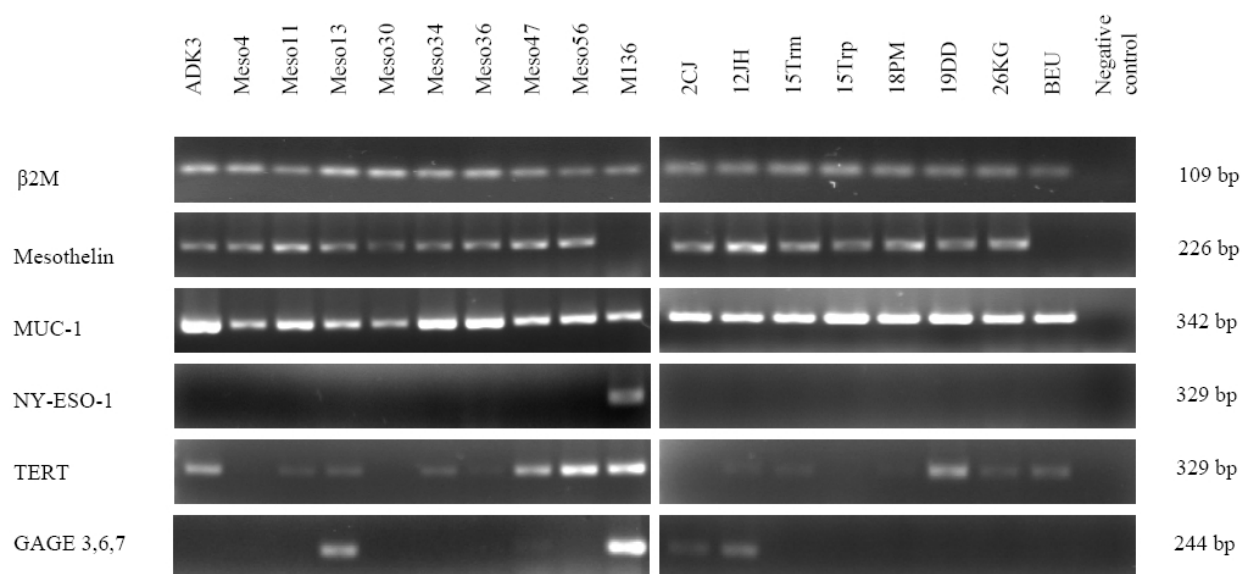


Figure 17: Exemples de PCR réalisées sur des lignées de MPM et des lignées contrôles.

Les ARN ont été extraits des cellules à l'aide du kit Rneasy (Qiagen) en suivant le protocole du fournisseur. Les ADN complémentaires (ADNc) des ARN messagers (ARNm) ont été obtenu par transcription inverse (AMV-RT system, Promega) réalisée sur 1 µg d'ARN en utilisant des amorces de type « oligo-dT ». Les PCR ont été réalisées sur ces ADNc à l'aide d'une Taq DNA polymerase (Promega). Les produits issus des réactions de PCR ont migré sur gel d'agarose à 1,5 % contenant du bromure d'ethidium et ont été visualisés sous exposition UV (ultra violet).

L'amplification du gène β2M (expression ubiquitaire) a permis de vérifier l'intégrité des ADNc synthétisés. Des exemples de PCR (MSLN, MUC-1, MY-ESO-1, TERT et GAGE-3,-6,-7) réalisées sur les lignées de mésothéliome (Meso4, 11, 13, 34, 36, 47, 56, 2CJ, 12JH, 15Trm, 15Trp, 18PM, 19DD et 26KG) et contrôles (adénocarcinome : ADK3 et mélanomes : M136 et BEU) sont représentées sur la figure.

Le fait qu'un ARNm soit détecté par des expériences de PCR ne signifie par forcément que la protéine correspondante soit exprimée par les cellules. Aussi, nous avons cherché à mettre évidence la présence de la protéine MUC-1 à la surface des cellules de mésothéliome. Le travail concernant la MSLN sera abordé ultérieurement (voir I.2. de la partie “résultats”, mécanismes impliqués dans la production de formes solubles de la MSLN).

Lignée	β 2M	Muc-1	MSLN	GAGE 1	GAGE1,2,8	GAGE3,6,7	MAGE1	MAGE2	SSX4	BAGE	TERT	NY-ESO-1
ADK3	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-
Meso4	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meso11	++	++	++	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Meso13	++	++	++	+	+	++	-	-	-	-	+	-
Meso30	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meso34	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Meso36	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Meso47	++	++	++	-	+	-	-	-	-	-	++	-
Meso56	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-
2CJ	++	++	++	-	+	+	-	-	-	-	-	-
12JH	++	++	++	-	-	++	-	-	-	-	+	-
15Trm	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
15Trp	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18PM	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
19DD	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-
26KG	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
M136	++	++	-	-	++	++	++	+	+	+	++	++
BEU	++	++	-	ND	ND	-	++	-	ND	ND	+	-

Tableau 8: Résultats des PCR.

Toutes les lignées se sont révélées positives pour MUC-1. La plupart des lignées possèdent des ARNm de TERT et MSLN. Concernant les CTA NY-ESO-1 et GAGE, l'expression par les lignées de MPM s'est avérée assez limitée.

Gène	Amorce	Sequence	Température d'hybridation	Taille des fragments amplifiés (en paires de bases, bp)
β 2M	FOR REV	TTC ACC CCA CTG AAA AAG ATG A ACC TCC ATG ATG CTG ATT ACA	55°C	109 bp
MSLN	FOR REV	AAC GGC TAC CTG GTC CTA G TTT ACT GAG CGC GAG TTC TC	55°C	226 bp
MUC-1	FOR REV	TGA TGT GCC ATT TCC TTT CTC TAC AAG TTG GCA GAA GTG GCT	55°C	342 bp
NY-ESO-1 (N1)	FOR REV	ATG GAT GCT GCA GAT GCG G GGC TTA GCG CCT CTG CCC TG	62°C	329 bp
NY-ESO-1 (N2)	FOR REV	GCC ATG CAG GCC GAA GGC CAT GGC GAG GTA GAA CTC	62°C	615 and 844 bp
GAGE 1	FOR REV	GAC CAA GAC GCT ACG TAG GCA ATT GTT CAT TAA AAG CC	55°C	353 bp
GAGE 1-2,7	FOR REV	GAC CAA GAC GCT ACG TAG CCA TCA GGA CCA TCT TCA	55°C	244 bp
GAGE 3-6,8	FOR REV	GAC CAA GGC GCT ATG TAC CCA TCA GGA CCA TCT TCA	55°C	244 bp
BAGE	FOR REV	TGG CTC GTC TCA CTC TGG CCT CCT ATT GCT CCT GTT G	56°C	286 bp
TERT	FOR REV	AGT TCC TGC ACT GGC TGA TGA GT CTC GGC CCT CTT TTC TCT GCG	62°C	329 bp
SSX-4	FOR REV	AAA TCG TCT ATG TGT ATA TGA AGC T GGG TCG CTG ATC TCT TCA TAA AC	53°C	416 bp
SSX-2	FOR REV	GTG CTC AAA TAC CAG AGA AGA TC TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G	55°C	435 bp
MAGE-1	FOR REV	CGG CCG AAG GAA CCT GAC GCT GGA ACC CTC ACT GGG	62°C	421 bp
MAGE-2	FOR REV	AAG TAG GAC CCG AGG ACT G GAA GAG GAA GAA GCGTCT G	51°C	237 bp

Tableau 9: Caractéristiques des amorces utilisées.

4. Confirmation de l'expression de MUC-1

MUC-1 est une protéine exprimée de nombreuses cellules de l'organisme. Les tumeurs altèrent généralement l'expression de MUC-1, soit en la sur-exprimant, soit en modifiant son profil de glycosylation. Nous avons donc utilisé deux anticorps pour caractériser au mieux l'expression de MUC-1 par les cellules de mésothéliome. L'anticorps SM3 est capable de reconnaître spécifiquement la protéine MUC-1 déglycosylée (Burchell *et al.*, 1989) alors que le clone HMPV se fixe à la protéine MUC-1 indépendamment des motifs de glycosylation qu'elle porte.

Les expériences de cytométrie réalisées avec l'anticorps HMPV nous ont apporté la confirmation que MUC-1 était exprimée par l'ensemble des lignées, bien que de façon assez hétérogène (figure 18, page 77). Certaines des cellules cancéreuses « contrôles » étaient beaucoup plus fortement marquées et semblent véritablement sur-exprimer cet antigène (ADK3, MCF-7, OVCAR-3). Le niveau d'expression de MUC-1 des lignées de mésothéliome ne semble pas plus élevé que celui de la lignée de cellules mésothéliales MeT-5A. Il semble que cet antigène ne soit pas sur-exprimé par les lignées de MPM.

La forme hypoglycosylée (marquages avec l'anticorps SM3) n'a pu être mise en évidence qu'à la surface de certaines lignées « contrôles » (OVCAR-3, MCF-7 et ADK3 surtout, et marquage discret de la lignée (IGR)-Pub) (figure 18, page 77). Aucune des lignées de mésothéliome n'a été marquée avec le clone SM3. Nous n'avons donc pas détecté d'altération des motifs de glycosylation portés par MUC-1 à la surface des cellules de mésothéliome.

Nous avons aussi réalisé des dosages de certaines formes solubles dérivées de la protéine MUC-1 (dosage de CA 15-3 par radioimmunoassay) sur les surnageants de culture de 8 lignées de MPM et 6 lignées d'adénocarcinomes. L'antigène CA 15-3 a été détecté dans les surnageants de 4 lignées, 2 appartenant au groupe « mésothéliome », et 2 au groupe « adénocarcinome ».

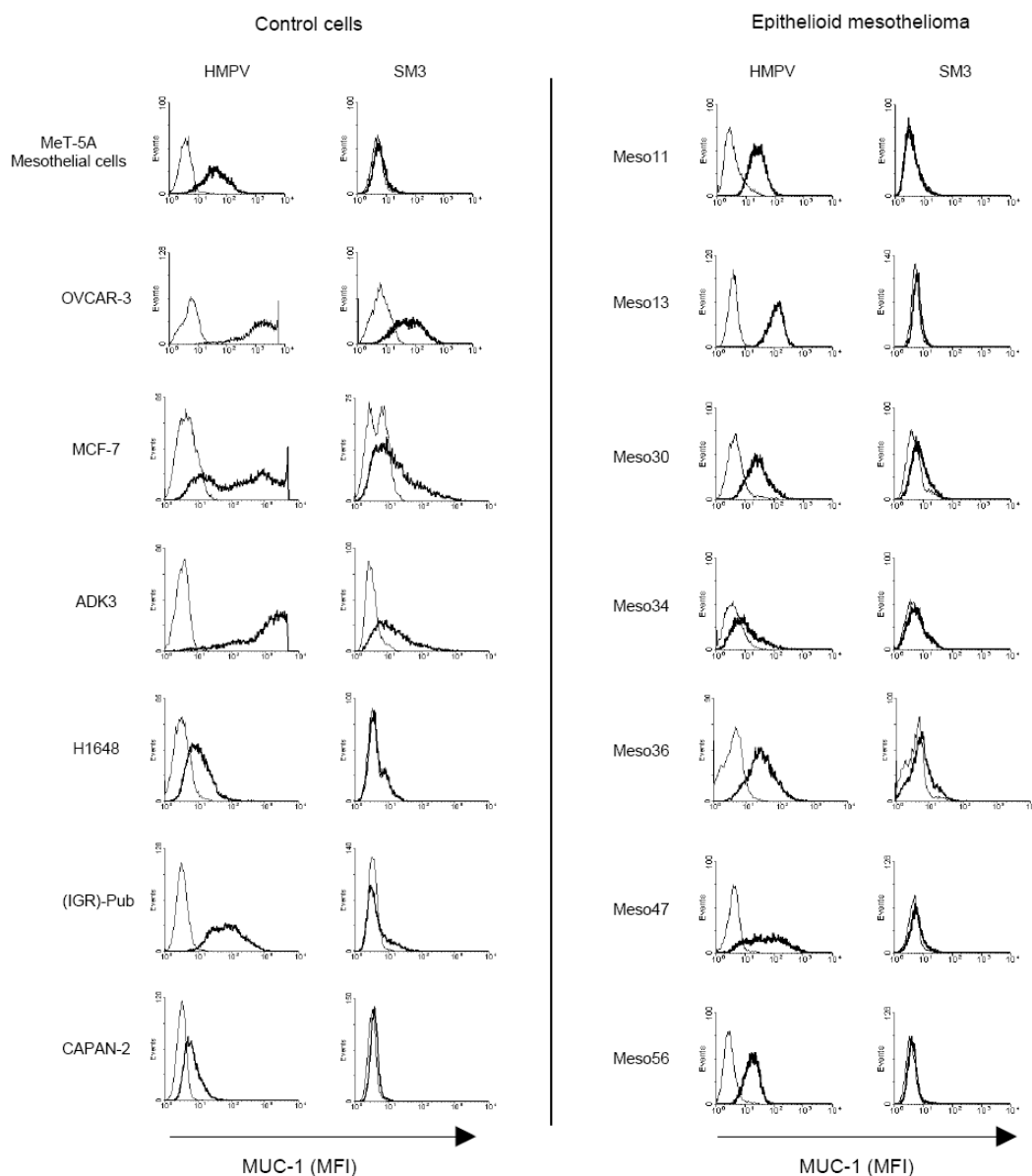


Figure 18: Caractérisation de l'expression de MUC-1 par les lignées.

Le trait fin correspond au marquage par un isotype et le trait épais par celui dû à l'anticorps anti-MUC-1. Deux clones différents, HMPV (BD Bioscience Pharmingen) et SM3 (Abcam), ont été utilisés pour caractériser l'expression de MUC-1 par les lignées. HMPV reconnaît toutes les formes de MUC-1 tandis que SM3 ne reconnaît que les formes hypoglycosylées. Les lignées OVCAR-3 (carcinome ovarien), MCF-7 (cancer du sein), ADK3 (adénocarcinome peu différencié), H1648, (IGR)-Pub (adénocarcinomes pulmonaires) et CAPAN-2 (adénocarcinome pancréatique) ont servi de contrôles positifs car MUC-1 est fréquemment sur-exprimée et/ou hypoglycosylée par les adénocarcinomes. La lignée MeT-5A est une lignée de cellules mésothéliales immortalisées.

Contrairement aux lignées d'adénocarcinome, les cellules de mésothéliome ne surexpriment pas MUC-1 et n'expriment pas non plus la forme déglycosylée reconnue par l'anticorps SM3.

COMMENTAIRES :

Un liquide pleural prélevé chez un patient atteint d'un cancer contient de nombreuses populations cellulaires. Afin d'établir le plus rapidement possible et avec un meilleur rendement des lignées de mésothéliome, nous avons testé l'élutriation à contre-courant. Lorsque les conditions sont favorables cette technique permet de séparer les différentes populations présentes dans le liquide pleural. Cela représente non seulement un avantage pour la mise en culture des cellules tumorales mais permet également d'obtenir des fractions des autres populations cellulaires présentes dans le liquide pleural (par exemple les lymphocytes). Cette technique est donc très intéressante mais en pratique, son utilisation s'est avérée limitée pour plusieurs raisons : nombre de cellules obtenues dans le liquide pleural parfois insuffisant, taille des cellules tumorales trop importante entraînant un excès de remplissage de la chambre d'élutriation et finalement une absence de tri.

Nous avons décidé d'utiliser les marquages CK 5/6, vimentine, calrétinine et CEA afin de vérifier l'origine des cellules mises en culture à partir des liquides pleuraux. Dans notre étude, le marquage anti-vimentine ne semble pas pertinent dans la mesure où toutes les cellules (MPM et adénocarcinome) présentent le même signal. Le marqueur CK 5/6 aussi s'est révélé décevant de par son manque de sensibilité (à peine 60% des lignées de MPM positives et marquage peu intense). En revanche, la calrétinine et le CEA ont été plus utiles pour cette application car ils ont permis de différencier les cellules de MPM de celles d'adénocarcinomes. Ceci corrèle avec les données disponibles dans la littérature concernant les marquages immunohistochimiques réalisés lors de l'établissement du diagnostic de MPM (Ordóñez, 2002; Ordóñez, 2007). Il est donc possible de réaliser des marquages sur les cellules afin de vérifier leur nature et de les différencier d'autres types de tumeur mais, comme dans le cas du diagnostic, il est nécessaire de recourir à une association entre plusieurs marqueurs positifs (dont la calrétinine mais CK 5/6 et vimentine à exclure) et négatifs (dont le CEA).

Une fois les lignées cellulaires établies, nous avons analysé l'expression d'AAT par RT-PCR. De nombreuses études se sont focalisées sur l'expression du SV40 et une controverse existe à propos de l'expression de cet antigène par les cellules du MPM (certains laboratoires détectent son expression dans la plupart des lignées étudiées alors que d'autres n'ont pas pu confirmer ces

résultats). Jusqu'à aujourd'hui, peu d'études ont été réalisées sur l'expression d'antigènes par les cellules de MPM. En 2002, il a été démontré que les cellules de MPM pouvaient exprimer des antigènes appartenant à la famille des CTA (MAGE, GAGE, SSX et NYESO-1) (Sigalotti *et al.*, 2002). Dans notre étude, l'expression de tels antigènes par les lignées de MPM s'est révélée beaucoup plus limitée que dans celle de Sigalotti. Une possibilité permettant d'expliquer ces différences vient du fait que Sigalotti et collaborateurs ont travaillé sur 6 lignées dont la moitié sont des lignées primaires, alors que notre étude est basée sur l'analyse de 15 lignées qui sont toutes des lignées cultivées sur du long terme, et dont l'expression génique a pu être modifiée au cours de la culture. Il serait donc intéressant de réaliser ce type d'étude sur des cellules fraîchement isolées à partir de liquides pleuraux ou de biopsies. De plus, le recours à des techniques comme les puces à ADN et / ou puces à protéines permettrait l'étude simultanée de nombreux gènes.

Les ARNm correspondant à la MSLN et à MUC1 ont été détectés par PCR dans toutes les lignées de MPM. Nous avons détecté l'expression de MUC-1 et de la MSLN par l'ensemble des mésothéliomes testées, ce qui corrobore les données disponibles dans la littérature (Chang & Pastan, 1996; Manning *et al.*, 1991). Le profil d'expression de MUC-1 par les MPM s'est avéré différent de celui de certains adénocarcinomes (surexpression et présence d'une forme hypoglycosylée à la surface de la moitié des adénocarcinomes testés). Cependant, il paraît difficile d'établir une distinction entre les lignées de MPM et d'adénocarcinome sur ces critères car ils ne sont pas observés sur la totalité des adénocarcinomes (manque de sensibilité). Quant au dosage d'une forme soluble de MUC-1, le CA 15-3, dans les surnageants de culture, il s'est avéré inutile pour différencier ces deux types de cancer. Les dosages des formes solubles dérivées de MUC-1 réalisés jusqu'à présent dans les liquides pleuraux ne semblent pas pertinents pour le diagnostic du mésothéliome (Alataş *et al.*, 2001; Fuhrman *et al.*, 2000; Miédougé *et al.*, 1999). Cependant, d'autres anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques de variants tumoraux de MUC-1 sont disponibles (Gold *et al.*, 2006; Wittel *et al.*, 2001; ten Berge *et al.*, 2001) et il est possible qu'un épitope spécifique du mésothéliome existe malgré tout.

I.2. Mécanismes impliqués dans la production de formes solubles de la MSLN

ARTICLE 1: *Aberrant splicing and protease involvement in mesothelin release from epithelioid mesothelioma cells.* Cancer Sci. (2008) 99(3) : 590-4. Carole Sapede, Anne Gauvrit, Isabelle Barbieux, Martine Padieu, Laurent Cellerin, Christine Sagan, Arnaud Scherpereel, Gérard Dabouis, Marc Grégoire.

OBJECTIFS ET RÉSULTATS PRINCIPAUX :

Des formes solubles de protéines apparentées à la MSLN ont été détectées pour la première fois dans des sérums de patients atteints de carcinomes ovariens (Scholler *et al.*, 1999). Le système mis au point par cette équipe pour quantifier les SMRP est un ELISA de type sandwich contenant deux anticorps monoclonaux de souris : 4H3, qui sert à capturer les formes solubles de la MSLN et OV569, qui sert à les révéler (figure 19, page 81). Ce système ELISA a par la suite été utilisé afin de doser les SMRP dans des sérums et / ou des liquides pleuraux de patients atteints de MPM et a confirmé le fait que les patients atteints de ce type de cancer présentaient des taux importants de SMRP (Amati *et al.*, 2008; Creaney *et al.*, 2007; Grigoriu *et al.*, 2007; Pass *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2003; Scherpereel *et al.*, 2006). D'autres anticorps, développés par d'autres équipes, ont par ailleurs donné des résultats analogues à ceux obtenus avec le couple 4H3 / OV569 (Hassan *et al.*, 2006).

La question des mécanismes responsables de la présence de ces formes solubles a été soulevée dès leur détection. Ainsi, Scholler et collaborateurs ont mis en évidence l'existence d'un variant d'ADNc contenant une insertion de 82 bp à l'origine d'une modification du cadre de lecture lors de la synthèse protéique (Scholler *et al.*, 1999). L'extrémité C-terminale de ce variant (aussi connu sous le nom de Variant 3) diffère totalement de celle du variant principal de la MSLN, et en particulier, ne contient plus de site d'ancrage à la membrane cellulaire. La protéine synthétisée se retrouve alors libérée dans l'environnement de la cellule (figure 19, page 81). Ce variant, issu de mécanismes d'épissage alternatif (Hassan *et al.*, 2004), ne serait cependant que rarement exprimé par les cellules tumorales de différentes tumeurs (dont le mésothéliome) (Hellstrom *et al.*, 2006; Muminova *et al.*, 2004). La MSLN s'est aussi avérée être relarguée *in vitro* suite à des traitements par la trypsine ou encore la phospholipase C (Chang *et al.*, 1992a). L'intervention de

protéases a donc également été évoquée pour expliquer le relargage des SMRP à partir des cellules qui l'expriment (Hassan *et al.*, 2004).

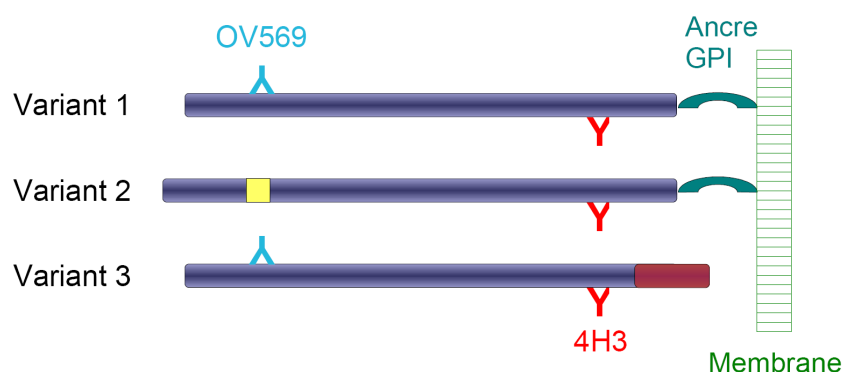


Figure19: Les différents variants de la mésothéline.

Les variants 1 et 2 ne diffèrent que par une courte séquence de 8 a.a. (rectangle jaune sur le variant 2). Ces deux variants possèdent à leur extrémité C-terminale une ancre GPI leur permettant de s'attacher à la membrane cytoplasmique. Le variant 3, dont l'extrémité C-terminale est différente, est dépourvu de cette ancre et se retrouve libéré dans l'environnement de la cellule.

L'anticorps 4H3 est capable de reconnaître et capture les 3 variants de la MSLN alors que l'anticorps OV569 servant à la détection des formes solubles ne reconnaît pas le variant 2. Le kit Mesomark dose donc à la fois les variants 1 et 3 sans les différencier. (D'après Hassan *et al.*, 2004).

Au cours de notre étude, nous avons cherché à éclaircir les mécanismes impliqués dans la production de formes solubles de la MSLN par les cellules de MPM établies dans notre laboratoire. Pour ce faire, nous avons tout d'abord vérifié l'expression de la MSLN au niveau cellulaire (cytométrie en flux) ainsi que la capacité de ces cellules à produire des SMRP dans leur environnement (kit ELISA MesoMark™) (figure 1 de l'article). Nous avons ensuite testé la première hypothèse concernant la production d'un variant issu d'épissage alternatif, le variant 3, par nos lignées de MPM. Des amorces spécifiques des variants 1 et 3 ont été utilisées pour des expériences de PCR et ont permis de mettre en évidence une expression du variant 3 par l'ensemble des lignées de MPM testées, mais pas par les lignées tumorales « contrôles » (figure 2 et données non présentées dans l'article). La production de formes solubles dérivées de la MSLN semble donc être une caractéristique des cellules de mésothéliome épithélioïde, qui pourrait impliquer des phénomènes d'épissage alternatif. Cependant, nous n'avons pas pu évaluer l'importance de ce mécanisme. Les signaux obtenus par PCR étaient cependant très faibles et il

nous a semblé peu probable que les SMRP détectées dans les milieux de cultures cellulaires soient issues en totalité de ce phénomène.

Les protéases appartenant aux familles des MMP et ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase domain) sont souvent impliquées dans le clivage de protéines de surface et l'activité de ces protéases est fréquemment dérégulée dans les cellules tumorales (Egeblad & Werb, 2002). Nous avons donc émis l'hypothèse que les protéases appartenant à la famille des MMP-ADAMs puissent être impliquées dans la production de SMRP. L'expression de MMP, et en particulier des MMP-1, -2, -3, -7 et -9, a déjà été rapportée dans le mésothéliome (Edwards *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2001). La réalisation de zymographies nous a en outre permis de vérifier que nos lignées étaient capables de produire des MMP actives, en particulier les gélatinases MMP-2 et/ou MMP-9 (figure 20, page 83). Un inhibiteur à large spectre des protéases appartenant à la famille des MMP-ADAMs a été utilisé sur les différentes lignées de MPM. Une diminution d'environ la moitié de la quantité de SMRP produite par les cellules a été observée suite à ce traitement (figure 3 de l'article). La diminution de la quantité de SMRP produites suite au traitement avec l'inhibiteur GM6001 démontre que des protéases appartenant à la famille des MMP-ADAMs représentent un mécanisme important dans la production de SMRP par ces cellules.

Nous n'avons pas pu quantifier l'importance relative des deux mécanismes (épissage alternatif et intervention de protéases) impliqués dans la production de formes solubles de la MSLN dans notre système. Bien que nous ne sachions pas si les phénomènes d'épissage alternatif jouent un rôle véritable ou plus anecdotique, les protéases semblent impliquées de manière importante dans le clivage de la MSLN membranaire. Une équipe a développé des anticorps spécifiques des différents variants de la MSLN (Hellstrom *et al.*, 2006). Des expériences réalisées avec de tels anticorps permettraient de déterminer l'importance relative de ces deux mécanismes (par exemple, dosages ELISA ou western blot).

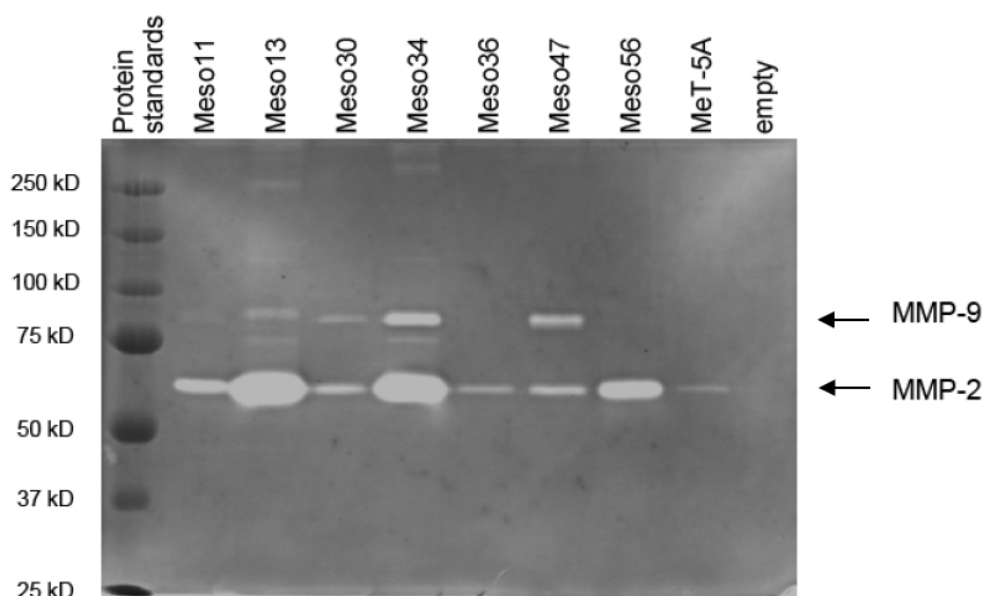


Figure 20: Zymographie réalisée sur les surnageants de culture des lignées de MPM.

Les protéines contenues dans les surnageants de culture (ne contenant pas de SVF) ont été séparées dans des conditions non dénaturantes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (7,5%) contenant de la gélatine (0,1%). Suite à la migration, les enzymes ont été réactivées par incubation du gel dans une solution de CaCl pendant une durée de 24h, à 37°C. Le gel a finalement été coloré au bleu de Coomassie puis décoloré dans de l'eau. Le gel apparaît globalement bleu, à l'exception des zones non colorées où les enzymes ont dégradé la gélatine (en blanc).

Toutes les lignées de MPM, ainsi que la lignée de cellules mésothéliales MeT-5A, présentent une activité MMP-2. Cette activité semble être très importante pour les lignées Meso13, -34 et -56. Une activité MMP-9 n'a été détectée que pour les lignées de MPM Meso30, 34 et 47.

L'identification d'une ou de plusieurs protéases intervenant dans le clivage de la MSLN permettrait de disposer d'un (ou de plusieurs) nouveau(x) marqueur(s) associé(s) à la présence de SMRP, puisqu'impliqué(s) dans la production de ces formes solubles. De nombreuses protéases appartenant à la famille des MMP-ADAMs ont été identifiées (environ 25 MMP et une trentaine d'ADAMs) (Fu *et al.*, 2008; Huovila *et al.*, 2005). L'utilisation de kits de dosage des protéases appartenant à cette famille pourraient permettre l'identification de candidats potentiels. Il faudrait ensuite utiliser des inhibiteurs spécifiques de ces protéases pour démontrer leur implication.

Aberrant splicing and protease involvement in mesothelin release from epithelioid mesothelioma cells

Carole Sapède,^{1,5} Anne Gauvrit,^{1,5} Isabelle Barbieux,¹ Martine Padieu,¹ Laurent Cellierin,² Christine Sagan,² Arnaud Scherpereel,³ Gérard Dabouis² and Marc Grégoire^{1,4}

¹INSERM U601, Département de Recherche en Cancérologie, Institut de Biologie/CHU, 44093 Nantes; ²Laënnec Hospital, CHR St-Herblain 44800; ³Pulmonary and Thoracic Oncology Department, CHRU Lille 59037 France

(Received July 12, 2007/Revised October 31, 2007/2nd Revision November 20, 2007/Accepted November 21, 2007)

Elevated amounts of soluble mesothelin-related proteins (SMRP) have already been reported in sera and pleural effusions from mesothelioma patients, providing a useful diagnostic marker for malignant pleural mesothelioma (MPM). However, the origin of SMRP is not yet understood. Production of SMRP could be related to abnormal splicing events leading to synthesis of a secreted protein (release) or to an enzymatic cleavage from membrane-bound mesothelin (ectodomain shedding). To test these hypotheses, we used a panel of mesothelioma cells established in culture from pleural effusions of MPM patients. Our *in vitro* results confirmed specific mesothelin expression and SMRP production in supernatants from epithelioid MPM cell lines, thus providing a relevant cellular model to study soluble mesothelin production mechanisms. The expression of mesothelin-encoding RNA variants was screened by reverse transcription-polymerase chain reaction experiments. Protease involvement in mesothelin cleavage from the cellular surface was investigated by treatment of MPM cells with GM6001, a broad-spectrum MMP- and ADAM-family inhibitor. GM6001 treatment significantly impaired SMRP production by MPM cell lines, in favor of an enzymatic-mediated shedding process. In addition, a splice variant transcript of mesothelin (variant 3) was detected in these MPM cell lines, in accordance with the release of a secreted part of the protein. Our results indicate that both mechanisms could be implicated in soluble mesothelin production by epithelioid mesothelioma cells. (*Cancer Sci* 2008)

Malignant pleural mesothelioma arises from the uncontrolled proliferation of mesothelial cells lining the pleura.⁽¹⁾ Asbestos exposure is the main factor involved in MPM pathogenesis. Management of MPM patients remains difficult⁽²⁾ because diagnosis is usually established late in disease evolution, making patient prognosis poor (survival rate ranging from 4 to 12 months). Moreover, differential diagnosis between MPM and pleural benign diseases (often induced by asbestos exposure), lung adenocarcinoma, or pleural metastasis of diverse origins remains uncertain. Significant advances in MPM treatment suggest the development of early and reliable diagnostic tests, and thus require a better knowledge of MPM-specific markers.

Mesothelin has been suggested to significantly improve the panel of MPM-associated markers.⁽³⁾ Mesothelin is a cell-surface GPI-anchored glycoprotein that has putative functions in cell-to-cell adhesion.⁽⁴⁾ This differentiation antigen is present at low levels in a restricted set of normal adult tissues, including the mesothelium, but is overexpressed aberrantly by several cancers, such as mesothelioma, and pancreatic and ovarian carcinomas.^(4,5) The primary product of the human mesothelin gene is a 71-kDa precursor protein, which is cleaved physiologically by a furine-like protease to produce a 31-kDa N-terminal fragment

(N-ERK/mesothelin or MPF) secreted into the blood⁽⁶⁾ and a 40-kDa C-terminal fragment (mesothelin) expressed at the cell surface.⁽⁵⁾ Additionally, Scholler *et al.* detected SMRP in culture supernatants of several carcinomas.⁽⁷⁾ It has since been reported that the levels of SMRP are more elevated in sera from mesothelioma patients than in patients with other cancers, inflammatory diseases, or in healthy controls.^(8–10) Moreover, a raised SMRP concentration in pleural effusions was also demonstrated to be relevant to discriminate MPM from benign pleural lesions and other malignant diseases.^(11,12)

Today, the clinical relevance of clarifying SMRP origin relies potentially on the identification of molecules that could be quantified in association with SMRP in order to establish an earlier and more reliable MPM diagnosis. Another benefit relies on the development of less-invasive diagnostic tests rather than actual standard diagnostic procedures based on immunohistochemical staining of tumor biopsies. Although several hypotheses have already been proposed, the mechanisms involved in soluble mesothelin production by tumor cells remain largely unknown.⁽⁴⁾ To understand these mechanisms, we explored two alternative possibilities: release of an aberrant RNA splicing product (mesothelin variant 3) or enzyme-mediated shedding of membrane-bound mesothelin (phospholipases, proteases). These *in vitro* experiments were conducted on epithelioid mesothelioma cell lines established in our laboratory from pleural effusions of MPM patients.

Materials and Methods

Patients. The MPM patients had received no anticancer therapy before the study. Pleural effusions were collected by thoracentesis. Diagnosis was established by immunohistochemical and immunocytochemical labelings. All patients gave signed, informed consent.

Cell lines. Mesothelioma (Meso11, -13, -30, -34, -36, -47, -56) and adenocarcinoma (ADK3) cells were derived from pleural effusions. Briefly, pleural effusions were centrifuged at 1200g for 10 min. Cell pellets were resuspended in RPMI-1640 medium

⁴To whom correspondence should be addressed. E-mail: marc.gregoire@nantes.inserm.fr
⁵Both authors contributed equally to this work.

MESOMARK enzyme-linked immunosorbent assay kits were provided, free of charge, by CIS-Bio International and Fujirebio Diagnostics. CIS-Bio International and Fujirebio Diagnostics had no role in recruiting patients, carrying out assays, analysing the data, or writing or approving the manuscript.
Abbreviations: ADAM, a disintegrin and metalloproteinase; CEA, carcinoembryonic antigen; CYFRA, cytokeratin 19 fragment; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FCS, fetal calf serum; GPI, glycosylphosphatidylinositol; MMP, matrix metalloproteinase; MPF, megacaryocyte potentiating factor; MPM, malignant pleural mesothelioma; PCR, polymerase chain reaction; PE, phycoerythrin; RT, reverse transcription; SMRP, soluble mesothelin-related protein.

(Cambrex, Verviers, Belgium) and rinsed twice. Cells were then seeded into flasks at a concentration of 10^6 cells/mL in complete RPMI medium supplemented with 10% heat inactivated FCS (Eurobio, Les Ulis, France), 1% penicillin-streptomycin, and 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA). The following cell lines were used as controls: MCF-7 (ECACC, Salisbury, UK), OVCAR-3 and CAPAN-2 (Dr C. Sai, INSERM U601, Nantes, France); MeT-5A (Dr E. Dopp, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, Essen, Germany), (IGR)-Pub (Dr F. Chouaib, INSERM U753, Villejuif, France), and H1648 (Dr J. Roche, UMR 6558, Poitiers, France). Cells were maintained in complete medium and were mycoplasma free (checked by Hoechst 33258 labeling).

RNA extraction and RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from cell pellets using RNeasy kits (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. One μ g total RNA was reverse-transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, San Diego, CA, USA). cDNA was used as a template for PCR amplification (35 cycles) using GoTaq polymerase (Promega, Madison, WI, USA). The GenBank accession numbers for mesothelin variants are: 1, NM_005823; 2, NM_013404; and 3, AF180951.

Flow-cytometric analysis. After a brief trypsinization of subconfluent adherent cellular cultures, cell suspensions were washed with FCS-supplemented RPMI medium and fixed with 70% methanol at -20°C for 7 min. Fixed cells were incubated with 1/50 mesothelin-specific monoclonal antibody (clone K1; Zymed, San Francisco, CA, USA) or with purified mouse IgG1 control and then with 1/200 PE-conjugated rat antimouse IgG1 antibody (clone A85-1; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) at 4°C .

Soluble protein assays. When cell cultures reached confluence, three rinses were carried out with complete RPMI-1640 medium that was FCS free. Cells were incubated in this medium for 20 min for the first rinse and 1 h for the last two rinses. Then, 2.5 mL of medium was added into a 25-cm² flask for culturing. The culture supernatants were collected 24 h later, centrifuged at 800g for 10 min, and stored at -80°C until assayed.

In the MMP inhibition experiments, three culture conditions were tested for each mesothelioma cell line: untreated, GM6001 (50 μ M), or related GM6001-negative control (Calbiochem, Nottingham, UK). Cells were incubated overnight and the culture supernatants were collected as described previously.

The SMRP titration was carried out using the MESOMARK immunoassay kit (CIS Bio International, Fujirebio Diagnostics), following the manufacturer's recommendations. Culture supernatants were tested at 1/10 dilution.

Statistical analysis. Wilcoxon rank sum tests and Wilcoxon signed rank tests were carried out using the R program (<http://www.r-project.org>).

Results

Cellular mesothelin expression and SMRP production by MPM and control cell lines. In the present study, we investigated cellular and secreted forms of mesothelin expressed by epithelioid MPM cells (Meso11, -13, -30, -34, -36, -47, -56) collected from pleural effusions and compared them with a panel of control lung adenocarcinoma (ADK3, H1648, [IGR]-Pub), pleural carcinoma metastasis (MCF-7), other mesothelin-positive carcinoma (OVCAR-3, CAPAN-2), and established mesothelial (MeT-5A) cell lines. Quantitative cellular mesothelin expression was assessed by flow-cytometric experiments, using the monoclonal antibody K1. The mesothelin-specific K1 antibody was generated by mouse immunization with the human ovarian carcinoma OVCAR-3 cell line,^(13,14) which was used as a positive control for staining (Fig. 1a). Cellular mesothelin expression was compared between the mesothelioma and control

groups (Fig. 1a). Our results clearly demonstrate that control cells displayed similar mesothelin expression levels to MPM cells, as no significant difference was observed between the groups ($P > 0.2$).

We next determined the SMRP levels in cell culture supernatants with a double determinant sandwich ELISA (MESOMARK kit), using 4H3 (capture) and OV569 (detection) mesothelin-specific antibodies.⁽⁷⁾ SMRP concentrations were compared between mesothelioma and control cells (Fig. 1b). The SMRP levels in culture supernatants of MPM cells (mean 78 pM/ 10^6 cells/24 h) were significantly higher ($P < 0.001$) than those obtained for adenocarcinoma cells (mean 1.5 pM/ 10^6 cells/24 h). A mesothelial cell line, MeT-5A, was also tested and no SMRP production was detected. In contrast with cellular mesothelin expression, the production of soluble mesothelin in culture supernatants thus appears to be a reliable distinguishing feature of MPM cells. In addition, mesothelin cellular expression (mean fluorescence intensity) was compared with soluble mesothelin production (SMRP) for each mesothelioma cell line tested (Fig. 1c). Interestingly, we observed an inverse correlation between mesothelin expression and SMRP production for Meso13, -34, and -56 cell lines. This correlation was, however, not clearly established for all MPM cells in the panel.

As mesothelioma tumor cells isolated from pleural effusions of MPM patients retained a major characteristic of the primary tumor (i.e. SMRP production), it provides a relevant *in vitro* cellular model to examine the physiopathological process for soluble mesothelin production. We therefore used these MPM cells to investigate two previously reported hypotheses: release of an aberrant RNA splicing product (variant 3) or shedding of membrane-bound mesothelin by enzymatic activity (proteases).

Mesothelin transcript profile of MPM and control cell lines. We used RT-PCR experiments to study the relative expression of mesothelin-encoding RNA transcripts by mesothelioma cells. Two different primer pairs were designed to distinguish mesothelin variants 1–2 and 3 (Fig. 2a). We showed that variants 1–2 represent the major mRNA produced by MPM and MeT-5A cell lines (Fig. 2b). A weak signal corresponding to variant 3 was also detected for most of the MPM cell lines. As confirmed with specific mesothelin variant (V)3 primers, this aberrant splicing variant was solely expressed by mesothelioma cells, and not by mesothelial MeT-5A cells (Fig. 2b) or the control tumoral cell panel (data not shown).

Implication of proteases in SMRP production by MPM cells.

To test whether proteases could be involved in mesothelin shedding by mesothelioma cells, we compared SMRP production in culture supernatants from MPM cells incubated with or without GM6001 (Galarin), a general MMP- and ADAM-family inhibitor (Fig. 3a). SMRP values obtained with the ELISA MESOMARK kit were normalized by cell number, counted for each culture condition. The levels of SMRP were similar between the 'no treatment' and 'GM6001 negative control' groups (data not shown), demonstrating that the inhibitory doses used are not toxic to MPM cells. A significant inhibition of SMRP production (approximately 50%) was observed in culture supernatants from all MPM cell lines incubated overnight with GM6001 (normalized optical density [OD] means: 0.18 and 0.09 for the 'no treatment' and 'GM6001' groups, respectively; $P = 0.016$) (Fig. 3b). This important result thus demonstrates the involvement of zinc-dependent proteases in soluble mesothelin production and validate the hypothesis on membrane-bound mesothelin shedding by an enzymatic activity.

Discussion

Mesothelin is a tumor antigen that can be detected by immunohistochemistry staining on mesothelium, carcinoma, and mesothelioma tissues.^(3,13) Our flow-cytometric experiments

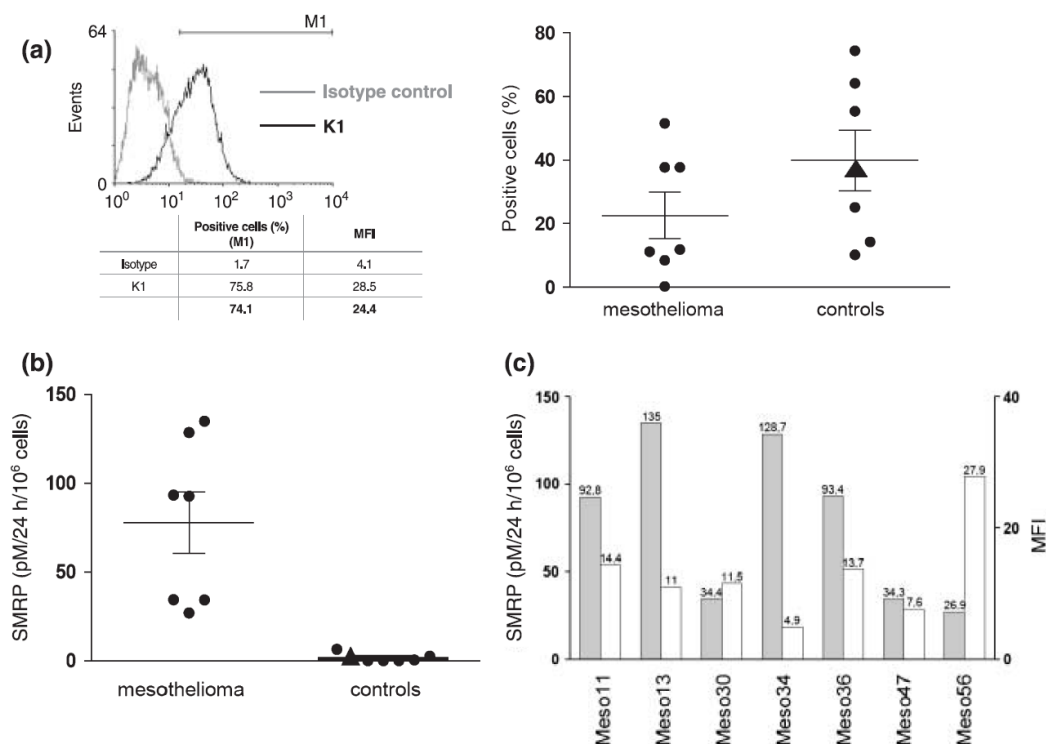


Fig. 1. (a) The M1 marker was used to determine the percentage of mesothelin-positive cells. Mean fluorescence intensity (MFI) was determined by subtracting the values of cells labeled with isotype control from those labeled with K1 antibody. (a) Cellular mesothelin expression and (b) soluble mesothelin-related protein (SMRP) levels from culture supernatants were compared between mesothelioma and control groups ($P > 0.2$ and $P < 0.001$, respectively). The MeT-5A values are indicated by triangle symbols. Mean and SEM are represented for each group. (c) Comparison of cellular mesothelin expression (MFI, white bars) and soluble mesothelin production (SMRP, gray bars) for mesothelioma cell lines.

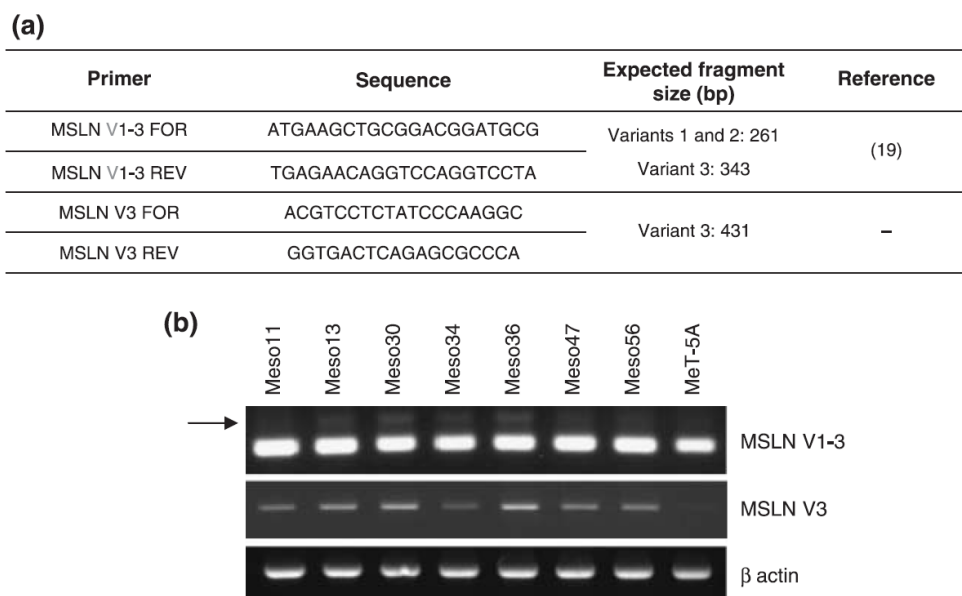


Fig. 2. (a) The table gives information on mesothelin (MSLN) variant 1–3 and variant 3 primers used in the polymerase chain reaction (PCR) experiments. (b) The relative expression of mesothelin variants was investigated in malignant pleural mesothelioma and MeT-5A cell lines (black arrow indicates the fragment corresponding to variant 3). β-Actin was amplified for each cell line to check cDNA integrity. The PCR products were separated by electrophoresis on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide.

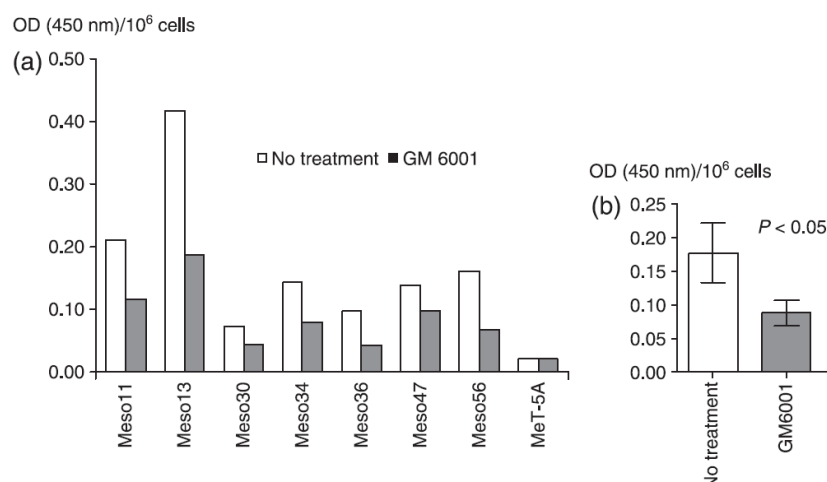


fig. 3. (a) Soluble mesothelin-related protein (SMRP) production was quantified in culture supernatants from untreated (white bars) and GM6001-treated (gray bars) malignant pleural mesothelioma (MPM) and MeT-5A cell lines. (b) The histogram shows normalized optical density (OD) means obtained for MPM cells incubated with (gray bar) or without (white bar) GM6001. SEM are represented for each group.

displayed similar mesothelin expression profiles between MPM and control groups (including several cancer and mesothelial cell lines). Apart from the upregulated mesothelin gene expression that has already been described in mesothelioma,^(15,16) significant overexpression of cellular mesothelin protein was not observed. This observation was not consistent with the feature of a differentiation antigen generally being overexpressed by tumoral cells. We therefore wondered whether this surprising observation could be explained by the capacity of MPM cells to produce soluble mesothelin. Until now, SMRP detection was essentially carried out using body fluids from mesothelioma patients,^(8–12) and the production of SMRP by mesothelioma cells has never been assessed directly. For that purpose, SMRP concentrations were compared in culture supernatants derived from mesothelioma and control cell lines. Our *in vitro* results confirm that soluble mesothelin production is associated with MPM-related tumoral transformation, as previously described by *in vivo* studies carried out on sera^(8–10) and pleural effusions.^(10–12) Interestingly, our results also indicate that the production of soluble mesothelin was independent of the cellular or molecular components potentially provided by the tumor environment.⁽¹⁷⁾ Indeed, the mesothelioma cell lines are able to produce SMRP on their own, suggesting that MPM-associated cellular machinery is sufficient to lead to mesothelin release.

As aberrant splicing phenomena are specific hallmarks of many tumoral cells,⁽¹⁸⁾ the production of soluble mesothelin could be related to abnormal splicing events. Indeed, release of SMRP may result from premature proteosynthesis termination, due to lack of intron splicing between exons 16 and 17, leading to the production of a secreted protein without a membrane-anchor sequence. This aberrant RNA transcript is already referred as variant 3.^(4,7) RT-PCR characterization of the relative expression of mesothelin variants, carried out in ovarian adenocarcinoma cell lines and primary tumors, revealed that mesothelin variant 3 represents the major mRNA detected in these samples.⁽¹⁹⁾ In the same way, we used RT-PCR experiments with primers specific for variants 1–2 and 3 to distinguish between the different mesothelin-encoding transcripts expressed by mesothelioma cells. According to our experimental data, it seems that some aberrant splicing events, responsible for the production of a minor RNA transcript (variant 3), can effectively lead to the release of soluble mesothelin by MPM cells. However, detection of mesothelin variant 3 remains to be confirmed in tumor samples

from mesothelioma patients. As variant 3 expression by MPM cells appears to be restricted when evaluated by the RT-PCR method, it may not explain the overall SMRP serum titre detected in mesothelioma patients.^(8–12) We could not assess the relative importance of aberrant splicing in SMRP production by MPM cells, neither with the MesoMark test that detects both mesothelin variants 1 and 3 without distinguishing between them,⁽²⁰⁾ nor with western blot experiments because there is currently no commercially available antibody specific for each variant. At present, our experimental results do not exclude the intervention of this mechanism in SMRP production.

Shedding of membrane-bound mesothelin from the cell surface may be a complementary mechanism. Indeed, sequencing of SMRP isolated from malignant effusions⁽²⁰⁾ or from tumor cell culture supernatants⁽²¹⁾ have identified the extracellular domain of membrane-bound mesothelin as the biomarker detected previously in published clinical studies, thus strengthening this hypothesis. Mesothelin is a GPI-linked glycoprotein, and such proteins are frequently shed into the serum. Cleavage of GPI-anchored proteins from the cell surface can be mediated by phospholipases⁽²²⁾ or various proteases.⁽²³⁾ As demonstrated recently, mesothelin shedding may not require GPI-specific phospholipase C⁽²¹⁾ but could involve protease-mediated activity.⁽²⁴⁾ Among the potential candidates, two protease families that share a metalloproteinase domain may be involved: the ADAM and MMP families of proteins. Several studies have already demonstrated that MPM produce numerous MMP, namely MMP-1, -2, -3, -7, and -9.^(25,26) We also observed that our MPM cell lines produce active MMP, especially MMP-2 gelatinase activity (Sapede, unpublished data, 2007). Also, several previous studies have reported ADAM expression by human lung cancer (namely ADAM-8, -9, -12, -15, and -28).⁽²⁷⁾ However, there is still no information on ADAM expression by MPM tumors. The results obtained from the GM6001 inhibition experiments thus validate the hypothesis on membrane-bound mesothelin shedding by protease activity, and implicate MMP and ADAM in soluble mesothelin production. However, the only partial reduction in SMRP titres observed in the presence of GM6001 strongly suggest that other mechanisms could also be involved: (1) release of an aberrant splicing product (variant 3) might contribute to SMRP production; (2) expression of additional yet-unidentified molecules (other proteases not targeted by GM6001); or (3) components produced by cells in the stromal environmental

(absent in our *in vitro* model) could also be involved in membrane-bound mesothelin shedding from the cellular surface. The overall precise mechanisms of mesothelin shedding thus need further investigation. Indeed, identification of the sheddases involved may now rely on screening of candidate proteinases (belonging to the MMP or ADAM families) expressed by human mesothelioma cancer and on the use of more-specific inhibitors in order to confirm their role in soluble mesothelin production.

Understanding the mechanisms of soluble mesothelin production has some important clinical implications. Indeed, detection of serological or pleural markers could help to establish an early and reliable MPM differential diagnosis,⁽⁸⁻¹²⁾ develop an efficient prognostic test for screening at-risk asbestos-exposed individuals,^(8,12) monitor cancer progression,⁽⁹⁾ and assess the relevance of a mesothelin-targeted therapeutic approach in mesothelioma patients.⁽²⁸⁾ Identifying new markers (such as soluble members of the MMP and ADAM families) to combine them with the markers already available (SMRP, CA-125, MPF, osteopontin,

CEA, CA-15.3, CA-19.9, and CYFRA 21-1) could be useful for MPM management.⁽²⁹⁾ For instance, using CA-125 detection in association with SMRP detection was reported to significantly improve the early diagnosis of ovarian carcinoma.⁽³⁰⁾ Until now, clinical studies combining SMRP with osteopontin⁽³¹⁾ or CA-125⁽³²⁾ gave disappointing results for the detection of MPM cancer. However, we hope that a combination of MMP or ADAM with SMRP detection in patient sera or pleural effusions could significantly increase the diagnostic and therapeutic efficiency of MPM in the near future.

Acknowledgments

C. S. is a recipient of funding from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), and A. G. of la Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC). This work was supported by INSERM and grants from La Fondation Weisbren-Benenson and La Ligue Régionale Contre le Cancer (Comités de Vendée, de Pays de Loire et du Morbihan).

References

- Robinson BWS, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005; **366**: 397-408.
- Scherpereel A. Guidelines of the French speaking society for chest medicine for management of malignant pleural mesothelioma. *Respir Med* 2007; **101**: 1265-76.
- Ordenez NG. Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Mod Pathol* 2003; **16**: 192-7.
- Hassan R, Bera T, Pastan I. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 3937-42.
- Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 136-40.
- Kojima T, Oh-eda M, Hattori K *et al*. Molecular cloning and expression of megakaryocyte potentiating factor cDNA. *J Biol Chem* 1995; **270**: 21 984-90.
- Scholler N, Fu N, Yang Y *et al*. Soluble member(s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11 531-6.
- Robinson BWS, Creaney J, Lake R *et al*. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 2003; **362**: 1612-16.
- Hassan R, Remaley AT, Sampson ML *et al*. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 447-53.
- Grigoriu B, Scherpereel A, Devos P *et al*. Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 2928-35.
- Scherpereel A, Grigoriu B, Conti M *et al*. Soluble mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **173**: 1155-60.
- Creaney J, Yeoman D, Naumoff LK *et al*. Soluble mesothelin in effusions: a useful Tool for the diagnosis of malignant mesothelioma. *Thorax* 2007; **62**: 569-76.
- Chang K, Pastan I, Willingham MC. Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. *Int J Cancer* 1992; **50**: 373-81.
- Onda M, Willingham M, Nagata S *et al*. New monoclonal antibodies to mesothelin useful for immunohistochemistry, fluorescence-activated cell sorting, western blotting, and ELISA. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 5840-6.
- Frierson HFJ, Moskaluk CA, Powell SM *et al*. Large-scale molecular and tissue microarray analysis of mesothelin expression in common human carcinomas. *Hum Pathol* 2003; **34**: 605-9.
- Wali A, Morin PJ, Hough CD *et al*. Identification of intelectin overexpression in malignant pleural mesothelioma by serial analysis of gene expression (SAGE). *Lung Cancer* 2005; **48**: 9-29.
- Zhong J, Gencay MMC, Bubendorf L *et al*. Erkl/2 and p38 MAP kinase control MMP-2, MT1-MMP, and TIMP action and affect cell migration: a comparison between mesothelioma and mesothelial cells. *J Cell Physiol* 2006; **207**: 540-52.
- Venables JP. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res* 2004; **64**: 7647-54.
- Muminova ZE, Strong TV, Shaw DR. Characterization of human mesothelin transcripts in ovarian and pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2004; **4**: 19.
- Hellstrom I, Raycraft J, Kanan S *et al*. Mesothelin variant 1 is released from tumor cells as a diagnostic marker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; **15**: 1014-20.
- Ho M, Onda M, Wang Q, Hassan R, Pastan I, Lively MO. Mesothelin is shed from tumor cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; **15**: 1751.
- Lauc G, Heffer-Lauc M. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1760**: 584-602.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 161-74.
- Chang K, Pai LH, Batra JK, Pastan I, Willingham MC. Characterization of the antigen (CAK1) recognized by monoclonal antibody K1 present on ovarian cancers and normal mesothelium. *Cancer Res* 1992; **52**: 181-6.
- Liu Z, Ivanoff A, Klominek J. Expression and activity of matrix metalloproteinases in human malignant mesothelioma cell lines. *Int J Cancer* 2001; **91**: 638-43.
- Edwards JG, McLaren J, Jones JL, Waller DA, O'Byrne KJ. Matrix metalloproteinases 2 and 9 (gelatinases A and B) expression in malignant mesothelioma and benign pleura. *Br J Cancer* 2003; **88**: 1553-9.
- Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* 2007; **98**: 621-8.
- Zhang Y, Xiang L, Hassan R, Pastan I. Immunotoxin and taxol synergy results from a decrease in shed mesothelin levels in the extracellular space of tumors. *PNAS* 2007; **104**: 17099-104.
- Scherpereel A, Lee YG. Biomarkers for mesothelioma. *Curr Opin Pulm Med* 2007; **13**: 339-443.
- McIntosh MW, Drescher C, Karlan B *et al*. Combining CA 125 and SMR serum markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; **95**: 9-15.
- Grigoriu BD, Scherpereel A, Devos P *et al*. Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 2928-35.
- Creaney J, van Bruggen I, Hof M *et al*. Combined CA125 and mesothelin levels for the diagnosis of malignant mesothelioma. *Chest* 2007; **132**: 1239-46.

II. Stratégies d'immunothérapies

CONTEXTE :

Plusieurs approches de thérapies sont envisagées en tant que thérapies adjuvantes pour améliorer le traitement du mésothéliome, qui ne répond pas de façon satisfaisante aux protocoles conventionnels (Nowak *et al.*, 2002). L'activation du système immunitaire du patient en vue de détruire une partie de ses cellules tumorales représente une approche séduisante. De nombreux protocoles d'immunothérapie sont testés dans le monde entier, allant de la stimulation non spécifique des effecteurs via des cytokines à l'injection d'immunotoxines dirigées contre la MSLN. Au laboratoire, nous travaillons sur un protocole d'immunothérapie active, basé sur l'injection de DC chargées en antigènes de tumeurs pour stimuler les effecteurs contre ces cibles tumorales. Ce type d'approche a déjà démontré son efficacité dans la prise en charge de nombreux cancers (Palucka *et al.*, 2007).

Peu d'antigènes spécifiques du mésothéliome étant connus pour le moment, nous avons choisi d'utiliser des cellules tumorales mortes, qui ont l'avantage d'apporter des AAT sans qu'il soit nécessaire de les identifier. Il a déjà été démontré qu'il était possible d'activer des lymphocytes T CD8 en chargeant des DC avec des cellules mortes par apoptose (Albert *et al.*, 1998b). Cependant, des réponses inhibitrices ont aussi été rapportées suite à un chargement des DC avec des cellules apoptotiques (Albert *et al.*, 2001; Steinman *et al.*, 2000). Nous nous sommes donc intéressé aux signaux (de type « danger ») (Matzinger, 2002) à apporter simultanément au chargement des DC afin que celles-ci activent efficacement les effecteurs et n'orientent pas la réponse vers une tolérance. Dans un premier temps, nous avons étudié l'immunogénicité des cellules apoptotiques ayant subies ou non un choc thermique puis, dans un second temps, l'immunogénicité des cellules tumorales mortes suite à une infection virale.

II.1. Immunogénicité des DC ayant phagocyté des cellules tumorales apoptotiques stressées par un choc thermique

ARTICLE 2: *Cytotoxic T-cell responses against mesothelioma by apoptotic cell-pulsed dendritic cells*. Am. J. Respir. Crit. Care. Med (2004) 169(12) : 1322-30. F. Ebstein, C. Sapede, P.J. Royer, M. Marcq, C. Ligeza-Poisson, I. Barbieux, L. Cellerin, G. Dabouis and M. Grégoire.

OBJECTIFS ET RÉSULTATS PRINCIPAUX :

Dans cet article, nous montrons la faisabilité de générer, dans des conditions allogéniques, des réponses T cytotoxiques dirigées contre des tumeurs de MPM. Des lymphocytes naïfs ont été stimulés par des DC ayant phagocyté des corps apoptotiques de cellules tumorales. L'apoptose des cellules tumorales ayant servi au chargement a été induite par un traitement UV suite à un choc thermique (condition HS UV) ou non (condition UV). En comparant ces deux conditions, nous avons vérifié que le choc thermique ne modifiait ni la capacité des cellules tumorales à entrer en apoptose, ni la capacité des DC à phagocyter ces corps apoptiques. Quelle que soit la condition, la phagocytose des corps apoptotiques par les DC a induit une très légère diminution de l'expression des marqueurs de maturation des DC. D'un point de vue fonctionnel, les DC ayant phagocyté les cellules tumorales, stressées ou non, ont produit des quantités équivalentes d'IL-12 que les DC non chargées matures. En revanche, la présence d'IL-10 n'a été observée que dans les milieux provenant des DC matures préalablement chargées en corps apoptotiques (stressés ou non). Jusqu'ici, les deux conditions « UV » et « HS UV » semblent donc avoir un impact semblable sur les DC les ayant phagocyté.

Cependant, seules les DC ayant ingéré des cellules apoptotiques ayant préalablement subi un choc thermique et exprimant l'HSP70 se sont avérées capables d'induire une réponse T cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales de MPM. Il faut noter que l'implication de l'HSP70 dans l'initiation de l'immunité n'a pas été formellement démontrée. Il n'est pas exclu que d'autres protéines induites par le choc thermique aient joué un rôle dans l'augmentation de l'immunogénicité des cellules apoptotiques et l'activation des DC (Basu & Srivastava, 2000; Srivastava, 2002). La plupart des gènes dont l'expression est induite après choc thermique codent pour des protéines qui fonctionnent soit comme des molécules chaperonnes (de type

HSP), soit comme des médiateurs de la dégradation protéique. Il est vraisemblable que, dans notre étude, le choc thermique soit essentiel à l'initiation d'une réponse CTL via l'augmentation de l'expression de protéines chaperonnes, dont l'HSP70. Les mécanismes précis par lesquels l'HSP70 issue des cellules apoptotiques stressées ont conduit les DC vers une stimulation efficace de l'activité anti-tumorale sont inconnus. Les deux préparations apoptotiques ont un impact similaire sur la maturation des DC (TNF α – poly(I:C)) et la prise en charge des cellules apoptotiques exprimant l'HSP70 n'a pas induit de maturation spontanée des DC, contrairement à ce qui a déjà été décrit (Feng *et al.*, 2002). L'immunogénicité des cellules apoptotiques stressées exprimant l'HSP70 n'est donc pas due à une augmentation de la sensibilité des DC à l'induction de la maturation. L'hypothèse que nous privilégions est que, suite à la phagocytose par les DC, l'HSP70 dirige les antigènes avec lesquels elle interagit vers des SR (LOX-1 par exemple), favorisant ainsi le chargement des DC avec le matériel antigénique (Delneste *et al.*, 2002).

Cytotoxic T Cell Responses against Mesothelioma by Apoptotic Cell-pulsed Dendritic Cells

Frédéric Ebstein, Carole Sapède, Pierre-Joseph Royer, Marie Marcq, Catherine Ligeza-Poisson, Isabelle Barblieux, Laurent Cellerin, Gérard Dabouis, and Marc Grégoire

Unité INSERM U601, Institut de Biologie, and Service d'Oncologie Thoracique et Digestive, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France

Malignant pleural mesothelioma is an uncommon tumor largely confined to the thoracic cavity, which is resistant to conventional therapies, therefore prompting an intensive search for effective treatment alternatives. This study focuses on dendritic cell (DC) vaccination for malignant pleural mesothelioma and evaluates the *in vitro* efficacy of antigen-loaded DC-based vaccines for the induction of major histocompatibility complex Class I-restricted antimesothelioma cytotoxic T lymphocyte responses. The source of tumor-associated antigens for HLA-A2⁺ DCs from healthy donors was apoptotic HLA-A2⁺ mesothelioma cells either lacking or expressing heat shock protein 70 according to whether tumor cells were heat shocked or not before ultraviolet-mediated apoptosis. Our results show that both apoptotic preparations were equivalent regarding the responsiveness of DCs to combined treatment with tumor necrosis factor- α and poly(inosinic-cytidylic) acid, as determined by similar increased expression of costimulatory molecules and interleukin-12 production. However, only DCs loaded with apoptotic heat shock protein 70-expressing cells were found to be potent *in vitro* inducers of cytotoxic T lymphocyte activity against HLA-A2⁺ mesothelioma cells. Such elicited cytotoxic T lymphocytes also exhibit cytotoxic activity against an HLA-A2⁺ melanoma cell line, suggesting recognition of shared antigens. These findings therefore carry the potential of offering an alternative, promising approach for the therapy of patients with malignant pleural mesothelioma.

Keywords: apoptotic cells; dendritic cells; heat shock proteins; immunotherapy; mesothelioma

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is expected to increase in most industrialized countries because of the widespread use of asbestos over the past century (1–3). MPM is an aggressive tumor generally arising from serosal cavities and whose latency period is between 15 and 40 years (4). The prognosis for patients with this disease is poor, as the overall median survival ranges from 1 to 9 months (5). In spite of the effectiveness of lovastatin and talc to kill mesothelioma cells *in vitro* (6, 7), therapy of MPM remains challenging because conventional treatments such as surgical resection followed by radiotherapy and/or chemotherapy do not significantly improve the outcome of the disease (8–11). Likewise, alternative therapeutic strategies based on pleural injections of recombinant cytokines (e.g., interleukin

[IL]-2, IL-12, and IFN- γ) remain quite unsatisfactory as they have shown little potential for improving the overall survival of patients with MPM (12–15).

One possibility for improved treatment may be the design of new immunotherapeutic strategies. Such an approach involves the activation of tumor-specific T cells and their migration to the tumor site, where the recognition of relevant elements leads to the elimination of tumor cells (16). To date, much attention has been focused on active immunotherapy involving dendritic cells (DCs) as vectors for antigenic targets (17, 18). DCs are now commonly described as highly potent professional antigen-presenting cells that are uniquely capable of priming naive T cell responses (19, 20). Indeed, DC-based vaccination strategies have yielded encouraging clinical data in patients with metastatic malignant melanoma (21–23) or renal cell carcinoma (24, 25).

The source of tumor-associated antigens (TAA) for DCs remains a critical issue that will determine the efficacy of DC-based vaccination. Most current clinical vaccination protocols are based on pulsing DCs with MHC Class I-restricted peptides of known sequence, therefore requiring previous identification and characterization of antigenic epitopes. To date only a few TAAs for MPM have been defined, such as those belonging to the cancer testis antigens (26).

For this reason, we focused on another approach to TAA delivery, based on the uptake of dead cells (necrotic or apoptotic cells) by immature DCs, which offers several advantages over vaccinating with a single or only a few identified antigens. Indeed, feeding DCs with apoptotic tumor cells provides a full array of antigenic peptides that rapidly gain access to both MHC Class I (cross-presentation) and MHC Class II pathways, therefore leading to a diversified immune response involving cytotoxic T lymphocytes (CTLs) as well as CD4⁺ T cells (27, 28). We have already shown the potential of apoptotic cell-pulsed DCs in eliciting specific MHC Class I-restricted cytotoxic T cell responses both *in vivo* (29, 30) and *in vitro* (31).

Cells dying from apoptosis are thought to be weakly immunogenic as they may significantly impede exogenous stimuli-driven DC maturation (32, 33), thereby modulating the immune response toward tolerance rather than immunity (34). However, reports have argued the feasibility of overriding the inhibitory effects of apoptotic cell ingestion on DC maturation through triggering apoptosis in the presence of "danger signals" such as increased expression of heat shock proteins (HSPs) (35). Indeed, HSPs have been reported to be involved in (1) the induction of DC maturation on binding of several cell surface receptors (36–38) and (2) the protection of antigenic peptides from degradation along the MHC Class I pathway (39). Such key roles therefore emphasize the relevance of providing both HSPs and TAAs for DCs, with the aim of generating efficient tumor-specific immune responses.

The purpose of the present study was to design an *in vitro* model for the development of a therapeutic vaccine against MPM based on apoptotic tumor cell-pulsed DCs. Because the harvest of both tumor cells and peripheral blood mononuclear cells from the same individual with MPM proved to be particularly difficult,

(Received in original form December 10, 2003; accepted in final form March 29, 2004)

Supported in part by INSERM grants and by the Ligue Régionale de Recherche contre le Cancer (Pays de la Loire and Vendée committees), the Association pour la Recherche contre le Cancer, and the Fondation Weisbren-Benenson. F.E. is the recipient of a fellowship from La Région des Pays de la Loire.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Marc Grégoire, Ph.D., INSERM U601, Institut de Biologie, 44093 Nantes Cedex 01, France. E-mail: marc.gregoire@nantes.inserm.fr

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents online at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 169, pp 1322–1330, 2004

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.200312-1683OC on April 7, 2004

Internet address: www.atsjournals.org

an HLA-A2⁻ allogeneic mesothelioma cell line was used for DC-loading experiments. We observed that only DCs fed with apoptotic HSP70-overexpressing mesothelioma cells, generated from an HLA-A2⁻ mesothelioma cell line, were capable of cross-priming naive T cells obtained from HLA-A2⁺ healthy donors for tumor-specific cytotoxic T cell responses against HLA-A2⁺ mesothelioma cells. These findings show the potential of DCs, when pulsed with apoptotic HSP70-expressing mesothelioma cells, for future immunotherapeutic strategies in the treatment of MPM.

METHODS

Media and Cell Lines

The mesothelioma cell lines Meso13 (HLA-A2⁻) and Meso11 (HLA-A2⁺) were established in our laboratory from tumor pleural fluids of patients with histologic diagnosis of epithelioid MPM according to standard methods (Sapede and coworkers, unpublished data). The melanoma cell lines M17 (HLA-A2⁺) and M136 (HLA-A2⁻) were a kind gift from F. Jotereau (U463 INSERM Unit, Nantes, France). Culture medium consisted of RPMI 1640 (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio, Les Ulis, France), 1% penicillin-streptomycin, and 1% L-glutamine (Life Technologies).

DC Preparation

Immature monocyte-derived DCs were generated from leukapheresis products of HLA-A2⁺ healthy donors (Nantes Etablissement Français du Sang, Nantes, France) after obtaining informed consent. Monocytes were enriched by adding monocyte RosetteSep cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) and then separated from leukapheresis products by Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) centrifugation and cultured in X-VIVO 15 medium (Cambrex Bio Science Walkersville, Walkersville, MD) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Leucomax, 500 IU/ml; Novartis, Rueil-Malronion, France) and IL-4 (50 ng/ml; AbCys, Paris, France).

Induction and Detection of Apoptosis

Meso13 tumor cells were induced to undergo apoptosis by exposure to ultraviolet (UV)-B (25 kJ/m²) using a UV-stratalinker 2,400 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). In some experiments, UV-mediated apoptosis was consequently induced after heat shock (30 min, 42°C). Cell death was measured with an annexin-V kit (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) and was quantified by a caspase-3 colorimetric protease assay (CaspACE assay system; Promega, Madison, WI). Additional details are provided in the online supplement.

RNA Isolation and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

One microgram of TRIzol-prepared total RNA was used for reverse transcription with oligo(dT) primers and avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the GAGE-1, -2, and -7; GAGE-3-6 and -8; and β_2 -microglobulin sequences was performed with specific primers (see online supplement).

Apoptotic Cell Loading and DC Maturation

Ingestion of apoptotic tumor cells was assessed by both flow cytometry and confocal microscopy as previously described (40) (see online supplement). Maturation was induced by 48 hours of treatment of a combination of tumor necrosis factor (TNF)- α (20 ng/ml; R&D Systems, Abingdon, UK) and poly(inosinic-cytidylic) acid [poly(I:C); 50 μ g/ml; Sigma, St. Louis, MO].

Flow Cytometric Analysis

Phenotypic marker expression associated with maturation was assessed by flow cytometry, using DCs labeled with the fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD80, CD83, HLA-ABC (Immunotech, Marseille, France), CD86, and HLA-DR (Caltag, Burlingame, CA) antibodies (see online supplement).

Cytokine Detection

IL-10 and IL-12 p70 production was determined by ELISA (BD Biosciences Pharmingen) assays according to the manufacturer's protocol.

In Vitro Sensitizations and Cytotoxicity Assay

The first stimulation was performed in 96-well culture plates by mixing 3×10^4 mature DCs with 3×10^5 responder naive T cells in RPMI 1640 medium containing IL-6 (5 ng/ml). The two subsequent stimulations were performed at 7 days in medium containing IL-2 (25 U/ml) and IL-7 (5 ng/ml) (R&D Systems). The method for measuring cytotoxicity activity is described in the online supplement.

Immunoblotting Analysis

Forty micrograms of protein from each cell extract was electrophoresed in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and immunoblotted with anti-GRP94 (glucose-regulated protein 94), anti-HSP70, anti-HSP60, anti-HSP27 (StressGen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada), and anti-actin (Chemicon International, Temecula, CA) monoclonal antibodies (see online data supplement).

RESULTS

HSP Content in Viable, Stressed, and Killed Mesothelioma Cells

On the basis of more recent findings reporting that HSP may play a key role in promoting antigen DC presentation (37, 38), we first sought to determine whether these proteins were present in Meso13 cells to be used in immunization experiments. As indicated in Figure 1A, Western blotting analysis for HSP revealed high levels of basal expression for GRP94, HSP60, and HSP27 under control conditions, whereas only a weak signal was detected for HSP70. However, exposing the cells to an elevated temperature of 42°C followed by a recovery period of 5 hours at 37°C resulted in a substantial increase in the level of HSP70 protein expression (Figure 1A). To the naked eye, the expression pattern of GRP94, HSP60, and HSP27 in heat-shocked cells seemed quite similar to that noted for control cells.

To better quantify the heat shock effects on HSP expression, we compared the signal intensities of autoradiographs from Western blot analyses of each HSP with those of β -actin, using standard densitometry scanning methods. Hence, normalization experiments with β -actin therefore confirmed that GRP94, HSP60, and HSP27 accumulate only to slightly higher levels as a result of heat treatment whereas a sharp 10-fold increase in HSP70 content was observed as compared with control cells (Figure 1B). This therefore suggests that HSP70 is likely the major HSP to be maximally synthesized in response to a heat shock of 42°C in these cells. However, to further check whether the increased expression of HSP70 might be preserved in the apoptotic process, Western blots were performed on UV-treated cells (as a negative control) and on UV-treated cells after heat shock (HS+UV). As shown in Figure 1C, HS+UV treatment did not affect HSP content, which remained highly abundant as judged by comparison with that detected in UV-treated cells. Collectively, these findings underscore the requirement for heat shocking tumor cells before UV exposure to obtain killed mesothelioma cells expressing high levels of HSP70 as a source of TAA for DCs.

Heat Shock Does Not Modify the Sensitivity of Tumor Cells to UV-mediated Apoptosis

Because HSP70 is also thought to be a protein preventing apoptosis, we further assessed the apoptotic features of viable cells (as a negative control) and of cells undergoing UV, HS, or HS+UV treatments. Annexin-V/propidium iodide (PI) staining indicates that most of the HS-treated cells were annexin-V/PI-

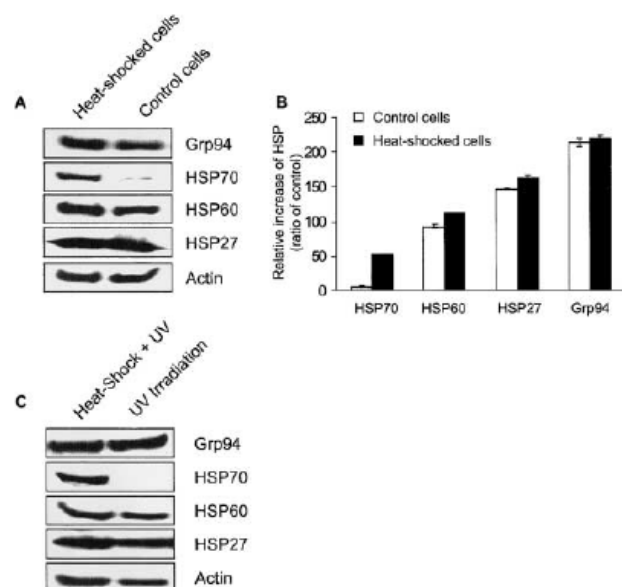


Figure 1. Immunoblotting analysis of heat shock protein (HSP) content in mesothelioma cells. (A) Meso13 cells were exposed to heat shock (HS) at 42°C for 30 minutes and allowed to recover at 37°C for 5 hours. Control cells were maintained at 37°C and harvested together with heat-shocked cells. Cells were lysed in a TRIS buffer and proteins were then separated by 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis after adjusting loading for equal concentration between lanes. Western blots were performed with antibodies against HSP27, HSP60, HSP70, and GRP94. The protein loading in each lane was controlled by membrane hybridization with anti- β -actin. (B) Histogram showing the relative increase in HSP between control and heat-shocked Meso13 cells. Normalization of each HSP with β -actin was determined by densitometric scanning of the presented immunoblots by means of the computer program IPLab (Scanalytics, Fairfax, VA) (the intensity of the bands is expressed in relative units). (C) Western blot analysis for HSP27, HSP60, HSP70, and GRP94 in HS- and non-HS-killed mesothelioma Meso13 cells subsequently exposed to ultraviolet (UV) radiation. Data represent one of three similar experiments.

by dot-blot analysis using flow cytometry, whereas the majority of UV- and HS+UV-treated cells were annexin-V^{high}/PI^{high}, namely late apoptotic, after 24 hours of incubation (Figure 2A).

Cell death was also assayed by measuring the cellular caspase-3 activity in lysates from viable cells (as a negative control) and from UV-, HS-, and HS+UV-treated cells. The representative results shown in Figure 2B confirm that HS-treated cells did not undergo apoptosis, as determined by the cleavage of Ac-DEVD-AMC representing caspase-3 activity, which remained very low and constant over time. Conversely, activation of Ac-DEVD-AMC-specific caspases could be seen as early as 12 hours postincubation in UV-treated cells. Meanwhile, the main peak of caspase activity in HS+UV-treated cells occurred only at 24 hours incubation. This delayed caspase-3 activity might be partially explained by the overexpression of HSP70, which is thought to modulate multiple apoptotic pathways (41). However, the increased caspase-3 activities detected in lysates from both UV- and HS+UV-treated cells within 24 hours therefore indicate that these cells were late apoptotic, but not necrotic, cells. This further underlies the feasibility of producing late apoptotic cells either lacking HSP70 (apo[UV]) or expressing HSP70 (apo[HS+UV]).

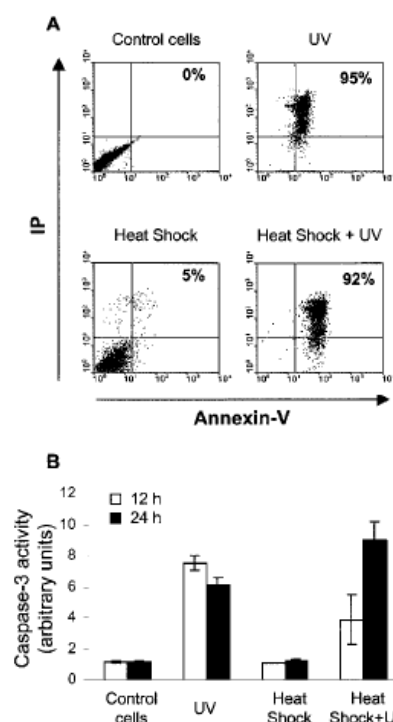


Figure 2. HS treatment before apoptosis induction does not modify the classic features of UV-mediated apoptosis. (A) Flow cytometric assay for apoptosis in Meso13 cells. The cells were treated with UV exposure, HS, or UV exposure after HS (HS+UV) as described in METHODS. The logarithm of fluorescence intensity in the FL1-H channel (*x* axis) is an indicator of phosphatidylserine translocation (early apoptosis event) whereas that in the FL2-H channel (*y* axis) indicates membrane permeability to propidium iodide. Flow cytometry analysis reveals that tumor cells killed by UV or HS+UV are late apoptotic cells. (B) Caspase-3 activities of Meso13 cells. Caspase-3 activities of Meso13 cells killed by UV, HS, or HS+UV were measured in suspended and adherent cells at the indicated times, using the CPP32/Caspase-3 fluorogenic protease assay. Each column displays the mean $\pm$ SD of data from three independent experiments.

DC Engulfment of Apoptotic Mesothelioma Cells

To check whether Day 7 immature DCs may be capable of capturing apoptotic mesothelioma cells, DCs were cocultured with apoptotic cells stained with PKH26 at a ratio of 2:1 for 24 hours. Interactions of HLA-DR-labeled DCs with PKH26-labeled apoptotic cells were then determined by flow cytometry as the percentage of FITC-HLA-DR⁺ DCs that expressed the red dye PKH26. As shown in Figure 3A, most apoptotic mesothelioma cells were efficiently taken up by immature DCs within 24 hours at 37°C, as the whole population consists mainly of PKH26/HLA-DR double-positive cells. In contrast, less than 3% of DCs exhibited PKH26 staining at 4°C, indicating that the process of engulfing apoptotic material was almost completely inhibited (Figure 3B). It should be noted that heat shocking the tumor cells before triggering apoptosis did not affect the capacities of DCs to engulf dying cells because the rates of phagocytosis between apo(UV) and apo(HS+UV) were quite similar, regardless of the level of HSP70 protein expression (Figure 3A, left and right, respectively). Confocal laser-scanning microscopy, which is the only technique permitting discrimination

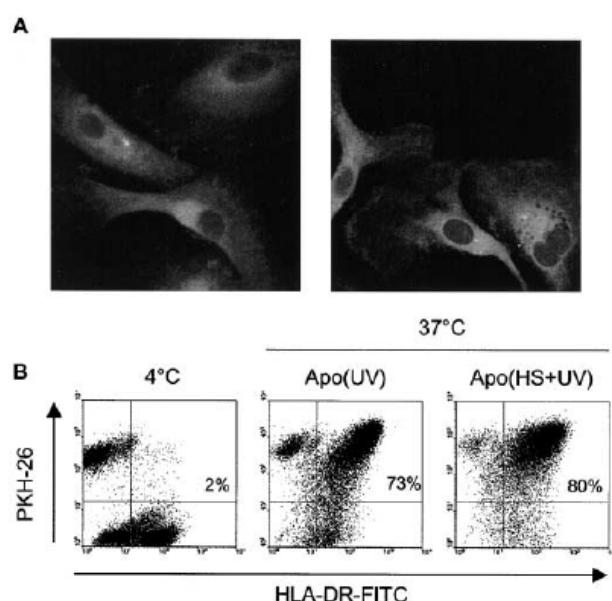


Figure 3. Immature DCs efficiently phagocytose apoptotic mesothelioma cells. Heat-shocked and control cells were labeled with PKH26 before UV exposure. (A) Internalization of PKH26-labeled apo(UV) (left) and PKH26-labeled apo(HS+UV) (right) by immature DCs. After 24 hours of coculture, DCs were subsequently stained with FITC-HLA-DR and analyzed by confocal microscopy. Confocal microscopy confirms efficient uptake of apoptotic mesothelioma cells (red) by immature DCs (9) whatever the apoptosis-inducing strategy used. (B) Day 7 immature DCs were cocultured for 24 hours at either 4°C or 37°C with PKH26-labeled apoptotic mesothelioma cells expressing or not expressing HSP70 and subsequently analyzed by flow cytometry after staining with anti-HLA-DR. DCs that have ingested apoptotic material were identified as HLA-DR/PKH26 double-positive cells. One representative experiment of three with similar results is shown.

between ingestion and simple binding, further confirms the efficient internalization of apoptotic tumor cells by immature DCs, whatever the death-inducing strategy used (Figure 3A).

Apoptotic Mesothelioma Cells Exert Slight Inhibitory Effects on DC Maturation Driven by TNF- α and Poly(I:C)

To ascertain whether apoptotic cell ingestion may impair DC maturation in response to exogenous inflammatory stimuli, DC activation was monitored by evaluating the level of expression of CD80, CD83, CD86, and MHC Class I and II before and after the uptake of these various forms of apoptotic cells. A typical experiment is shown in Figure 4 and a summary of three experiments is shown in Table 1. DCs not exposed to apoptotic tumor cells efficiently progressed toward maturity within 48 hours in response to combined treatment with TNF- α and poly(I:C), as determined by the high-level expression of all phenotypic markers. It was interesting to note that coculturing Day 7 immature DCs with apoptotic cells for 24 hours did not result in spontaneous DC maturation whatever the apoptosis-inducing strategy used, as indicated by the low level of costimulatory molecules and the lack of CD83 (Figures 5A and 5B and Table 1). However, pulsing DCs with apoptotic tumor cells partially affected DC maturation in response to combined treatment with TNF- α and poly(I:C) as indicated by the intensity of surface expression (i.e., mean fluorescence intensity), which remained

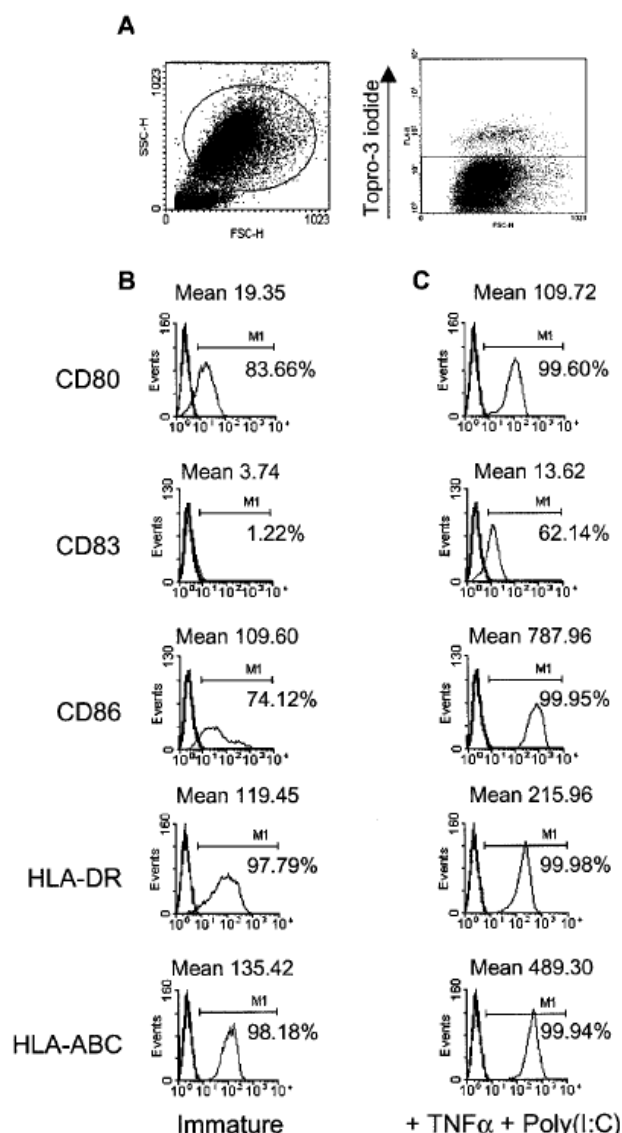


Figure 4. Cell surface phenotype of DCs exposed to a combination of TNF- α and poly(I:C). Viable DCs can be distinguished from dead cells by forward scatter (FSC-H) and exclusion of TO-PRO-3 iodide (A). Immature DCs were left untreated (B) or matured with the combination of TNF- α plus poly(I:C) (C). Subsequently, DCs were harvested, stained for the indicated cell surface molecule, and analyzed by three-color flow cytometry. The incidence of cells expressing the antigen is indicated under the scale bars within each histogram. Thick lines show nonspecific fluorescence by subclass monoclonal antibodies. Shown is one representative experiment of three performed.

low for both MHC Class I and II molecules (Figure 5 and Table 1). These results are consistent with precedent findings reporting the inhibitory effects of apoptotic cell ingestion on DC maturation (33).

As shown in Figure 5 and Table 1, regarding CD80, CD83, and CD86 molecule expression DCs loaded with apo(HS+UV) progress in maturation to a similar extent as seen with unpulsed DCs when exposed to 48-hour combined treatment with TNF- α and poly(I:C). Likewise, activating DCs that have ingested

TABLE 1. DENDRITIC CELL MATURATION AFTER UPTAKE OF APOPTOTIC MESOTHELIOMA CELLS

	DC Phenotype [‡]				
	CD80 [§]	CD83 [§]	CD86 [§]	HLA-ABC [§]	HLA-DR [§]
Immature*					
Unpulsed DCs	20.13	5.6	39.78	135.21	142.36
apo(UV)-pulsed DCs	15.65	3.85	26.93	139.32	133.73
apo(HS+UV)-pulsed DCs	14.22	4.33	24.65	105.81	96.4
+ TNF- α					
Unpulsed DCs	49.34	60.54	728.31	420.87	197.7
+ Poly(I:C) [†]					
apo(UV)-pulsed DCs	42.07	33.31	658.97	303.81	159.97
apo(HS+UV)-pulsed DCs	53.62	51.41	738.79	316.56	150.47

Definition of abbreviations: apo(HS+UV) = apoptotic cells treated with heat shock and ultraviolet light, and expressing HSP70; apo(UV) = apoptotic cells treated with ultraviolet light, and lacking HSP70; DCs = dendritic cells; I:C = inosinic-cytidylic; TNF- α = tumor necrosis factor- α .

* Day 7 immature DCs were cocultured for 24 hours with or without apoptotic mesothelioma cells.

[†] The combination of TNF- α and poly(I:C) was added to DCs for 48 hours.

[‡] Expression of CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, and HLA-DR on DCs was evaluated by flow cytometry.

[§] Results are expressed as mean fluorescence intensity.

^{||} Results are expressed as a percentage of positive cells.

^{||} Represents significant phenotypic changes in comparison with DCs cultured alone that have been subjected to a 48-hour treatment of TNF- α and poly(I:C) (unpaired Student *t* test, *p* < 0.01). Results are representative of three independent experiments.

apo(UV) with TNF- α plus poly(I:C) led to increased expression of costimulatory molecules, but not CD83, whose upregulation was slightly but significantly reduced by about 15%. Taken together, these results underscore the slight immunosuppressive activity exerted by apoptotic cell ingestion by specifically pre-

venting the upregulation of MHC molecules despite exposure to strong combined treatment with TNF- α and poly(I:C). Nonetheless, and in contrast to previous data (42), no significant differences could be detected in costimulatory molecule upregulation between apo(UV)- and apo(HS+UV)-pulsed DCs, which are known to play a crucial role in T cell stimulation, the expression levels of which remained unaffected. It may be due to the use of complete medium supplemented with 10% fetal calf serum in these experiments, which is thought to ease the inhibitory effects of apoptotic cell ingestion on DC maturation (unpublished observations).

Apoptotic Cell-pulsed DCs Drive a Helper T Cell Type 1 Cytokine Response

To further investigate the effects of apoptotic cell loading on cytokine production by DCs, supernatants from unpulsed DCs (which served as a control) and DCs pulsed with various forms of apoptotic cells were quantified for IL-12 p70 and IL-10 before and after a 48-hour incubation with a combination of TNF- α and poly(I:C).

IL-12 p70 heterodimer is the bioactive form of IL-12 that has been shown to play a key role in the induction of IFN- γ -secreting helper T Type 1 cells. As indicated in Figure 6A, IL-12 p70 values from DCs that had not been stimulated with the combination of TNF- α plus poly(I:C) were low, ranging from 0.5 to 0 pg/ml (i.e., near or below the detection limit) in all situations. These data are consistent with the interpretation that IL-12 synthesis is not performed by DCs exhibiting an immature phenotype, as determined on the basis of cell surface markers. By contrast, treatment with TNF- α and poly(I:C) for 48 hours resulted in a significant increase in bioactive IL-12 production by both unpulsed and pulsed DCs (Figure 6A). It should be noted that the IL-12-inducing capacity of the combination treatment with TNF- α plus poly(I:C) was similar for both apo(UV)- and apo(HS+UV)-pulsed DCs.

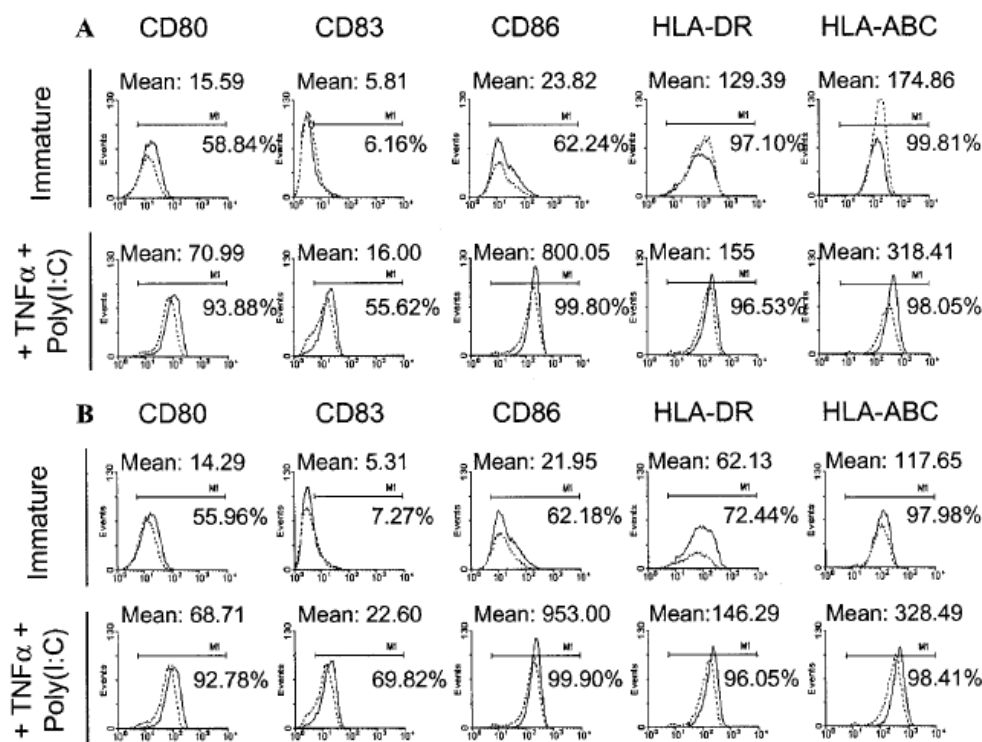


Figure 5. DC maturation is slightly inhibited by the uptake of mesothelioma apoptotic cells whatever the death-inducing strategy used. (A) Maturation marker expression on apo(UV)-pulsed DCs (dashed lines) compared with unpulsed DCs (solid lines) before (top) and after 48-hour treatment with a combination of TNF- α and poly(I:C) (bottom). (B) Phenotypic characteristics of apo(HS+UV)-pulsed DCs (dashed lines) in comparison with unpulsed DCs (solid lines) before (top) and after combined treatment with TNF- α and poly(I:C) (bottom). Numbers under the scale bars represent the percentage of gated cells expressing the indicated antigen. Data are representative of three independent experiments.

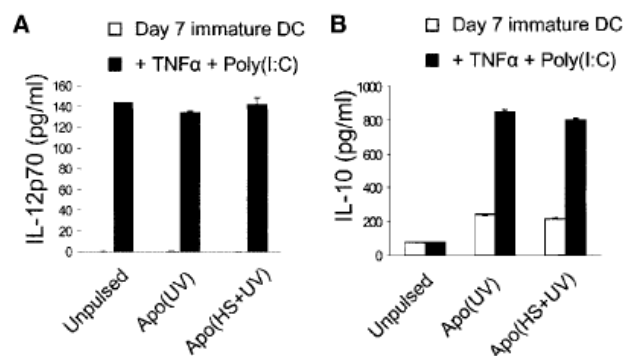


Figure 6. Uptake of apoptotic mesothelioma cells does not inhibit DC secretion of cytokines in response to TNF- α plus poly(I:C). Forty-eight hours after induction of maturation with TNF- α plus poly(I:C), supernatants from unpulsed, apo(UV)-pulsed, and apo(HS+UV)-pulsed DCs were harvested and assayed by ELISA for IL-12 p70 (A) and IL-10 (B). Values represent means $\pm$ standard deviation of duplicate determinations.

We next determined the concentration of IL-10, which is an immunosuppressive cytokine, in the same 48-hour culture media. As shown in Figure 6B, unpulsed DCs exposed to combined treatment with TNF- α and poly(I:C) for 48 hours did not produce higher levels of IL-10 than did immature DCs. Interestingly, the IL-10-inducing capacity of combined treatment with TNF- α and poly(I:C) was restricted to DCs that have ingested apoptotic material, regardless of the death-inducing strategy used. Indeed, significant levels of basal secretion of IL-10 were detected in DCs that had ingested apo(UV) or apo(HS+UV); these levels were further augmented after the addition of the maturation-inducing agents.

DCs Loaded with Apoptotic Mesothelioma Cells Expressing HSP70 Prime Naive CD8⁺ T Cells to Differentiate into Mesothelioma-specific CTLs

We next investigated the ability of DCs loaded with apoptotic cells to induce CTLs with cytolytic activity for HLA-matched and -mismatched target mesothelioma cells. *In vitro* sensitizations of autologous CD8⁺ T cells by pulsed or unpulsed DCs were established as described in METHODS.

After weekly stimulation for 3 weeks, T cells were harvested and CD8⁺ T cells were depleted from the cell suspension, using magnetic bead-conjugated anti-human CD4 monoclonal antibody, and tested for their cytotoxic activity against either Meso11 (HLA-A2⁺) or Meso13 (HLA-A2⁻) (which served as a negative control) mesothelioma cell lines.

As shown in Figure 7, CD8⁺ T cells derived from T lymphocytes sensitized with DCs loaded with apoptotic cells lacking HSP70 did not show any cytotoxicity against either Meso11 (HLA-A2⁺) cells or Meso13 (HLA-A2⁻) cells. In contrast, CTL lines generated with DCs and apoptotic cells expressing HSP70 enhanced cytotoxic activity to Meso11 cells (Figure 7A). As shown in Figure 7B, Meso13 cells were killed to a minor extent only, as the lysis was similar to that obtained by CD8⁺ T cells that had been cultured with unpulsed DCs, therefore emphasizing that the cytotoxic activity was HLA-A2 restricted. This implies that the cytolytic capacities of the expanded CD8⁺ T cells are likely not attributable to the release of soluble antigens from apoptotic cells that have failed to be taken up by DCs. The cytotoxic activity to Meso11 cells was substantially reduced when tumor cells were preincubated with an MHC Class I-blocking

antibody (W6/32) before adding effector cells, therefore confirming that tumor cell lysis was specific and MHC Class I restricted (Figure 7C). Unspecific lysis mediated by natural killer cells was also excluded as no significant lysis could be detected (less than 5%) when cytotoxicity was directed against natural killer cell-sensitive K562 cells (data not shown).

DCs Loaded with Apo(HS+UV) Efficiently Sensitize CD8⁺ T cells to Kill HLA-A2⁺ Melanoma Cells

Sigalotti and coworkers suggested that the pattern of expression of cancer testis antigens belonging to the *MAGE*, *GAGE*, and *SSX* gene families in MPM cells was quite consistent with that reported in metastatic melanomas (26). This prompted us to analyze Meso11 and Meso13 mesothelioma cells, as well as M17 and M136 melanoma cells (as a positive control), for gene expression using PCR primers designated to give cDNA-specific bands (all *GAGE* primer pairs and β_2 -microglobulin). As expected, mRNA for all *GAGE* subtypes was clearly evident in M17 and M136 melanoma cell lines (Figure 8A). Interestingly, mRNAs for *GAGE-1*, -2, and -7 and for *GAGE-3-6* and -8 were significantly expressed by Meso13 cells, which were used for immunization experiments. By contrast, little or no expression of the *GAGE* genes was found in Meso11 cells (Figure 8A). In all cases, RT-PCR amplification of β_2 -microglobulin mRNA, a housekeeping gene, was included as a control to ascertain the appropriate quality and quantity of the various RNA samples. Otherwise, it is of note that we failed to detect *MAGE* and *SSX* genes in both Meso13 and Meso11 mesothelioma cell lines (data not shown), thereby emphasizing that the *GAGE* gene was the predominantly expressed shared antigen between the two tumors.

We thus assessed the ability of CTLs generated by sensitizations with DCs loaded with apo(HS+UV) mesothelioma cells to kill melanoma cell lines. Hence, after three weekly stimulations, CD8⁺ T cells were sorted from the cell suspension and incubated with ⁵¹Cr-labeled M17 or M136 melanoma cells. The result, reproduced in Figure 8B, shows that CTLs were able to kill M17 (HLA-A2⁺) cells with up to 40% specific lysis, but not M136 (HLA-A2⁻) cells. When experiments were performed in the presence of the MHC Class I-blocking antibody W6/32, CTL-mediated cytotoxic activity toward M17 cells was effectively blocked (Figure 8C). Again, these effector cells were incapable of lysing the natural killer cell-sensitive cell line K562 (data not shown). These results demonstrate as a novel finding that priming of CD8⁺ T cells with DCs loaded with apoptotic Meso13 mesothelioma cells can generate CTL lines specific for antigens expressed by M17 melanoma cells.

DISCUSSION

Because MPM responds only poorly to conventional therapies, new immunization strategies may represent highly promising therapeutic options. Indeed, DC-based vaccines may offer such an approach, because encouraging results have been achieved in patients with various tumor diseases such as malignant melanoma (21–23) or renal cell carcinoma (24, 25). In this study, we have investigated the ability of monocyte-derived DCs of HLA-A2⁺ healthy donors loaded with antigen preparations from the allogeneic HLA-A2⁻ Meso13 mesothelioma cell line to induce an antitumor T cell response in a cross-presentation *in vitro* model.

To the best of our knowledge, the present report is the first to demonstrate, in human MPM, that apoptotic tumor cell-pulsed DCs are able to induce a Class I-restricted cytotoxic T cell response against MPM tumor cells. Consistent with the report of Feng and coworkers (35), heat shocking the tumor cells before apoptosis induction was required to induce potent cross-priming

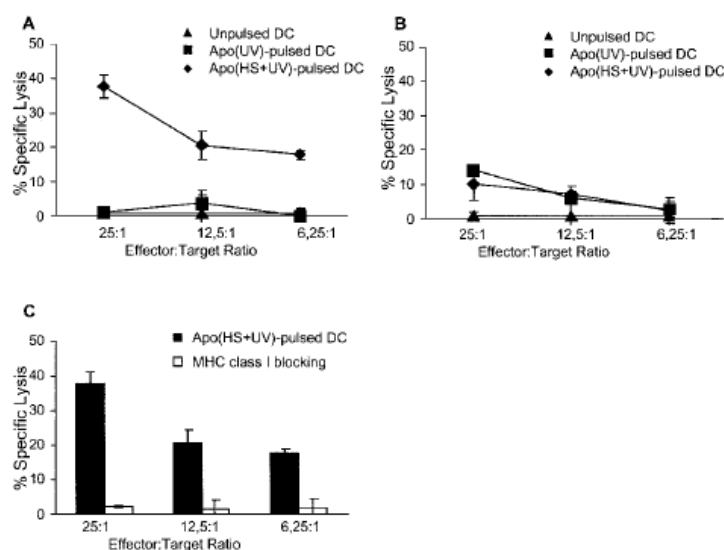


Figure 7. DCs loaded with apoptotic mesothelioma cells expressing HSP70 induce CTLs to shared antigens. (A) T cells derived from sensitizations with unpulsed DCs (solid triangles), apo(UV)-pulsed DCs (solid squares), and apo(HS+UV)-pulsed DCs (solid diamonds) were used as effector cells in a chromium release assay, in which HLA-A2⁺ Meso11 cells were used as target cells. Lysis of HLA-A2⁺ Meso11 cells by apo(HS+UV)-pulsed DC-sensitized T cells is significantly different from that by apo(UV)-pulsed and unpulsed DC-sensitized T cells (Student *t* test, *p* < 0.01). (B) T cells from cocultures with unpulsed DCs or DCs pulsed with apo(UV) or apo(HS+UV) were transferred into wells with ⁵¹Cr-labeled HLA-A2⁺ Meso13 cells at the indicated ratios. Results are representative of two experiments, and each value represents the mean of triplicate wells. (C) To prevent CTL-mediated lysis, Meso11 tumor cells were preincubated with the MHC Class I-blocking antibody W6/32.

of CTLs with antitumor activity. Indeed, only DCs fed apoptotic HSP-overexpressing cells were capable of inducing a strong cytotoxic T cell response, specific for MPM tumor cells. However, it should be noted that the involvement of HSP in the induction of immunity has not been addressed experimentally, but only correlated. Indeed, one cannot exclude that HS-associated genes other than those belonging to HSP family might account for the induced cross-priming of CTLs. Nonetheless, and as reported by Schena and colleagues (43), most of the genes upregulated after HS are thought to encode factors that function either as "molecular chaperones" (i.e., HSP) or as mediators of protein degradations. Hence, in our study, it is highly conceivable that HS might be essential thanks to the increased expression of HSP70, which was the HSP maximally synthesized. In agreement with this statement, a study has shown that tumor-specific T cell responses could be achieved in a lung cancer model, provided that antigenic peptides were associated with HSP70 (44).

Nevertheless, the accurate mechanisms by which apoptotic cell-derived HSP70 targets DCs to lead to potent stimulation of antitumor activity remain unclear. Evidence is accumulating to suggest that HSP70 is a direct activator of DCs, inducing a conversion to a mature phenotype highly efficient in T cell activation (38). Indeed, a variety of cell surface proteins have been reported to stimulate the immune system on binding of HSP70 in model cell systems, including CD91 (45) or Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 (46–48). In contrast with previous data (42), the uptake of apoptotic HSP70-expressing cells did not result in spontaneous DC maturation. It is noteworthy that both apoptotic preparations used in this study were almost equivalent regarding the responsiveness of DCs to classic maturation-inducing agents, whatever the death-inducing strategy used. Hence, in regard to costimulatory molecules, apoptotic cell-pulsed DCs exposed to combined treatment with TNF- α and poly(I:C) for 48 hours resulted in a profile that is characteristic of mature DCs able to

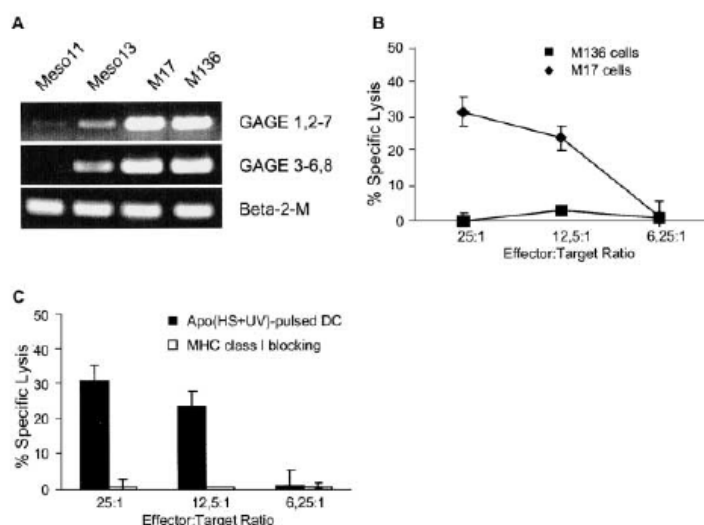


Figure 8. DCs induce melanoma-specific CTLs when pulsed with apoptotic mesothelioma cells expressing HSP70. (A) RT-PCR using primers specific for GAGE-1, -2, and -7 and for GAGE-3-6 and -8 was performed to analyze the RNA expression of GAGE genes in Meso11 and Meso13 mesothelioma cell lines as well as in HLA-A2⁺ M17 and HLA-A2⁺ M136 melanoma cell lines (as positive controls). β_2 -Microglobulin (β_2 -m)-specific primers were used as controls. (B) CTL activity toward HLA-A2⁺ M17 and HLA-A2⁺ M136 melanoma cells incubated with enriched CD8⁺ T cells generated from coculture with DCs loaded with mesothelioma apo(HS+UV). *Significant differences in comparison with unpulsed DC-sensitized T cells (Student *t* test, *p* < 0.01). (C) Killing of HLA-A2⁺ M17 melanoma cells by cross-primed CTL lines was reduced when target cells were incubated with MHC Class I-blocking antibody W6/32. Results are representative of two experiments, and each value represents the mean of triplicate wells.

trigger an efficient immune response. It is thus highly unlikely that the failure of apo(UV)-loaded DCs to efficiently cross-prime tumor-specific CTLs may be attributed only to the selective and weak defect of such DCs in upregulating CD83 molecules.

Besides, both apo(UV)- and apo(HS+UV)-loaded DCs did not fail to produce significant amounts of IL-12 in response to combination treatment with TNF- α plus poly(I:C). On the basis of findings reporting that DCs progressively lose their responsiveness to autocrine IL-10 during the maturation process (49), we further reason that increased IL-10 production may not contribute to convert apoptotic cell-pulsed DCs from immunostimulatory to tolerogenic cells. Altogether, these results strongly suggest that the mechanisms by which HSP70 targets apoptotic cell-pulsed DCs to efficiently cross-prime tumor-specific T cells did not occur through an improved responsiveness of DCs to exogenous maturation stimuli. Otherwise, it is also conceivable that HSP70 targets MPM-derived antigens to LOX-1, which is a scavenger receptor also involved in the trafficking of antigens toward the MHC Class I pathway (50).

The use of apoptotic tumor cells, as an antigen-delivery approach, has already been successfully addressed in various cancer models including melanoma (51), leukemia (31), as well as colorectal and prostate cancers (30, 52). Here, our *in vitro* investigations therefore confirm the suitability of such a source of TAAs and further extend its applicability to MPM, the management of which continues to defy curative options. We reason that the apparent unrestricted effectiveness of apoptotic cells in generating antitumor activity is likely to occur through the supply of multiple antigens leading to DC cell surface expression of varied MHC Class I-peptide complexes. Hence, such a diversity of antigen presentation implies the stimulation of a wide range of tumor-specific CTLs, which may therefore significantly improve immune efficacy and prevent possible epitope escape mutation. Indeed, it now seems clear that a single antigen will not suffice for efficient clearance of tumors consisting of polyclonal cells with a range of antigens expressed or lost.

Another interesting finding of our experiments was the detection of the *GAGE* gene family in the Meso13 mesothelioma cell line, which was used for immunization. From our data, we note that the *GAGE* transcripts were the most frequently expressed cancer testis antigens among human MPM specimens, as compared with *MAGE* and *SSX* genes (Sapede and colleagues, unpublished data). Hence, mRNAs for *GAGE-1*, -2, and -7 and for *GAGE-3-6* and -8 were easily detected by RT-PCR in mesothelioma cells without requiring any DNA-demethylating treatments known to upregulate cancer testis antigen gene expression, as previously reported (26, 53).

On the other hand, these results are thought to be fully consistent with the fact that DCs loaded with apo(HS+UV) Meso13 cells could also elicit an MHC Class I-restricted cytotoxic T cell response against M17 melanoma cells. Indeed, such HLA-A2-restricted reactivity may conceivably be explained by the shared expression of *GAGE* genes from both mesothelioma and melanoma cells. We further suggest that such a result may not only be attributed to the use of this particular Meso13 cell line, as *GAGE* gene expression is homogeneously expressed among various mesothelioma cell lines. It is noteworthy that the specific killing capacity of the CTL lines against any *GAGE* antigenic epitopes could not be verified because of the lack of well defined HLA-A2-restricted peptides. Up to now, only two antigenic peptides, YRPRRRY (54) and YYWPRRRY (55), which are encoded by the *GAGE* gene family, are known to be recognized by CTLs when presented on Class I molecules HLA-Cw6 and HLA-A29, respectively. Hence, determining the accurate frequency of *GAGE*-specific CD8⁺ T cells generated with such a priming strategy may not be considered using either peptide-loaded T2 target cells or

HLA Class I tetramers. The search for known tumor antigens whose peptides have already been identified as CTL epitopes among MPM cell lines is currently under way.

As previously argued, the key application of these findings is in the prospect of vaccinating patients with MPM using new immunotherapeutic approaches (56). In addition, the study of the applicability of this method under autologous conditions, which remains the ultimate question, is currently under way in our laboratory. In this article, we have established an *in vitro* model for MPM vaccination using DCs loaded with allogeneic apoptotic mesothelioma cells. The fact that only DCs pulsed with apoptotic HSP70-expressing cells displayed a substantial capacity to stimulate autologous antitumor T cell responses emphasizes the importance of heat shocking the tumor cells before apoptosis induction in immunotherapy protocols based on DCs. Our data might therefore be relevant regarding future clinical trials of active immunotherapy involving DCs in patients with MPM.

Conflict of Interest Statement: F.E. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; C.S. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; P.-J.R. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; M.M. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; C.L.-P. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; I.B. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; L.C. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; G.D. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript; M.G. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

Acknowledgment: The authors are grateful to Romain Oger for excellent help in RNA isolation and RT-PCR experiments.

References

- Wagner JC, Sleggs SA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western cape province. *Br J Ind Med* 1960;17:260-271.
- Selkoff IJ, Churg J, Hammond EC. Relation between exposure to asbestos and mesothelioma. *N Engl J Med* 1965;272:560-565.
- Churg J, Rosen SH, Moolten S. Histological characteristics of mesothelioma associated with asbestos. *Ann N Y Acad Sci* 1965;132:614-622.
- Ruffie P. Pleural mesothelioma. *Curr Opin Oncol* 1992;4:334-341.
- Hillerdal G. Malignant mesothelioma 1982: review of 4710 published cases. *Br J Dis Chest* 1983;77:321-343.
- Rubins JB, Greatens T, Kratzke RA, Tan AT, Polunovsky VA, Bitterman P. Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1616-1622.
- Nasreen N, Mohammed KA, Dowling PA, Ward MJ, Galffy G, Antony VB. Talc induces apoptosis in human malignant mesothelioma cells in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:595-600.
- Ruffie P, Feld R, Minkin S, Cormier Y, Boutan-Laroze A, Ginsberg R, Ayoub J, Shepherd FA, Evans WK, Figueredo A, et al. Diffuse malignant mesothelioma of the pleura in Ontario and Quebec: a retrospective study of 332 patients. *J Clin Oncol* 1989;7:1157-1168.
- Herndon JE, Green MR, Chahinian AP, Corson JM, Suzuki Y, Vogelzang NJ. Factors predictive of survival among 337 patients with mesothelioma treated between 1984 and 1994 by the Cancer and Leukemia Group B. *Chest* 1998;113:723-731.
- Curran D, Sahnoud T, Therasse P, van Meerbeeck J, Postmus PE, Giaccone G. Prognostic factors in patients with pleural mesothelioma: the European Organization for Research and Treatment of Cancer experience. *J Clin Oncol* 1998;16:145-152.
- Boutin C, Schlessner M, Frenay C, Astoul P. Malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 1998;12:972-981.
- Castagneto B, Zai S, Mutti L, Lazzaro A, Ridolfi R, Piccolini E, Arduini A, Fumagalli L, Valsuani G, Botta M. Palliative and therapeutic activity of IL-2 immunotherapy in unresectable malignant pleural mesothelioma with pleural effusion: results of a Phase II study on 31 consecutive patients. *Lung Cancer* 2001;31:303-310.

13. Astoul P, Viallat JR, Laurent JC, Brandely M, Boutin C. Intraleural recombinant IL-2 in passive immunotherapy for malignant pleural effusion. *Chest* 1993;103:209-213.
14. Boutin C, Rey F. Thoracoscopy in pleural malignant mesothelioma: a prospective study of 188 consecutive patients. 1: Diagnosis. *Cancer* 1993;72:389-393.
15. Caminschi I, Venetsanakos E, Leong CC, Garlepp MJ, Scott B, Robinson BW. Interleukin-12 induces an effective antitumor response in malignant mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:738-746.
16. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994;12:337-365.
17. Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 2001;106:271-274.
18. Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000;18:245-273.
19. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.
20. Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* 1999;60:562-567.
21. Nestle FO, Aljaghi S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-332.
22. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, et al. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34⁺ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001;61:6451-6458.
23. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, et al. Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999;190:1669-1678.
24. Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 2003;63:2127-2133.
25. Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH Jr, Thurnher M. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3369-3376.
26. Sigalotti L, Coral S, Altomonte M, Natali L, Gaudino G, Cacciotti P, Libener R, Colizzi F, Vianale G, Martini F, et al. Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications. *Br J Cancer* 2002;86:979-982.
27. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce Class I-restricted CTLs. *Nature* 1998;392:86-89.
28. Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D, et al. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex Class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 1998;188:2163-2173.
29. Henry F, Boisteau O, Bretaudeau L, Lieubeau B, Meflah K, Gregoire M. Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines. *Cancer Res* 1999;59:3329-3332.
30. Masse D, Voisine C, Henry F, Cordel S, Barbieux I, Josien R, Meflah K, Gregoire M, Lieubeau B. Increased vaccination efficiency with apoptotic cells by silica-induced, dendritic-like cells. *Cancer Res* 2002;62:1050-1056.
31. Spisek R, Chevallier P, Morineau N, Milpied N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Meflah K, Gregoire M. Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. *Cancer Res* 2002;62:2861-2868.
32. Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* 2002;168:1627-1635.
33. Urban BC, Willcox N, Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8750-8755.
34. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000;191:411-416.
35. Feng H, Zeng Y, Whitesell L, Katsanis E. Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. *Blood* 2001;97:3505-3512.
36. Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* 2000;30:2211-2215.
37. Flohe SB, Bruggemann J, Lendemann S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohe S, Kolb H. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol* 2003;170:2340-2348.
38. Kuppner MC, Gastpar R, Gelwer S, Nossner E, Ochmann O, Scharner A, Issels RD. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol* 2001;31:1602-1609.
39. Srivastava PK, Udono H, Blachere NE, Li Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 1994;39:93-98.
40. Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:417-427.
41. Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, Sherman MY. Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett* 1998;438:1-4.
42. Feng H, Zeng Y, Graner MW, Katsanis E. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood* 2002;100:4108-4115.
43. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10614-10619.
44. Michils A, Dutry D, de Beyl VZ, Rummelink M, de Maertelaer V, Rocmans P. Peripheral blood mononuclear cell proliferation to heat shock protein-70 derived from autologous lung carcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:749-753.
45. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001;14:303-313.
46. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002;277:15028-15034.
47. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002;277:15107-15112.
48. Palliser D, Huang Q, Hachohen N, Lamontagne SP, Guillen E, Young RA, Eisen HN. A role for toll-like receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8⁺ T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein. *J Immunol* 2004;172:2885-2893.
49. Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 2001;166:4312-4318.
50. Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J, Haeuw J, Aubry J, Nakamura K, Kawakami-Honda N, Goetsch L, Sawamura T, Bonnefoy J, et al. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 2002;17:353-362.
51. Jenne L, Arrighi JF, Jonuleit H, Saurat JH, Hauser C. Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8⁺ T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Res* 2000;60:4446-4452.
52. Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S, Galambos SP, Dauer M, Robe J, Endres S, Eigler A. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and $\gamma\delta$ T cells. *Cancer Res* 2002;62:2347-2352.
53. dos Santos NR, Torensma R, de Vries TJ, Schreurs MW, de Bruijn DR, Kater-Baats E, Ruiter DJ, Adema GJ, van Muijen GN, van Kessel AG. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res* 2000;60:1654-1662.
54. Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995;182:689-698.
55. De Backer O, Arden KC, Boretto M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, et al. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* 1999;59:3157-3165.
56. Gregoire M, Ligeza-Poisson C, Juge-Morineau N, Spisek R. Anti-cancer therapy using dendritic cells and apoptotic tumour cells: pre-clinical data in human mesothelioma and acute myeloid leukaemia. *Vaccine* 2003;21:791-794.

II. 2. Immunogénicité de DC ayant phagocyté des cellules tumorales apoptotiques préalablement infectées par le virus de la rougeole (MV).

Article soumis à Cancer Research: *Measles virus induces Oncolysis of Mesothelioma Cells and allows DC to Cross-Prime tumor specific CD8 Response.* Gauvrit Anne, Brandler Samantha, Sapede-Peroz Carole, Boisgerault Nicolas, Tangy Frédéric and Grégoire Marc.

OBJECTIFS ET RÉSULTATS PRINCIPAUX :

L'activation des cellules tumorales est un facteur primordial à considérer pour induire une réponse immunitaire efficace au cours d'une stratégie d'immunothérapie telle que nous l'envisageons. Au cours de ce travail, nous avons étudié l'impact d'un signal de type « infection » des cellules apoptotiques sur les DC. Les DC ayant phagocyté les cellules tumorales infectées par le MV sont entrées dans un processus de maturation spontanée (mis en évidence par analyses du phénotype et de la production de cytokines). De plus, la stimulation de lymphocytes T avec ces cellules a induit la prolifération d'une population de lymphocytes T CD8 spécifiques d'un antigène associé au mésothéliome, la MSLN. Ces résultats démontrent que les cellules de mésothéliome, lorsqu'elles sont infectées par le MV, représentent une source d'AAT intéressante capable d'induire une activation efficace des DC. Les mécanismes impliqués dans l'immunogénicité des cellules tumorales infectées n'ont pas été formellement démontrés mais seulement expérimentalement corrélés. Au cours de notre étude, nous avons montré que l'infection virale conduit à la production d'un certain nombre de signaux de danger par les cellules tumorales infectées (HSP70 et ARN viral). Comme précédemment démontré, l'HSP70 n'est sans doute pas impliquée dans le processus de maturation spontanée que nous avons observé (Ebstein *et al.*, 2004). En revanche, d'autres signaux liés à la réplication virale pourraient intervenir dans l'activation des DC (Medzhitov, 2007). En effet, nous avons mis en évidence le fait que les DC ayant phagocyté des cellules tumorales infectées par le MV produisaient d'importantes quantités d'IFN de type I. La production de ce type de cytokines suggère qu'elles ont détecté la présence d'une infection. Les DC peuvent être alertées de plusieurs manières de la présence d'un agent viral : via des récepteurs aux IFN de type I (les cellules infectées produisent naturellement des IFN de type I), des récepteurs cytoplasmiques comme RIG-I ou MDA-5, ou encore des TLR localisés dans les endosomes (TLR-3, -7/8, -9)(Akira *et al.*, 2006; Kawai &

Akira, 2006; Pichlmair & Reis e Sousa, 2007). Après infection des cellules de mésothéliome, il est possible que les IFN produits par les cellules infectées aient activé les DC. Les IFN de type I ont un impact particulièrement important sur les DC : induction de l'expression de molécules du CMH-I, -II, CD40, CD80, CD83 et CD86, acquisition de capacités de CP des antigènes, et production d'IFN de type I (Le Bon & Tough, 2008). Il est possible aussi que la reconnaissance ait eu lieu via les TLR, qui, de part leur localisation dans les endosomes, permettent la détection d'agents infectieux phagocytés par les DC. Les TLR, et en particulier TLR-3, ont été décrits comme de puissants activateurs des DC et induisent eux aussi l'acquisition de phénotypes matures et la capacité à produire des IFN de type I (Pichlmair & Reis e Sousa, 2007; Schulz *et al.*, 2005). L'implication des récepteurs du type RIG-I et MDA-5 semble moins probable car ils sont localisés dans le cytoplasme et permettraient plutôt la détection d'une infection directe des DC (Akira *et al.*, 2006; Kawai & Akira, 2006; Pichlmair & Reis e Sousa, 2007). De plus, aucune maturation des DC suite à une infection directe avec la souche vaccinale Schwarz n'a été observée (observations personnelles) (Schneider-Schaulies *et al.*, 2003; Schnorr *et al.*, 1997). Nous n'avons cependant pas pu caractériser les mécanismes précis mis en jeu dans notre système expérimental.

De plus, cette étude indique que le MPM pourrait être un candidat potentiel pour une autre approche thérapeutique (Parato *et al.*, 2005) : la virothérapie. Certains virus oncolytiques, dont l'HSV et des adenovirus, ont déjà été testés dans le cadre du mésothéliome (Adusumilli *et al.*, 2006; Adusumilli *et al.*, 2007; Sterman *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2006). Ce travail, réalisé *in vitro*, est basé sur l'infection des cellules de MPM par une souche vaccinale du MV (vaccin Schwarz). Notre étude démontre que les cellules du MPM sont des cibles privilégiées du MV. L'infection préférentielle des cellules tumorales par rapport aux cellules mésothéliales pourrait s'expliquer en partie par la surexpression de la molécule CD46 (Anderson *et al.*, 2004), l'un des principaux récepteurs identifiés pour les souches vaccinales du MV. De façon intéressante, l'infection des cellules de MPM conduit à une lyse rapide et importante des cultures cellulaires (effet cytopathique majeur observé 72h après infection). Les cellules de mésothéliome se sont effectivement révélées être plus sensibles à l'infection virale que les cellules mésothéliales saines, non seulement en terme de rendement d'infection mais surtout d'effet cytopathique. Ces résultats préliminaires obtenus sur des cultures *in vitro* sont encourageants et soulignent la nécessité de tester l'efficacité de ce type de vaccin *in vivo* sur des modèles expérimentaux.

Measles virus induces Oncolysis of Mesothelioma Cells and allows DC to Cross-Prime tumor-specific CD8 Response

Anne Gauvrit (1), Samantha Brandler (2), Carole Sapède-Peroz (1), Nicolas Boisgerault (1), Frédéric Tangy (2) and Marc Gregoire (1).

(1) INSERM, U601, Cancerology Research Department, Nantes, France.

(2) Institut Pasteur, CNRS-URA 3015, Laboratory of Viral Genomics and Vaccination, Paris, France.

Running Title: Measles-mediated Virotherapy for Mesothelioma Cancer.

Key words: Mesothelioma, Measles, Oncovirotherapy, Tumoral immunity, Dendritic Cells, Cross-priming, Mesothelin.

ABSTRACT

Despite conventional medical and surgical treatments, malignant pleural mesothelioma (MPM) remains incurable. Oncovirotherapy, namely the use of replication-competent virus for cancer treatment, is currently explored in clinical trials. In this study, we investigated the anti-neoplastic potential of a new oncolytic viral agent, a live-attenuated measles virus (MV) strain derived from the Edmonston vaccine lineage (Schwarz strain). We evaluated both oncolytic activity and immuno-adjuvant properties of the MV vaccine strain on mesothelioma tumor cells. Infectivity, syncytium formation, and cytolytic activity of MV were studied on a panel of mesothelioma cells derived from pleural effusions of MPM patients. We observed that MV infected preferentially MPM cell lines in comparison with non-transformed mesothelial cells, leading to an efficient killing of a significant fraction of tumor cells. A cytoreductive activity was also evidenced through formation of multinuclear cellular aggregates (syncytia). The susceptibility of MPM cell lines to measles infection was assessed by the analysis of cell surface expression of the MV vaccine receptor (CD46). We also evaluated whether MV infection of mesothelioma cells could elicit an autologous anti-tumor immune response. We demonstrated that MV Schwarz strain induced apoptotic cell death of infected mesothelioma cells, which were efficiently phagocytosed by dendritic cells (DCs). Loading of DCs with MV-infected MPM cells induced DC spontaneous maturation, as evidenced by the increased expression of MHC and co-stimulatory molecules along with the production of pro-inflammatory cytokines. Priming of autologous T-cells by DCs loaded with MV-infected MPM cells led to a significant proliferation of tumor-specific CD8 T-cells. Altogether, these data strongly support the potential of oncolytic MV as an efficient therapeutic agent for mesothelioma cancer.

INTRODUCTION

Malignant Mesotheliomas (MM) are highly aggressive neoplasms that arise from the uncontrolled proliferation of mesothelial cells lining serosal cavities, most commonly the pleura (Malignant Pleural Mesothelioma or MPM) (1). Exposure to asbestos is the main factor involved in MPM pathogenesis. In the absence of overt symptoms during the early period of tumor development, diagnosis is usually established late in disease evolution, which makes the prognosis for patients very poor (median survival of less than one year). MPM is also considered to be a cancer that is relatively refractory to all conventional treatment modalities, such as chemotherapy, radiotherapy and/or surgery (2). Thus, in the absence of an efficient management strategy for this cancer, there is a pressing need for the development of new clinical approaches.

During the past decade, there has been an increasing interest in oncovirotherapy, namely the use of replicating viruses for cancer treatment. Numerous live-attenuated viruses, such as Adenovirus (AdV), Vesicular stomatitis virus (VSV), Herpes simplex virus (HSV), Newcastle disease virus (NDV), Vaccinia viruses (VV) and Measles virus (MV) are now considered as potential cancer therapeutics (3, 4). Among them, MV has already demonstrated promising oncolytic properties (5). MV is an enveloped, non-segmented and negative single-strand RNA virus belonging to the Morbillivirus genus of the Paramyxoviridae family (6). Live-attenuated MV vaccines, such as the Schwarz strain, were derived from a clinical isolate by extensive passages through culture of chicken embryo fibroblasts (7). This vaccine has been administered to hundreds of millions of children since the 1970s, and is considered as one of the most effective and safe human vaccines. Furthermore, the MV genome is very stable and the reversion of vaccine strains to pathogenic forms has never been observed.

Apart from its excellent safety profile, Edmonston-derived MV vaccine strains efficiently kill a clinically significant fraction of tumoral cells by direct cytolysis, leaving neighbouring healthy tissue unharmed (8). Indeed, several *in vitro* studies have already demonstrated that live-attenuated MV is selectively oncolytic, causing the formation of extensive multinucleated syncytia and killing a variety of human tumor cells, such as lymphoma (9), multiple myeloma (10), glioblastoma (11), and ovarian carcinoma (12) cell lines. Moreover, *in vivo* administration of the MV Edmonston strain resulted in either slower growth or even partial regression of tumors

established in experimental models of lymphoma and myeloma cancers (9, 10). Another important component of the long-term therapeutic benefit of oncolytic viruses seems to rely on their capacity to trigger an autologous anti-tumoral immune response, as previously described for another paramyxovirus VSV (13, 14). Hence, both mechanisms could be implicated in spontaneous clinical remission previously observed in cancer patients naturally infected with measles virus (15-17). However, relatively little attention has been paid so far to the role of MV-based virotherapy in the activation of anti-tumoral immunity (18).

In the present study, we investigated both the oncolytic activity and immuno-adjuvant properties of Schwarz measles vaccine on a panel of MPM cells isolated from pleural effusions of mesothelioma patients. We used a cloned Schwarz MV produced from an infectious cDNA that we have previously described (19, 20). We analyzed infection susceptibility and cytolytic activity on both tumoral and non-transformed mesothelial cells. We observed that MPM tumor cells are more susceptible than non-transformed mesothelial cells to MV infection. The increased susceptibility of MPM cells to MV infection was assessed by the analysis of cell surface expression of the MV vaccine receptor (CD46). We also evaluated whether MV infection of mesothelioma cells could elicit an autologous immune response specific for a tumor-associated antigen, namely mesothelin (MSLN). MSLN is a differentiation antigen that is abundantly expressed in normal mesothelial cells, from which malignant mesothelioma arises. Among MPM-associated antigens, MSLN appears as a promising target for immunotherapy (21). To determine whether MV could induce cellular immunity to MSLN, we co-cultivated human primary monocyte-derived DCs with MV-infected mesothelioma cells and analyzed the phagocytic properties of DCs, their activation surface phenotype and cytokines secretion profile, as well as their functional capacity to stimulate MSLN-specific CD8 T-cells. We demonstrated that phagocytosis of apoptotic MV-infected mesothelioma cells induced spontaneous DC maturation and activation, as evidenced by an increased expression of MHC and co-stimulatory molecules, the production of pro-inflammatory cytokines with Th1 polarizing capacities, and a significant amplification of MSLN-specific CD8 T-cells.

MATERIAL and METHODS

Cell Culture. Mesothelioma cell lines (M11, M13, M31, M47, M56, M61) were established from pleural effusions collected by thoracocentesis of cancer patients, after obtaining informed consent. The control mesothelial cell line (Met5A) was purchased from ATCC (LGC Promochem, Molsheim, France). Cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Foetal Calf Serum from Biowest, Nuaille, France), 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin antibiotics (all from Sigma, St Quentin Fallavier, France). Cell cultures were routinely checked for *Mycoplasma* contamination using Hoechst 33258 staining (Sigma).

MV production. Attenuated Schwarz MV was produced from the pTM-MVSchw plasmid using the helper-cell-based rescue system described by Radecke et al. (22) and modified by Parks et al. (20). Recombinant MV-eGFP virus was similarly rescued from the pTM-MV-eGFP plasmid, as previously described (19). Syncytia that appeared after co-culture of helper cells with Vero cells were expanded on Vero cells in DMEM 5% FCS. When syncytia reached 80-90% confluence, the cells were scraped into a small volume of OptiMEM (Invitrogen) and freeze-thawed once. After low-speed centrifugation to pellet cellular debris, the virus-containing supernatant was stored at -80°C. Viral titer was determined by an endpoint limit-dilution assay on Vero cells. The TCID₅₀ was calculated by the use of the Kärber method.

Apoptosis Detection. Apoptosis was triggered by UV-B exposure (312nm-25kJ/m²) using an UV Stratalinker 2400 (Stratagene Europe, Amsterdam, Netherlands), or by virus infection (MOI=1.0) with MV Schwarz strain. Cell death was evidenced by 15 min staining at room temperature using FITC-conjugated Ann-V labeling kit (5µl per 10⁵ cells), according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

RT-PCR. Confluent M13 cells were infected with MV Schwarz strain (MOI=1.0), and cell pellets collected at different times post-infection. Total cell RNA was extracted using RNeasy kits (Qiagen, Courtaboeuf, France), and reverse-transcribed using M-MLV RTase (Invitrogen, Paisley, UK). Resulting cDNA were used as template for PCR amplification with primers specific for TLR-3, Mda-5, RIG-I, and PKR (Sigma). Gene-specific primers sets for b-Actin were used as internal control of RT-PCR experiments.

Intracellular HSP Immunostaining. M13 tumoral cells were stressed by heat shock (1 hour at 42°C) or virus infection (2 hours at 37°C, MOI=1.0) and stained as follows. Briefly, cells were first suspended in 100ml of 4% PFA fixation solution for 15min at RT, then incubated with 100ml of 1/100 diluted anti-HSP70 (clone SPA810) or anti-Gp96 (clone SPA850) Abs (Stressgen, Victoria, Canada) in PBS-0.1%BSA-0.1%Saponin for 30min at 4°C, and finally with 100ml of 1/250 diluted AlexaFluor488-conjugated F(ab')₂ fragment goat anti-mouse IgG (H+L) Abs (Molecular Probes, Montluçon, France) for an additional 30min at 4°C.

Monocyte-derived DC production. Monocytes were generated from leukapheresis harvests of healthy donors (EFS, Nantes, France), after obtaining informed consent. The monocyte-enriched fraction (>85% purity) was isolated by incubation with RosetteSepTM human monocyte enrichment cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), following the manufacturer's instructions, and then separated by Ficoll density gradient centrifugation (PAA Laboratories, Les Mureaux, France). For DC preparation, 2.10⁶ monocytes/ml were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 70ng/ml of GM-CSF and 50ng/ml of IL-4 (AbCysSA, Paris, France).

DC loading and Phagocytosis analysis. On day 5, immature DCs were collected from the monocyte culture supernatant and seeded into poly-HEMA-coated 12-well plates at 2.10⁶cells/ml. Because the harvest of both tumor cells and peripheral blood mononuclear cells from the same MPM patient proved to be difficult, an HLA-A2- allogeneic mesothelioma cell line (M13) was used for loading monocyte-derived DCs obtained from HLA-A2+ healthy donors. For subsequent loading, DCs were incubated with 1.10⁶ cells/ml of apoptotic material obtained from UV-irradiated or MV-infected M13 tumoral cells (ratio 2:1). DC phagocytosis was assessed both by flow cytometry and confocal laser microscopy, as previously described (23). Briefly, UV- or MV- treated M13 cells were labeled with PKH-26 membrane dye colorant, according to manufacturer's protocol (Sigma). After 24 hours co-culture, DCs were stained with FITC-conjugated anti HLA-DR Abs (Immunotech, Marseilles, France). After PBS washes, cells were harvested and analyzed either on a FACSCalibur (BD Biosciences, Grenoble, France), or with a TCS NT microscope (Leica Instruments, Heidelberg, Germany). DCs that had ingested apoptotic cells were identified as HLA-DR⁺/PKH-26⁺ double stained cells.

DC phenotype. DCs were co-cultured with apoptotic UV-treated or MV-infected M13 cells for 18 hours and the surface expression of DC maturation markers was next analyzed by three-color

flow cytometry. Immunostaining was performed with a panel of monoclonal antibodies (all purchased from Immunotech, Marseilles, France) specific for HLA-ABC (clone B9.12.1), HLA-DR (clone B8.12.2), CD80 (clone MAB104), CD83 (clone HB15a), CD86 (clone HA5.2B7), and CD40 (clone MAB89). Briefly, DCs were incubated with each of the above antibodies (1µg/ml) at 4°C for 30 min. The cytokines secretion pattern was assayed in supernatants collected 24 hours after co-culture. Il-10, Il-12p70, Il-6, Il-1b and TNFa concentrations were measured using commercially available BD Cytometric Beads Array kits, according to the manufacturer's protocol. The quantification of IFNa was performed with an ELISA test (Biosource, Camarillo, USA).

***In Vitro* T-cell Sensitization.** CD8 T lymphocytes were prepared from HLA-A0201 healthy donor PBMCs by positive selection with the MACS column system using the CD8 multisort kit (Miltenyi Biotec, Paris, France). Purified CD8 T cells (>90% purity) were stimulated with autologous DCs loaded with different apoptotic preparations or unloaded DCs as a control. Co-culture was performed in round bottom 96-well plates (BD Falcon), by mixing 2.10^4 mature DCs with 2.10^5 responder T-cells (ratio 1:10) in 200 µl of 8% HS RPMI-1640 medium, supplemented with 10 ng/ml Il-12 for the first 3 days (AbCysSA, Paris, France) and with 10 U/ml Il-2 (Proleukin, Chiron Therapeutics, USA) for the following days. Il-2 was added every 2-3 days allowing regular culture medium renewal. After 7-8 days of culture, T cells were harvested and stained with MSLN-specific tetramers.

Tetramer immunostaining. Target peptides MSLN531-539 (24) and MSLN541-550 (25) were initially identified by scanning the MSLN amino-acid sequence (NP 005814) for matches to consensus motifs for HLA-A0201 binding, using two computer algorithms BIMAS and SYFPEITHI (Fig5A). MSLN-derived peptides (synthesis performed by Eurogentec, Liege, Belgium) were used for monomer production (Recombinant Proteins Production Platform, U601-IFR26, Nantes, France), as previously described (26). HLA-A2 VLP9 and KLL10 monomers were then oligomerized with PE-labeled streptavidin (BD Biosciences). Staining and washing were performed in 0.1% BSA PBS. T-cells were stained successively with 10µg/ml of PE-labeled pMHC multimers at 4°C for 30min, and with 1µg/ml diluted PE-Cy5-conjugated anti-CD8 antibodies (clone RPA-T8, BD Biosciences) for an additional 30min at 4°C. Cells were washed and immediately analyzed on a FACSCalibur.

RESULTS

Schwarz MV preferentially infects and kills mesothelioma cells.

Although numerous studies have already established the potential efficiency of MV-based virotherapy for several cancers (5), no information has yet been provided about MV oncolytic activity on mesothelioma cancer. To evaluate the susceptibility of mesothelioma to the oncolytic activity of measles virus, we infected a panel of epithelioid (M11, M13, M47, M56 & M61) and one sarcomatoid (M31) MPM cell lines with the MV Schwarz strain (Fig1A). An immortalized mesothelial cell line (Met5A) was used as control. Three days after infection, we observed an important cytopathic effect (CPE) that was markedly increased on most epithelioid MPM infected cells (4/5 lines), as compared to non-transformed Met5A cells (Fig1A). CPE was evidenced through the development of large syncytia, the appearance of inclusion bodies in dead tumoral cells and finally by the complete dissociation of the cell layer 72-96 hours post-infection. We also observed that M31 is readily infected by Schwarz vaccine, but display a significant lower sensibility to MV oncolytic activity than epithelioid MPM cells (*data not shown*).

To compare MV infection sensitivity, we infected a representative epithelioid MPM cell line (M13), which belong to the major mesothelioma phenotype, and an established mesothelial cell line (Met5A) with a recombinant Schwarz MV expressing eGFP (MOI=1.0). The yield of infection was quantified by flow cytometry (Fig1B, C). The infection yield was dose-dependent for both cell lines (MOI ranging from 0.01 to 5.0, *data not shown*). Tumor cells were significantly more susceptible to measles infection than normal cells were, both in individual culture (Fig1B) and in co-culture (Fig1C) systems. Indeed, two days after infection, the number of infected tumoral M13 cells was repeatedly two-fold higher than that of non-transformed Met5A cells (Fig1B, C). The development of multinuclear cell aggregates (syncytia) is characteristic of measles virus infection, and indicates an efficient cell-to-cell spread of MV. Syncytia formation results from fusion of infected cells with non-infected neighboring cells through interactions between the glycoproteins (hemagglutinin-H and fusion-F) from viral envelope and the cellular receptor of MV vaccine strains (CD46). We thus compared the level of CD46 expression among the different cell lines tested. As it has already been reported for several cancers (27), we found that a majority of mesothelioma tumor cells expressed a significant higher level of CD46 than non-transformed Met5A cells (Fig1D). Interestingly, we also observed that the susceptibility of MPM cells to MV could be related to their CD46 expression level.

Indeed, M56 and M31 cell lines that expressed the lowest CD46 level, were less sensitive both to MV infection (Fig1D) and cytolytic activity, (Fig1A). Altogether these results demonstrate that MPM tumor cells are more susceptible than non-transformed mesothelial cells to measles virus, suggesting that MV-based virotherapy could be a reliable therapeutic approach for mesothelioma cancer.

MV infection triggers danger signals in mesothelioma cells.

Intracellular dsRNA production is a major sign of replication for many RNA viruses and a strong viral stimulus for pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like Receptors (TLRs) or RIG-I like Receptors (RLRs) (28). MV infection has been previously shown to induce activation of specific PRR expression in lung epithelial cells (29). To assess the presence of viral nucleic acids in MV-infected MPM cells, we looked for the expression of TLR-3, Mda-5, RIG-I, and PKR genes by RT-PCR (the specific primers used are listed in Fig2A). Attesting to the presence of viral genome replication intermediates, the expression levels of Mda-5, and to a lower extent RIG-I, were increased during the progression of infection in M13 epithelial cells, peaking at 48-72 hours post-infection (Fig2B). This result confirms the implication of Mda-5 (29, 30) and RIG-I (31) in MV-specific innate response. In contrast, we observed a progressive decline of TLR-3 and no change in PKR genes expression (Fig2B). Overall, these data indicate, although indirectly, that dsRNA is readily produced in MV-infected M13 mesothelioma cells.

As viral infection may be related to a cellular stress, we thus explored the expression pattern of intracellular Heat Shock Proteins (HSPs) induced by MV infection. Heat shock (HS) of M13 cells was used as an internal positive control. Intracellular immunostaining was targeted to HSP70 and Gp96, two molecules previously related to a cross-presentation mechanism (32). Flow cytometry results evidenced constitutive cytoplasmic HSP70 (98.9% positive cells, MFI 51.05) and RE-associated Gp96 (85% positive cells, MFI 18.8) expression by M13 tumoral cells (Fig2C). The kinetic study indicates that significant and maximum expression of inducible HSP70 is detected in MV-infected M13 cells at 72 hours post-infection (MFI 194.2). These results are concordant with previous studies performed on HSP70 induction by MV infection (33). In comparison, HS-treated M13 cells expressed HSP70 as early as 8 hours post-treatment (MFI 128.9, *data not shown*). The same experiment was conducted for Gp96, but in contrast to HSP70, no significant variation in Gp96 expression could be observed following MV infection (Fig2C).

MV infection induces mesothelioma cells death.

As demonstrated above, MV Schwarz strain infection caused severe alterations in MPM cells culture, which finally led to cell death (CPE). To discriminate between apoptosis- and necrosis-mediated cell death, we used Annexin-V staining. Our results evidenced that apoptosis was the mode of MV-induced cell death (Fig3A). To follow the kinetic of mesothelioma cell killing, subconfluent monolayer M13 cell cultures were either MV-infected (MOI 1.0) or UV-irradiated (25kJ/m²) and the percentage of Ann-V positive cells were determined at different time points (Fig3B). A significant rate of tumoral cell death (70% to 80% of Ann-V positive-cells) was observed during 24 hours following UV-B irradiation or 72 hours post-infection with MV vaccine. These M13 cell death-induced conditions were thus employed in the following experiments, performed to demonstrate that virotherapy could lead to the activation of an autologous anti-tumor immune response.

Apoptotic MV-infected mesothelioma cells are efficiently uptaken by immature DCs.

We previously described that UV-irradiated apoptotic mesothelioma cells are efficiently phagocytosed by immature DCs (23). Here, we analyzed the uptake yield of MV-infected M13 cells in a similar phagocytosis assay. For that purpose, DCs were incubated with dead M13 cells stained with PKH26 for 24 hours. Interactions of HLA-DR labeled DCs with PKH26 positive-M13 cells were then determined by flow cytometry analysis of double (PKH-26⁺/FITC⁺) positive cells (Fig3C). More than 70% of the immature DCs efficiently engulfed apoptotic MV-treated M13 cells, similar to the phagocytic activity observed for UV- treated M13 cells (Fig3D). The phagocytosis process was confirmed by confocal laser-scanning microcopy experiments that showed an efficient internalization of apoptotic M13 cells by immature DCs within 24 hours co-culture, whatever the death-induced strategy used (*data not shown*).

Apoptotic MV-infected mesothelioma cells induces DC maturation.

Depending on the danger signal produced by dying cells and the PRR expression pattern of the phagocytic cells, the clearance of apoptotic cells can trigger an immune response from tolerance to immunity (34). We thus analyzed the DCs maturation status following engulfment of killed MV-infected (MV-M13) or UV-irradiated (UV-M13) tumoral cells, compared to direct infection by measles virus (MV). Co-culture was performed for 18 hours at 37°C at a ratio of two DCs to one M13 cell (ratio 2:1), and the phenotype of viable DCs was investigated by surface

expression analysis of Class I and II HLA molecules (Fig4A) and co-stimulation molecules CD80, CD86, CD83 and CD40 (Fig4B). We also analyzed the pattern of cytokine secretion in co-culture supernatants (Fig4C). Unloaded DCs (mock), otherwise treated similarly, were used as a negative control. As a maturation positive control, DCs were incubated with a synthetic analogue of viral dsRNA, Poly I:C (Poly(inosinic-cytidylic) acid), in association with a major cytokine produced in response to viral infection IFN α (I:C/IFN α).

Only DCs loaded with MV-infected apoptotic M13 cells expressed a significant maturation profile, at a level almost equivalent to that observed for DCs treated with the maturation cocktail I:C/IFN α (Fig4A, B). In contrast, DCs pulsed with UV-irradiated apoptotic M13 cells display a similar activation profile to immature DCs (Fig4A, B), as we previously described (23). Spontaneous maturation of DCs co-incubated with MV-infected apoptotic mesothelioma cells was evidenced by a significant up-regulated surface expression of the major maturation markers ($p < 0.05$, for CD80, CD83, CD86, CD40 and HLA-DR) (Fig4A, B), associated with a relevant production of numerous pro-inflammatory cytokines ($p < 0.05$, for Il-6, IFN α , TNF α , and Il-1b) (Fig4C). However, we noticed a slightly, but not significant, Il-12p70 secretion combined with no Il-10 production (Fig4C). Therefore these results are rather in favor of the production of an inflammatory environment with Th1 polarizing capacities. The same spontaneous maturation was demonstrated for DCs co-cultured with several others apoptotic MV-infected MPM cells (as M11 and M61, *data not shown*), thus strengthening the significant increased immunogenicity of measles-infected tumor cells.

We observed that the infection (Fig5A) and replication (Fig5B) properties of the MV Schwarz strain in monocyte-derived DCs were greatly limited, as compared to those observed in mesothelioma M13 cells. This may be partly related to their respective CD46 expression level (Fig5C). We also observed a significant increase in virus amplification in DCs co-cultured with MV-infected M13 tumor cells as compared to DCs infected with MV (Fig5B). In addition, we did not evidence any modification of DC maturation status within 24h following direct infection with the Schwarz vaccine (Fig4A, B). Therefore, the evolution of the DC phenotype observed early after 24h of co-culture with MV-infected mesothelioma cells might have been rather induced by the phagocytosis of infected MPM cells, than by a direct infection of the DCs. However, we can not exclude the possibility of a direct infection of a fraction of the DCs present in the co-culture, depending on their activation status.

DCs loaded with MV-infected M13 cells cross-prime MSLN-specific CD8 T-cells.

Our data strongly support an increased immunogenicity of MV-infected M13 tumoral cells, allowing spontaneous maturation of DCs. Consequently, DCs produce a cocktail of pro-inflammatory cytokines with related activities on the CD8 T-cell response. Therefore, we tested whether these different DC preparations differ in their abilities to stimulate CD8 T-cells specific for MPM-associated tumor antigen, such as Mesothelin (MSLN). To assess this question, tetramers immunostaining specific for two previously described MSLN-derived CD8 epitopes, namely MSLN531-539 (for HLA-A2 VLP9) and MSLN541-550 (for HLA-A2 KLL10), were performed (Fig5A). Purified CD8 T-lymphocytes were sensitized for one-week with autologous DCs unloaded or loaded with apoptotic material (UV-M13 or MV-M13 cells), but without any additional maturation agents.

Among the CD8-positive gated population, we observed a significant proliferation of MSLN-specific T-cells (0.63% for HLA-A2 VLP9 and 0.76% for HLA-A2 KLL10) only in the co-culture of DCs loaded with apoptotic MV-infected mesothelioma M13 cells (Fig5B). These tetramer positive-staining values are of real interest in comparison with a low frequency of precursors specific for a self-tumor antigen such as MSLN (<0.1%, *data not shown*). Further, the possibility of a cross-reaction with epitopes processed from viral antigens may be ruled out, as T-cells stimulated by DCs infected with MV Schwarz strain did not lead to a positive signal of tetramers immunostaining (*data not shown*). However, the functional activity of tumor-specific CD8 T-lymphocytes still remains to be determined to confirm their effective implication in virotherapy-mediated cancer regression. Finally, our results also suggest that phagocytosed MV-infected apoptotic M13 cells are a possible source of tumor-associated antigens (TAA) for a potent cross-priming of specific CD8 T-cells. We also confirm a cross-presentable status for MSLN antigen (24), giving additional argues for its use in immunotherapy protocols (21). Altogether our results demonstrate that measles virotherapy is able to elicit an autologous anti-tumor immune response, thus strengthening the immuno-adjuvant properties of the oncolytic viruses.

DISCUSSION

Pleural Mesothelioma is an aggressive tumor rarely suitable for radical surgical resection, and highly resistant to current therapeutic approaches such as chemotherapy and radiotherapy (1, 2). An alternative therapeutic option could be the use of viruses as anticancer agents. Indeed, during the past decade, there has been an increasing interest in oncovirotherapy, i.e. the use of replicating viruses for cancer treatment (3). Some intrinsic features of pleural mesothelioma make it a suitable candidate for virotherapy, such as its accessibility and its localized nature, associated with a relative lack of distant metastasis. MPM tumors spread early and aggressively in the serosal cavity, but rarely metastasize at distant sites through lymphatic or systemic circulation (1). Moreover, the pleural cavity is a confined compartment that could allow an efficient interaction between cancer cells and a viral therapeutic agent, and therefore constitutes an ideal target for the local administration of high virus concentrations (35, 36). This intra-pleural administration pathway could also be a solution to limit virus inactivation by circulating MV neutralizing antibodies (4). Indeed, the feasibility of a virotherapy approach for this cancer has already been demonstrated by the successful use of other oncolytic viruses, such as HSV (36) and Adenovirus (35) strains. Thus, oncovirotherapy might be an interesting opportunity for an efficient improvement in mesothelioma cancer treatment.

Although numerous studies have already established the potential efficiency of MV-based virotherapy for several cancers (3, 4), there is still no available information on the anti-neoplastic activity of the MV vaccine on mesothelioma cancer. Our study demonstrated that MV Schwarz strain efficiently kills a significant fraction of tumoral cells, as we observed an important CPE on most MPM cell lines at 72-96 hours post-infection. The susceptibility of MPM cells to measles infection could be related to the natural tropism of MV for epithelial cells of the upper respiratory tract (6). As 70 to 80% of MPM cases belong to the epithelioid subtype (1), measles virotherapy could be particularly relevant in the treatment of this cancer. Moreover, we observed that MV Schwarz vaccine exerts a potent lytic activity on tumoral MPM cells, but only minimal cytopathic damage to non-transformed Met5A cells. As well, the large multinucleated syncytia and cytotoxic killing observed in the tumoral cell cultures infected with the live-attenuated Edmonston MV strain were never seen in normal mesothelial cell primary cultures, established from peritoneal dialysis of cancer-free patients (12). As tissue culture-adapted strains of MV display attenuated pathogenicity for healthy tissue and are simultaneously more lytic against

tumoral tissue, some question arises concerning the potential mechanism(s) involved in this selective activity (8). Although MV wild-type strains preferentially use the signaling lymphocyte activation molecule (CDw150) as their cellular receptor (37), Edmonston-derived MV vaccine strains have evolved to also infect target cells via the membrane complement cofactor protein (CD46) (38). Because of its role as a membrane regulatory protein of the complement activity, CD46 is frequently overexpressed by tumoral cell lines compared to their normal tissue counterparts (27). This may represent an immune escape mechanism for cancer cells to overcome complement lytic activity (39). Hence, this cell mutation acquired during neoplastic transformation is in favor of tumor development, while paradoxically rendering the tumor more susceptible to infection and lysis by MV vaccine strains. As previously described for other cancers (8), we observed a significant up-regulation of CD46 expression by mesothelioma cancer cells in comparison with non-transformed mesothelial cells. We also noted a correlation between the expression level of CD46 receptor and MV infection yield, thus providing a mechanistic basis for the increased susceptibility of MPM to MV oncolytic activity.

Although *in vitro* models have clearly demonstrated that replication-competent oncolytic viruses efficiently spread and kill tumoral cell cultures, *in vivo* studies indicated that many physical barriers (circulating complement and neutralizing antibodies, architecture of the tumoral environment) could severely hamper the virus from reaching to the tumor site (4) and restrict viral replication to delimited peripheral areas within the tumoral mass (9, 10, 40). These observations strongly suggest that anti-tumoral properties of oncolytic viruses probably involve more than just tumor cell killing. Currently, there is increasing evidence that additional immune mechanisms may be implicated in virotherapy-mediated therapeutic effect. Indeed, several experimental studies have shown that Neutrophils and CD8 T-cells contribute to HSV- (41), VSV- (13, 14), and MV- (18) related virotherapy efficiency. This new approach of cancer immunotherapy, based on *in vivo* infection of tumors, raises the possibility to eliminate tumoral cells because they are recognized as infected rather than malignant (42). This could lead to the lysis of at least a limited set of infected tumor cells, thus providing an inflammatory state within the tumoral environment in favor of the induction of an efficient immune response (13). Indeed, this infectious site might release numerous pro-inflammatory factors that could lead to the recruitment of innate immune effectors (such as Neutrophils and NK-cells) and to the loading and activation of antigen-presenting cells (such as macrophages and dendritic cells). This would

provide an immunogenic presentation context of released tumor-associated cargo for the activation of an efficient tumor-specific CTL response (42). As previously described in the melanoma model, tumoral cell death promoted by oncolytic virus infection, with MVA poxvirus (43) or H-1 parvovirus (44), was previously related to an increased capacity for tumor-specific CD8 T-cell priming. We also demonstrated that DCs loaded with apoptotic MV-infected human mesothelioma cells stimulate a significant proliferation of MSLN-specific CD8 effector T-cells. This important result strongly supports the hypothesis on the participation of virus-induced anti-tumor immunity in therapeutic efficiency of MV-based oncolytic treatment (18).

While previous studies demonstrated a potential adjuvant activity of oncolytic virus in CTL response induction (43, 44), they did not describe spontaneous DC maturation such as we readily observed in this study. To our knowledge, these experimental data represent the first case wherein virus-induced death of human tumor cells induces spontaneous DCs maturation, without any additional adjuvant maturation stimuli (such as cytokine cocktails). Thus, our experimental results raise an interesting point about the mechanism(s) potentially implicated in a significantly increased immunogenicity of apoptotic measles-infected tumoral cells. Until now, apoptotic dying cells were thought to be weakly immunogenic, thereby modulating the immune response toward tolerance rather than immunity (34). However, several reports have already demonstrated the possibility of overriding the inhibitory effects of apoptotic cells ingestion on DC maturation by triggering apoptosis in presence of inflammatory ‘danger signals’, such as those produced by viral infection. The increased immunogenicity of infected tumoral cells may thus rely on innate immune stimuli, such as HSP70 (32, 33, 45) or dsRNA (28, 29, 31), produced by virally infected cells. Indeed, we readily observed that measles infection of M13 mesothelioma cells induces both HSP70 and dsRNA production peaking at 72 hours post-infection, a time delay necessary to detect a relevant DC spontaneous maturation (*data not shown*). As previously described by our group, DCs loaded with apoptotic HSP70-expressing M13 cells and activated by exogenous maturation agents are potent *in vitro* inducers of mesothelioma-specific CTLs (23). Interestingly, recent studies indicated a relevant adjuvant effect of cellular-associated dsRNA for tumor cells loaded with PolyI:C (46, 47) and for virally SFV-infected Vero cells (48). So, although not directly correlated by our results, we hypothesize that apoptotic mesothelioma cells loaded with viral dsRNA produced by MV infection might be a strong immunogenic signal, leading to the spontaneous maturation of monocyte-derived DCs, and the subsequent activation of a relevant

MSLN-specific CD8 T-cell response. Hence, our results suggest that MV-based virotherapy therapeutic efficiency may not only rely on viral oncolytic activity, but also on virus immuno-adjuvant properties, which may lead to priming of an efficient anti-tumor immune response.

This work raises a controversial question about the relative contribution of cross-priming and direct-priming in the activation of the host immune response. One of the major human immunosuppressive viral diseases is related to measles infection (6). Indeed, MV induces a transient but profound systemic immunosuppression that is associated with an increased susceptibility to opportunistic secondary infections. However, at the same time, MV infection also stimulates a specific anti-viral immune response that provides an efficient life-long protective immunity in infected individuals. Although not clearly understood, this immunological paradox is believed to be determined by early interactions of the virus with DCs (49). Indeed, all DCs sources tested were shown to be productively infected with MV (50, 51, 52). Both wild-type MV strains and Edmonston-derived vaccines induce the maturation of DCs, albeit with different kinetics (50). Activation of DCs was observed within 24h following wild-type infection, but only 48h-72h after Edmonston infection. In our study, we observed that monocyte-derived DCs are infected by the MV Schwarz strain with a lower yield than mesothelioma tumor cells. The direct contact of DCs with the MV Schwarz vaccine leads to the up-regulation of the major maturation markers 2 to 3 days post-infection (*data not shown*). So, we thought that the evolution of the DC phenotype observed only after 24h of co-culture might rather be induced by the phagocytosis of MV-infected mesothelioma cells, than by a direct infection of DCs.

In measles pathogenesis, DCs are believed to be a reservoir for MV spread into the draining lymph nodes during DC-T cell crosstalk (49). Several *in vitro* studies already demonstrated that the interaction of MV-infected DCs with T-cells not only induces syncytia formation, where MV undergoes massive replication, but also leads to an impairment of DC and T-cell functions (51,52). Indeed, MV-infected DCs are not able to stimulate the proliferation of naive T-cells (52), and they also exhibit a cytotoxic activity on activated T-cells (51). Since direct infection of DCs strongly altered their ability to stimulate effector T-lymphocytes, the proliferation of MSLN-specific CD8 T-cell precursors detected in the co-culture might rather be induced by DCs loaded with MV-infected tumor cells. So, the immunological mechanisms underlying measles-

induced immune suppression appear to be at least partially mediated through a direct targeting of DCs. In these conditions, it remains to be understood how DCs could stimulate MV-specific CD8 T-cells to elicit an efficient life-long protection to MV (49). Several pathways for the presentation of viral antigens to CD8 T-cells by DCs have been identified (direct-priming vs cross-priming). Cross-presentation of viral antigens by DC, by the uptake of virus-infected cells (48) or viral immune complexes (53), can serve as a means by which the host immune system can circumvent viral interference. Cross-priming may be dedicated to viruses that do not have natural tropism for DCs or viruses such as MV that may exert immunosuppressive activities on infected DCs (48). Since a viral-specific immune response might be rather induced through the cross-presentation pathway (53), we hypothesize that the reactivation of an anti-tumoral immune response by measles virotherapy could also use this indirect pathway.

Today, it seems likely that no conventional treatment modality will be effective enough by itself for an efficient MPM management (2). So, immunotherapy could be used as an adjuvant protocol in order to optimize the efficiency of current mesothelioma treatments, such as chemotherapy with pemetrexed-cisplatin drugs (54), or in the future pathogen-based therapy with bacterial immunotoxin (SS1P) (55) or oncolytic viruses (such as AdV, HSV or MV) (4). We believe that the results obtained from our study can help to design a new kind of therapeutic pathway, based on a synergistic association between viro- and immuno- therapy.

Acknowledgements

We thank Dr P. Despres for his helpful comment on the manuscript, C. Combredet and I. Barbieux for their excellent technical assistance, and K. Kean for the english editing.

REFERENCES

1. Robinson B, Musk A, Lake R. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005; 366: 397-408.
2. Scherpereel A and Group F. S. S. f. C. M. S. E. Guidelines of the French Speaking Society for Chest Medicine for management of malignant pleural mesothelioma. *Resp Med* 2007; 101: 1265-76.
3. Liu T, Kirn D. Systemic Efficacy with Oncolytic Virus Therapeutics: Clinical Proof-of-Concept and Future Directions. *Cancer Res* 2007; 67: 429-32.
4. Parato K, Senger D, Forsyth P, Bell J. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumors. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 965-76.
5. Fielding A. Measles as a potential oncolytic virus. *Rev Med Virol* 2005; 15: 135-42.
6. Moss W, Griffin D. Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 900-8.
7. Schwarz A. Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine. *Am J Dis Child* 1962; 103: 386-9.
8. Anderson B, Nakamura T, Russell S, and Peng K. High CD46 Receptor Density determines Preferential Killing of Tumor cells by Oncolytic Measles Virus. *Cancer Res* 2004; 64: 4919-26.
9. Grote D, Russell S, Cornu T, et al. Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood* 2001; 97: 3746-54.
10. Peng K, Ahmann G, Pham L, et al. Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. *Blood* 2001; 98: 2002-7.
11. Phuong L, Allen C, Peng K, 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 Res* 2003; 63: 2462-69.
12. Peng K, TenEyck C, Galanis E, et al. Intraperitoneal Therapy of Ovarian Cancer Using an Engineered Measles Virus. *Cancer Res* 2002; 62: 4656-62.
13. Breitbach C, Paterson J, Lemay C, et al. Targeted Inflammation During Oncolytic Virus Therapy Severely Compromises Tumor Blood Flow. *Mol Ther* 2007; 15: 1686-93.
14. Diaz R, Galivo F, Kottke T, et al. Oncolytic Immunovirotherapy for Melanoma Using Vesicular Stomatitis Virus. *Cancer Res* 2007; 67: 2840-48.
15. Bluming A, Ziegler J. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet* 1971; 2: 105-6.
16. Pasquinucci G. Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet* 1971; 1: 136.
17. Zygiert Z. Hodgkin's disease: remissions after measles. *Lancet* 1971; 1: 593.
18. Grote D, Cattaneo R, and Fielding A. Neutrophils contribute to the Measles Virus-induced Antitumor Effect: Enhancement by Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Expression. *Cancer Res* 2003; 63: 6463-68.
19. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, et al. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol* 2003; 77: 11546-54.
20. Parks C, Lerch R, Walpita P, Sidhu M, Udem S. Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. *J Virol* 1999; 73: 3560-66.
21. Hassan R, Ho M. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 2008; 44: 46-53.
22. Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, et al. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 1995; 14: 5773-84.
23. Ebstein F, Sapede C, Royer P, et al. Cytotoxic T cell Responses against Mesothelioma by Apoptotic Cell-pulsed Dendritic Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 1322-30.

24. Thomas A, Santarsiero L, Lutz E, et al. Mesothelin-specific CD8⁺ T Cell Responses Provide Evidence of in vivo Cross-Priming by Antigen-Presenting Cells in vaccinated Pancreatic Cancer Patients. *J Exp Med* 2004; 200: 297-306.
25. Hung C, Calizo R, Tsai Y, He L, Wu T. A DNA vaccine encoding a single-chain trimer of HLA-A2 linked to human mesothelin peptide generates anti-tumor effects against human mesothelin-expressing tumors. *Vaccine* 2007; 25: 127-35.
26. Vignard V, Lemercier B, Lim A, et al. Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J Immunol* 2005; 175: 4797-4805.
27. 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.
28. Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate Recognition of Viruses. *Immunity* 2007; 27: 370-83.
29. Berghall H, Siren J, Sarkar D, et al. The interferon-inducible RNA helicase, mda-5, is involved in measles virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect* 2006; 8: 2138-44.
30. Andrejeva J, Childs K, Young D, et al. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN- β promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17264-69.
31. Plumet S, Herschke F, Bourhis J, et al. Cytosolic 5'-Triphosphate Ended Viral Leader Transcript of Measles Virus as Activator of the RIG I-mediated Interferon Response. *PLoS ONE* 2007; 3: e279.
32. Li Z, Menoret A, Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 45-51.
33. Oglesbee M, Pratt M, Carsillo T. Role for heat shock proteins in the immune response to measles virus infection. *Viral Immunol* 2002; 15: 399-416.
34. Skoberne M, Beignon A, Larsson M, Bhardwaj N. Apoptotic cells at the crossroads of tolerance and immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 289: 259-92.
35. Stermann D, Recio A, Carroll R, et al. A Phase I Clinical Trial of Single-Dose Intrapleural IFN- β Gene Transfer for Malignant Pleural Mesothelioma and Metastatic Pleural Effusions: High Rate of Antitumor Immune Responses. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4456-66.
36. Adusumilli P, Stiles B, Chan M, et al. Imaging and therapy of malignant pleural mesothelioma using replication-competent herpes simplex viruses. *J Gen Med* 2006; 8: 603-15.
37. Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 2000; 406: 893-97.
38. Nanche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, et al. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 1993; 67: 6025-32.
39. Varsano S, Rashkovsky L, Shapiro H, et al. Human lung cancer cell lines express cell membrane complement inhibitory proteins and are extremely resistant to complement-mediated lysis; a comparison with normal human respiratory epithelium in vitro, and an insight into mechanism(s) of resistance. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 173-82.
40. Heinzerling L, Kunzi V, Oberholzer P, et al. 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.
41. Li H, Dutuor A, Fu X, Zhang X. Induction of strong antitumor immunity by an HSV-2 based oncolytic virus in a murine mammary tumor model. *J Gen Med* 2007; 9: 161-9.
42. Avogadri F, Martinoli C, Petrovska L, et al. Cancer Immunotherapy Based on Killing of Salmonella-Infected Tumor Cells. *Cancer Res* 2005; 65: 3920-27.

43. Greiner S, Humrich J, Thuman P, et al. The highly attenuated vaccinia virus strain modified virus Ankara induces apoptosis in melanoma cells and allows bystander dendritic cells to generate a potent anti-tumoral immunity. *Clin Exp Immunol* 2006; 146: 344-53.
44. Moehler M, Zeidler M, Wilsberg V, et al. Parvovirus H-1-Induced Tumor Cell Death Enhances Human Immune Response In vitro via Increased Phagocytosis, Maturation, and Cross-Presentation by Dendritic cells. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 996-1005.
45. Melcher A, Todryk S, Hardwick N, et al. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med* 1998; 4: 581-7.
46. McBride S, Hoebe K, Georgel P, Janssen E. Cell-Associated Double-Stranded RNA Enhances Antitumor Activity through the Production of Type I IFN. *J Immunol* 2006; 177: 6122-28.
47. Smits E, Ponsaerts P, Van de Velde A, et al. Proinflammatory response of human leukemic cells to dsRNA transfection linked to activation of dendritic cells. *Leukemia* 2007; 21: 1691-9.
48. Schulz O, Diebold S, Chen M, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 2005; 433: 887-92.
49. Servet-Delprat C, Vidalain PO, Valentin H, Rabourdin-Combe C. Measles virus and dendritic cell functions: how specific response cohabits with immunosuppression. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003; 276: 103-23.
50. Schnorr JJ, Xanthakos S, Keikavoussi P, et al. Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 5326-31.
51. Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivaller P, et al. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med* 1997; 186: 813-23.
52. Grosjean I, Caux C, Bella C, et al. Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997; 186: 801-12.
53. Durrbach A, Baple E, Preece AF, Charpentier B, Gustafsson K. Virus recognition by specific natural antibodies and complement results in MHC I cross-presentation. *Eur J Immunol* 2007; 37: 1254-65.
54. Lake R, Robinson B. Immunotherapy and Chemotherapy - a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 397-405.
55. Pastan I, Hassan R, FitzGerald D, Kreitman R. Immunotoxin treatment of cancer. *Ann Rev Med* 2007; 58: 221-37.

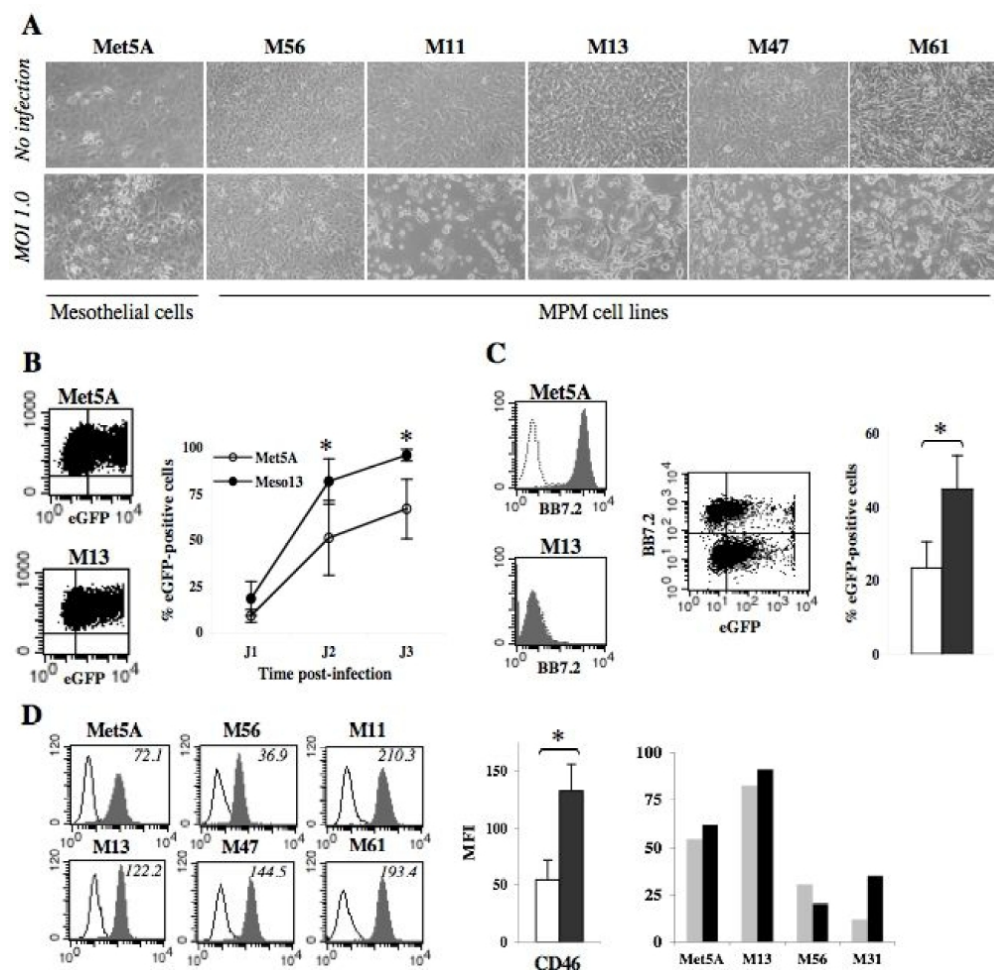


Figure 1: Mesothelioma susceptibility to MV infection and oncolytic activity. A- Selective oncolytic activity of MV vaccine strain. A panel of human epithelioid mesothelioma cell lines (M11, M13, M47, M56 & M61) and a mesothelial (Met5A) cells line were infected with MV Schwarz strain (MOI=1.0) and microscopic observations of morphological modifications of MV-infected cultures were performed 72 hours later. **B&C-** MV Schwarz strain preferentially infects transformed tumoral cells. Equal numbers of M13 and Met5A cells were cultured separately (B) or co-cultured (C) overnight allowing cellular adherence, and infection was carried out at an MOI of 1.0 with eGFP-recombinant MV strain. In separate cultures, analysis of eGFP expression was performed at different times post-infection (24, 48 and 72 hours) by flow cytometry (B). In the co-culture model, the same experiment was conducted along with HLA-A2 staining (BB7.2 Ab, kindly provided by Jotereau F. U601, Nantes), as HLA allele differential expression allowed a distinction between the two cell lines. The histogram shows % eGFP-positive cells for Met5A (white bar) and M13 (black bar) cells from co-culture (C). For B & C panels, * means $p < 0.05$. **D-** Up-regulated surface expression of CD46 receptors for tumoral cells in comparison with their normal cell counterparts. Cells were stained with FITC-conjugated CD46-specific Abs (grey histogram) or related isotype Ig control (white histogram). Numbers indicates the mean fluorescence index. The left histogram shows the mean values of CD46 expression level obtained for mesothelial (white bar) and mesothelioma (black bar) cell lines (* means $p < 0.05$). The right histogram shows a correlation between CD46 expression level (grey bar) and MV infection yield 48 hours post-infection (black bar), obtained for mesothelial (Met5A) and mesothelioma (M13, M56, and M31) cell lines.

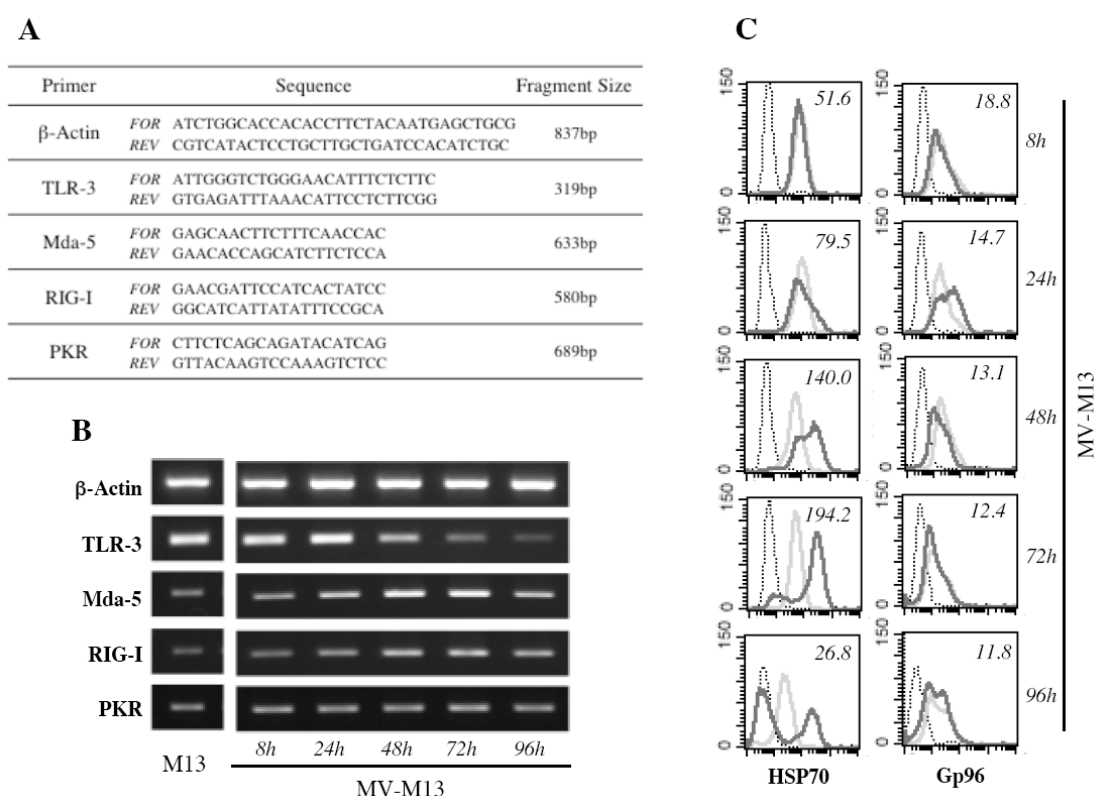


Figure 2: Immunogenicity of MV-infected M13 cells. Mesothelioma M13 cells were left untreated or co-cultured with Schwarz MV (MOI=1.0). Total cellular RNA was extracted from cell pellets, and the expression of Mda5, TLR3, RIG-I, PKR and IFN β were assessed by RT-PCR. Gene-specific primers sets used in RT-PCR experiments are listed in (A). PCR products were visualized by ethidium bromide staining after electrophoresis through a 2% agarose gel (B). C- HSP expression by M13 cells. Flow cytometric kinetic assays of HSP70 and Gp96 expression before (grey histogram) and after (black histogram) viral infection (MOI=1.0). Cells were collected at the indicated time points by a brief trypsinization and washed in PBS. Intracellular staining was performed by indirect staining with anti-HSP70 and anti-Gp96 primary Abs followed by incubation with Alexa488-conjugated secondary Abs. For B & C panels, data shown are representative of two independent experiments.

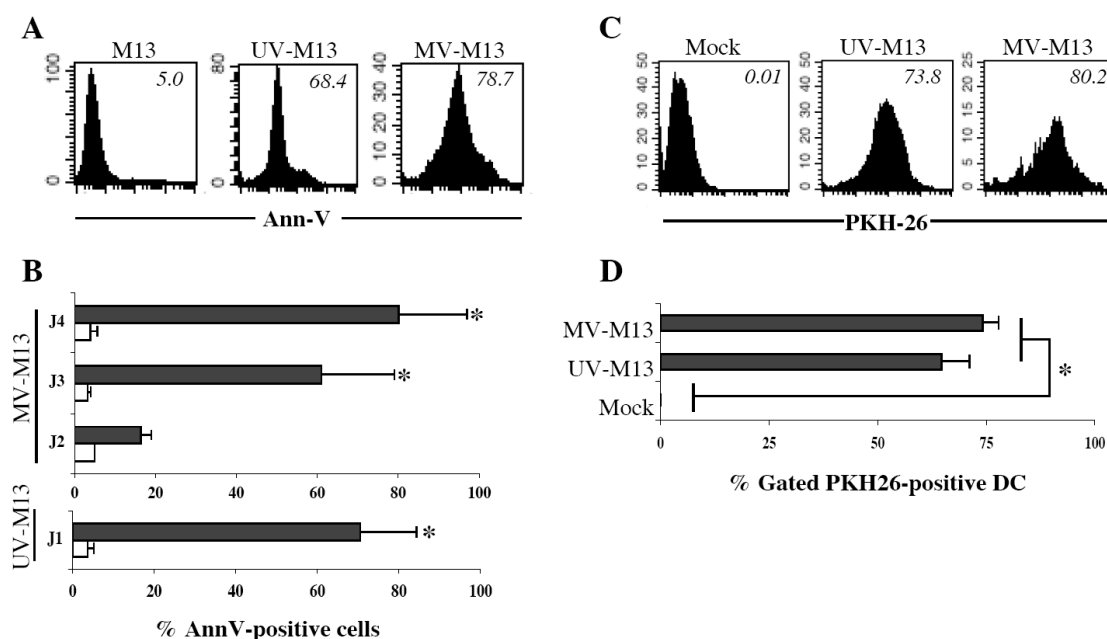


Figure 3: Phagocytosis Yield of apoptotic MV-infected M13 cells by DCs. Phagocytosis yield of apoptotic MV-infected M13 cells by DCs. A&B- Flow cytometry kinetic analysis of M13 tumoral cells apoptosis triggered by UV-exposure (5kJ/cm²) or MV-infection (MOI=1.0). Mesothelioma M13 cells were grown on 24-well plates to obtain confluent cultures. From days 0-4 after MV- or UV- treatment, both adherent and non-adherent tumoral cells were collected for cell death quantification with a FITC-conjugated Ann-V BD reagent. One representative experiment of three with similar results is shown (A). Histogram shows mean values of AnnV-positive cells % for each apoptosis condition tested (B). * means $p < 0.05$. C&D- UV- or MV- treated M13 tumor cells were labeled with PKH-26 and co-cultured with J5 immature DCs for 24 hours (ratio 2:1). Harvested DCs were subsequently stained with FITC-conjugated anti HLA-DR Abs and analyzed by flow cytometry. The number of double-positive DCs (PKH-26+/FITC+), that is the % of PKH-26 positive DCs gated on basis of HLA-DR expression (FITC-conjugated Abs, clone B8.12.2, Immunotech), indicates phagocytosis efficiency. One representative experiment of three with similar results is shown (C). The histogram shows the mean values of uptake yield for each loading condition tested (D). Statistical analysis compared values with those obtained for DC mock (* means $p < 0.05$).

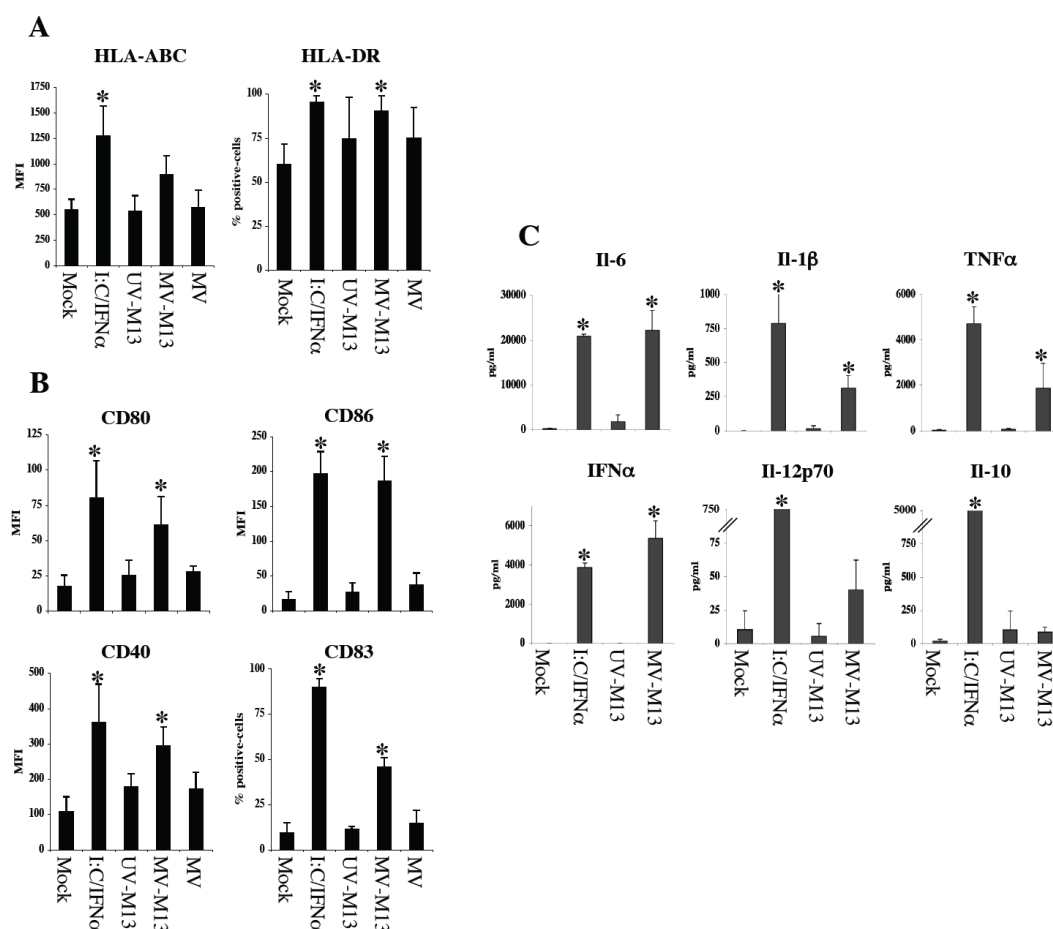


Figure 4: Co-culture with MV-infected M13 cells induced spontaneous DCs maturation. A&B- Immature DCs and apoptotic M13 tumoral cells were cultured in the indicated combinations (ratio 2/1) for 18 hours. As a positive maturation control, DCs were incubated with a combination of the TLR3 ligand Poly(I:C) (Sigma; 50 μ g/ml) and IFN α (AbCysSA; 500U/ml). DCs were also directly infected with MV Schwarz strain (MOI=1.0). DCs were next harvested and stained with a PE-conjugated Abs panel specific for the indicated cell surface molecules (A-HLA and B-Co-stimulation markers). Viable DCs were gated according to their morphology characteristics and on the basis of TOPRO-3 positive staining exclusion. C- DCs cytokine secretion pattern was investigated on 24 hours supernatant co-culture by CBA (for IL-6, IL-1 β , TNF α , IL-12 & IL-10) and ELISA (for IFN α) assays. For A, B & C panels, the histograms show mean values obtained from five independent donors. Statistical analysis compared values with those obtained for DC mock (* means $p < 0.05$).

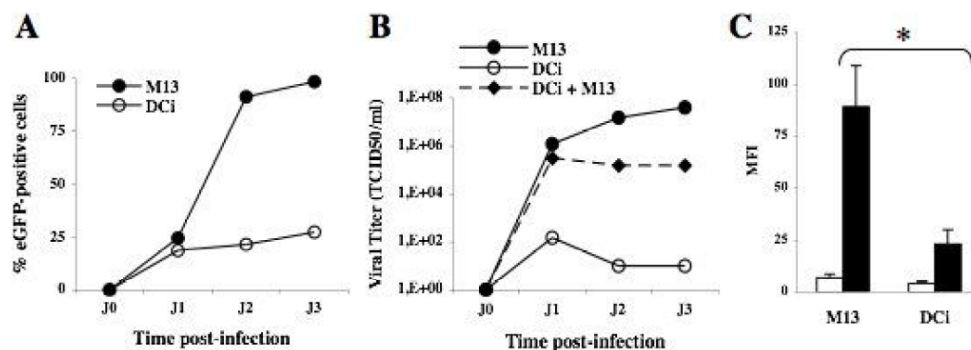


Figure 5: Infection and Replication properties of MV Schwarz vaccine. A&B- Infection was carried out at an MOI of 1.0 with eGFP-recombinant MV strain in mesothelioma cells (M13) and in immature monocyte-derived DC (DCi). MV infection yield was quantified by a flow cytometry analysis of eGFP expression at different times post-infection (A). Replication rate was evaluated by the production of infectious viral particules in the supernatant and pellet of MV-infected cells (B). MV titers were determined on Vero cells, as previously described (20, 22). C- The histogram shows the mean values of CD46 expression level obtained for mesothelioma cells (M13) and immature monocyte-derived DC (DCi). Cells were stained with FITC-conjugated CD46-specific Abs (black bar) or related isotype Ig control (white bar). Statistical analyses compared CD46 expression level between mesothelioma cells (M13) and immature monocyte-derived DC (DCi) (* means $p < 0.05$).

A

Name	Position	Sequence	Restriction	SYFPEITHI Score	BIMAS Score	Reference
VLP9	531-539	VLPLTVAEV	HLA-A2	29/30	272/285	(24)
KLL10	541-550	KLLGPHVEGL	HLA-A2	30/31	312/312	(25)

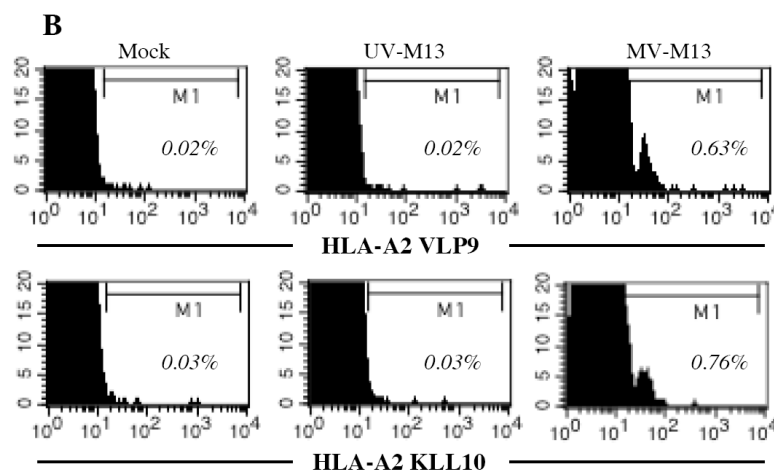


Figure 6: DCs loaded with MV-infected M13 cells stimulate MSLN-specific CD8 T-cells proliferation. A- Table 2 shows candidate HLA-A0201 restricted human MSLN-derived CTL epitopes. Target peptides MSLN531-539 and MSLN541-550 were initially identified by scanning the MSLN amino-acid sequence (NP 005814) for matches to consensus motifs for HLA-A0201 binding, using two computer algorithms BIMAS and SYFPEITHI. The positions, sequences, and MHC binding scores of selected peptides were determined. B- Number of MSLN-specific CD8 T-cells, derived from one-week sensitization co-culture with unpulsed, UV-M13, or MV-M13 pulsed DCs, were analyzed by flow cytometry. The histogram indicates the percentage of PE-tetramer positive cells among T-cells gated on basis of human CD8 α expression (PECy5-conjugated Abs, clone RPA-T8, BD Biosciences). One example of two independent donors with similar results is shown.

III. Isolement de clones de lymphocytes T CD8 dirigés contre des épitopes de MUC-1 et de MSLN

INTRODUCTION :

Les protéines MUC-1 et MSLN étant exprimées par les cellules du MPM, il nous a paru intéressant d'isoler des clones de lymphocytes T CD8 spécifiques d'épitopes de MUC-1 et de la MSLN, afin d'étudier la réponse dirigée contre ces antigènes. Pour ce faire, nous avons employé une technique qui consiste à stimuler plusieurs fois des lymphocytes T avec des MoDC matures autologues (du même donneur) chargées avec un peptide (Fonteneau *et al.*, 2001). Les lymphocytes T spécifiques du peptide sont ensuite détectés par un marquage intracellulaire IFN γ puis clonés par la technique de la dilution limite.

Plusieurs épitopes ont été décrits pour chacun de ces deux antigènes et ceux sur lesquels nous avons basé notre travail sont indiqués dans le tableau 10. Notre choix s'est porté sur ces épitopes pour plusieurs raisons :

- D'après les prédictions (SYFPEITHI, <http://www.syfpeithi.de/>) (Rammensee *et al.*, 1999), ces épitopes présentent une forte affinité pour les molécules HLA-A*0201 (tableau 10).
- Des cellules spécifiques des épitopes de MUC-1 ont déjà démontré une activité cytotoxique *in vitro* (Brossart *et al.*, 1999) et l'épitope de la MSLN a déjà été présenté dans un contexte de CP (Thomas *et al.*, 2004).

Antigène	Séquence épitope	Position	Restriction	Score SYFPEITHI	Références
MUC-1	LLLLTVLTV	12-20	HLA-A*0201	31	(Brossart <i>et al.</i> , 1999)
	STAPPVHNV	950-958	HLA-A*0201	26	
MSLN	VLPLTVAEV	530-538	HLA-A*0201	29	(Thomas <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 10: Informations concernant les épitopes de MUC-1 et de la MSLN étudiés.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Milieux de culture

Le milieu de culture RPMI 1640 (Cambrex, Verviers, Belgique) a été supplémenté avec 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine (Sigma Aldrich, St Louis, MO), 2mM de L-Glutamine (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) et 8% de sérum humain (EFS de Nantes) ou 8% de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio, Les Ulis, France).

Anticorps et marquages membranaires (cytométrie en flux)

Les anticorps monoclonaux couplés PE dirigés contre les molécules CD3 (clone UCHT1), CD14 (clone RMO52), CD80 (clone MAB104), CD83 (clone HB15a), CD86 (clone HA.5.2B7) et HLA-ABC (clone B9.12.1) ont été fournis par Immunotech (Villepinte, France); ceux dirigés contre les molécules CD4 (clone RPA-T4), CD8 (clone RPA-T8), IFN γ (clone 4S.B3) et MUC-1 (clone HMPV) par BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ). Des isotypes ont été utilisés comme contrôles.

Les cellules ont été rincées etensemencées dans des plaques 96-puits à fond conique dans du PBS + BSA 1%. Les cellules ont été incubées avec les anticorps (dilution de 1/50) pendant 20 minutes, à 4°C, à l'abri de la lumière et sous agitation avant d'être analysées sur un FACScalibur (BD Biosciences Pharmingen). Les figures présentées dans la partie résultats ont été réalisées avec le logiciel WinMDI 2.9 (logiciel libre).

Lignées cellulaires

Les lignées WEHI 164 clone 13 (W13), T2 et LAZ ont été fournies par le Pr. F. Jotereau (INSERM U601, Nantes). La lignée MCF-7, restreinte HLA-A*0201, provient de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). La lignée OVCAR-3 (HLA-A*0201) a été donnée par le Dr. C. Saï (INSERM U601, Nantes). La lignée ADK3 (HLA non-A2) a été établie dans notre équipe à partir du liquide pleural d'un patient atteint d'une métastase d'un ADK peu différencié. Toutes ces lignées ont été maintenues en culture dans du milieu contenant du SVF.

Isolement des cellules

Les cellules ont été isolées à partir de résidus d'anneaux de cytophérèse provenant de donneurs sains d'haplotype HLA-A*0201 (EFS de Nantes). Les PBMCs ont été isolés par centrifugation

sur gradient de Ficoll (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) puis rincés deux fois avec du RPMI 1640 (10 minutes à 2000 rpm puis 10 minutes à 1000 rpm). Les lymphocytes et monocytes ont été séparés par élutriation (centrifugation à contre-courant) par l'utilisation d'une centrifugeuse Beckman Avanti J20 équipée d'un rotor JE5.0 et d'une chambre d'élutriation de 5 mL. La vitesse de centrifugation était fixée à 2500 rpm tandis que le débit du contre-courant a été augmenté (12, 15, 20, 24 et 30 mL / minute) pour séparer les différentes populations. Sept fractions de 150 mL ont été récupérées. L'analyse morphologique (taille / structure) des cellules de chaque fraction a été effectuée par cytométrie en flux. Les fractions contenant le plus de monocytes et de lymphocytes ont été conservées. Les lymphocytes ont été congelés dans du SVF + 10% DMSO à raison de $50 \cdot 10^6$ cellules/mL et conservés jusqu'à la première stimulation. Les monocytes ont servi à produire des DC.

Génération et maturation des DC

Les monocytes ont étéensemencés dans des plaques 12 puits (2 mL par puits) à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules par mL dans du milieu RPMI 1640 contenant du SVF, du GM-CSF (500 UI/mL) et de l'IL-4 (40 ng/mL). Après 6 jours de culture, les DC immatures ont été récupérées et reprises après centrifugation (1200 rpm pendant 10 minutes) dans du milieu frais, toujours en présence de GM-CSF et d'IL-4, à une concentration de 10^6 cellules par mL. Ces DC ont été réensemencées dans des plaques 24-puits coatées avec du poly(2-hydroxyethylmetacrylate) (Sigma) afin de prévenir leur adhésion au plastique. La maturation, induite par 24h de traitement avec 20 ng/mL de TNF α et 50 mg/mL de poly I:C (Sigma) (Spisek *et al.*, 2001), a été contrôlée par l'analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs suivants: CD80, CD83, CD86, HLA-ABC et CD14.

Tri des lymphocytes T CD8

Les lymphocytes ont été décongelés le jour de la première stimulation. Les lymphocytes T CD8 ont été triés grâce à un kit de sélection négative (CD8+ T Cells Isolation Kit II, Miltenyi Biotec). Ce kit contient des anticorps biotinylés dirigés contre les molécules CD4, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , et CD235a (Glycophorin A). Des billes magnétiques couplées à un anti-biotine sont ensuite utilisées pour séparer sur colonne les cellules marquées (fraction positive) des cellules non marquées (fraction négative contenant les lymphocytes T CD8). La pureté des cellules obtenues a été contrôlée par cytométrie (marquages CD3, CD4 et CD8).

Peptides

Les peptides MUC-1₍₁₂₋₂₀₎ (LLLVV), MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎ (STAPPVHNV) et MSLN₍₅₃₀₋₅₃₈₎ (VLPVAEV) ont été fournis par Epytop (Nîmes, France). Les peptides lyophilisés ont été resuspendus dans du DMSO, à une concentration de 10 mg/mL et stockés à -20°C.

Stimulation de lymphocytes T CD8 spécifiques des peptides MUC-1 et MSLN

Les DC matures ont été chargées 2h à 37°C avec 10 µg/mL de peptides synthétiques dérivés de MUC-1 ou de la MSLN puis rincées deux fois. Ces DC chargées ont alors été cultivées avec les CD8 autologues à un ratio de 1/10, en plaques 96-puits à fonds ronds ou 24-puits, dans du RPMI 1640 contenant du sérum humain ainsi que de l'IL-6 (5 ng/mL) et de l'IL-12 (5 ng/mL) au cours de la première stimulation, puis de l'IL-2 (10 U/mL) et de l'IL-7 (5 ng/mL) pour les 2 stimulations suivantes (Fonteneau *et al.*, 2001). Les stimulations ont été réalisées à dix jours d'intervalle. Le milieu a été renouvelé de moitié tous les 3 jours au minimum.

Détection des lymphocytes T CD8 spécifiques des peptides par marquage intracellulaire de l'IFN γ

A l'issue de la troisième stimulation, des aliquots de lymphocytes T CD8 de chaque puits ont été co-cultivés avec la lignée T2 chargées ou non en peptide, à un ratio effecteurs / cibles de 1 : 2, en présence de brefeldine A à 10 µg/mL. Après une incubation de 6h à 37°C, les cellules ont été marquées avec l'anti-CD8 (dilution 1/50 dans du PBS, 20 minutes à 4°C, sous agitation), rincées deux fois, fixées pendant 10 minutes à température ambiante dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde puis rincées à nouveau deux fois. Le marquage intracellulaire de l'IFN γ a été réalisé en incubant les cellules avec l'anti-IFN γ dilué à 1/40 dans du PBS contenant 0,1% de BSA et 0,1% de saponine pendant 20 minutes, à 4°C, sous agitation. Le pourcentage de lymphocytes T CD8 spécifiques a été calculé en soustrayant le pourcentage de cellules productrices d'IFN γ en réponse aux T2 non chargées du pourcentage de cellules productrices d'IFN γ en réponses aux T2 chargées.

Détection des lymphocytes T CD8 spécifiques des peptides par mesure du TNF α libéré

Nous nous sommes inspirés d'une technique basée sur le fait que le TNF est cytotoxique pour les cellules W13. Une co-culture des lymphocytes T CD8 en présence de la lignée T2 (TAP déficiente) chargée ou non en peptide a été réalisée à un ratio effecteurs / cibles de 1 : 2 dans des

plaques 96-puits à fonds ronds. Après 12h, 50 μ L de surnageant de chaque puits ont été versés dans une nouvelle plaque 96-puits à fonds plats contenant 15.10^4 cellules W13 dans 50 μ L de RPMI supplémenté en SVF et contenant 40 mM de chlorure de Lithium et 2 mg/mL d'actinomycine D (Sigma). Après une incubation sur la nuit (20h environ) à 37°C, le pourcentage de cellules mortes a été évalué par un dosage colorimétrique basé sur la capacité des cellules vivantes à produire un dérivé coloré. 50 μ L de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-23-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) dilué à une concentration de 2,5 mg/mL dans du PBS ont été ajoutés dans chaque puits. Après 3 h d'incubation à 37°C, les cristaux bleu foncé de formazan ont été dissous par ajout de 100 μ L de solution de lyse. Cette solution a été préparée en mélangeant 1 volume de N,N-diméthylformamide (Sigma) avec 2 volumes de 30% SDS (dilué dans de l'eau). Le pH de cette solution a été ajusté à 4,7 en ajoutant 2,5% d'acide acétique et 2,5% d'acide chlorhydrique à 0,1 M. La lecture des plaques a été effectuée au bout de 4h d'incubation (à température ambiante et à l'abri de la lumière) au minimum à une longueur d'onde de 570 nm. La concentration en TNF (exprimée en pg/mL) des surnageants a été estimée en comparant les mesures de densité optique (D0) obtenues sur une gamme de concentrations connues en TNF réalisée parallèlement en triplicate (200 pg/mL pour la concentration maximum, 11 dilutions successives au $\frac{1}{2}$). Les puits ont été considérés positifs lorsque la différence entre lymphocytes T CD8 cultivés en présence de T2 chargées et lymphocytes T CD8 cultivés en présence de T2 non chargées était supérieure à 30 pg/mL.

Clonage des lymphocytes T CD8

Les cellules provenant des cultures polyclonales contenant des lymphocytes T CD8 spécifiques des peptides ont été clonées par la technique de la dilution limite. Des plaques 96-puits à fond rond ont étéensemencées avec un mélange de 10^6 PBMCs et de 10^5 cellules LAZ (par plaque), irradiés à 35 et 70 gray respectivement, dans du RPMI supplémenté en sérum humain, phytohemagglutinin-L à 1 μ g/mL (Sigma) et IL-2 à 150 U/mL. Les cellules T ont étéensemencées dans ces plaques à une concentration de 10, 1 et 0,3 /puits. Pour le clonage MUC-1₍₁₂₋₂₀₎: $\frac{1}{2}$, 1 et 3 plaques ont étéensemencées respectivement. Pour les clonages MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎ et MSLN₍₅₃₀₋₅₃₈₎, le clonage a été effectué en deux temps : une première étape où une vingtaine de plaques ont étéensemencées à 1 cellule/puits. Un test de détection de sécrétion de TNF α a été réalisé sur les puits dans lesquels les lymphocytes ont proliféré. Un marquage intracytoplasmique IFN γ a ensuite été réalisé afin de confirmer les puits positifs. Une nouvelle étape de clonage par

dilution limite a été réalisée en ensemençant des plaques à 10, 1 et 0,3 cellules/puits (1, 1 et 10 plaques respectivement). Le milieu, contenant de l'IL-2 mais pas de phytohemagglutinin-L, a été renouvelé tous les trois jours

Analyse de l'expression des V β par les clones

L'expression des TCR V β par les clones 8 (MUC-1₍₁₂₋₂₀₎) et K7.2 (MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎) a été étudiée par marquage indirect en cytométrie en utilisant 21 anticorps monoclonaux non couplés dirigés contre : V β 2, V β 3, V β 4, V β 5.1, V β 5.2, V β 5.3, V β 7, V β 8, V β 9, V β 11, V β 13.1, V β 13.2, V β 13.6, V β 14, V β 16, V β 17, V β 18, V β 20, V β 21.3, V β 22, V β 23 (M. Bonneville, INSERM U601, Nantes) puis un anticorps secondaire anti-IgG1 de souris couplé FITC (Sigma).

Test des clones sur les cellules tumorales

La capacité des clones à s'activer en présence de cellules tumorales a été analysée par double marquage CD8/IFN γ sur ces clones co-cultivés avec les lignées MCF-7, OVCAR-3 et ADK3 chargées ou non en peptides (ratio effecteurs / cibles de 1 /1). Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans le paragraphe concernant le marquage IFN γ intracellulaire.

RÉSULTATS :

1. Génération et maturation des DC

La technique de l'élutriation (centrifugation à contre-courant) permet de séparer différentes populations cellulaires en fonction de leur taille. A l'issue de l'élutriation, 7 fractions ont été récupérées et analysées sur leurs critères morphologiques (taille/structure) afin de déterminer celles qui contenaient les populations de monocytes ou de lymphocytes les plus pures. L'analyse des cellules contenues dans les différentes fractions ainsi qu'un échantillon des PBMCs avant élutriation est représentée sur la figure 21 (page 135). La fraction 1 a été conservée car elle contenait 90% de lymphocytes et très peu de monocytes. Les fractions 4 et 5, avec 74 et 86 % de monocytes respectivement, ont été utilisées pour la production des DC.

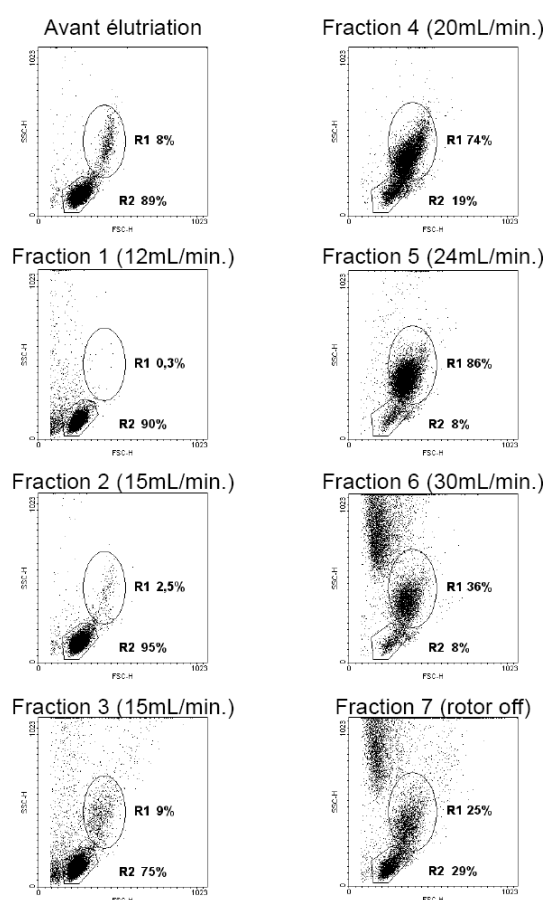


Figure 21: Fractions obtenues après élutriation des PBMCs.

L'analyse de la population globale est représentée en haut à gauche. Au cours de l'élutriation, différentes fractions correspondant à des débits variables sont récupérées. Après analyse de la morphologie des cellules contenues dans les différentes fractions par cytométrie en flux, les fractions suivantes ont été utilisées pour la suite de l'expérience : 1 pour les lymphocytes (90% de la population représentée par des lymphocytes) et 4 et 5 (population monocytaire enrichie à 74 et 86% respectivement) pour la production de DC.

Les monocytes ont été différenciés en DC immatures pendant 6 jours puis maturées sous l'influence du $\text{TNF}\alpha$ et du poly I:C (Spisek *et al.*, 2001). Un contrôle de la maturation a été réalisé par cytométrie en flux (figure 22, page 136).

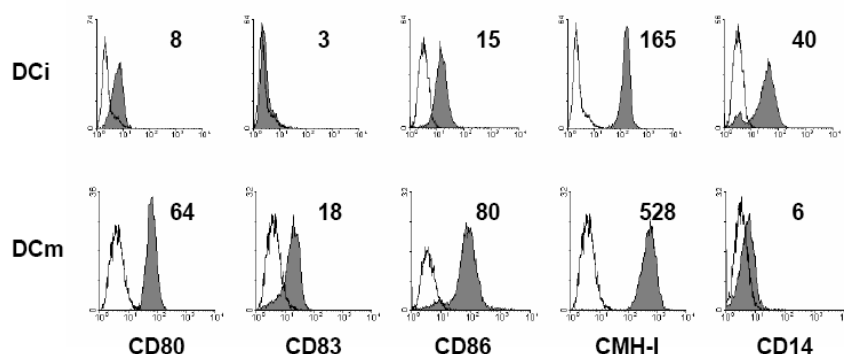


Figure 22 : Contrôle de la maturation des DC.

L'expression des marqueurs CD80, CD83, CD86, HLA-ABC et CD14 a été évaluée par cytométrie. Les DCi et les DCm sont marquées le 7ème jour de culture. Les DCi correspondent à des cellules cultivées en milieu contenant de l'IL-4 et du GM-CSF seulement alors que les DCm ont été en contact pendant 24h avec les agents de maturation suivants : TNF α et poly-I:C. Les contrôles isotypiques sont représentés par les histogrammes blancs, les marqueurs de maturation par les histogrammes gris. Les chiffres correspondent aux medianes de fluorescence. DCi: DC immatures, DCm: DC matures.

2. Purification des lymphocytes T CD8.

Les lymphocytes totaux ont été congelés suite à l'élutriation. Le jour de la stimulation de ces lymphocytes, les lymphocytes T CD8 ont été triés par l'utilisation d'un kit de sélection négative. La pureté de la population obtenue a été contrôlée par cytométrie en flux (figure 23, page 136).

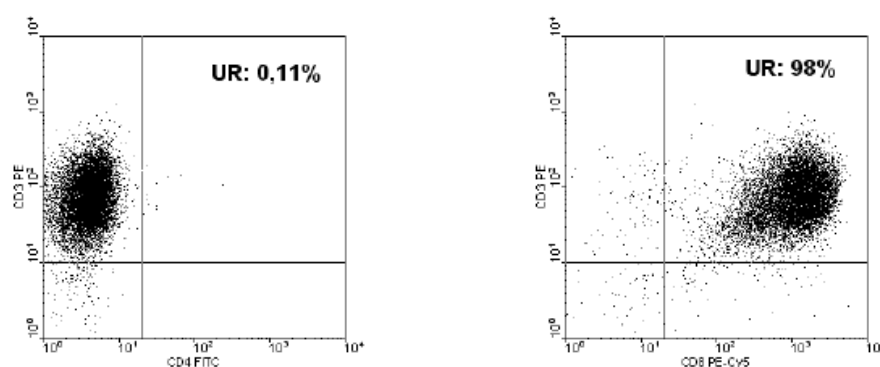


Figure 23: Caractérisation des lymphocytes obtenus après tri sur colonne.

La fraction négative a été marquée (anti-CD4 FITC, anti-CD3 PE et anti-CD8 PE-Cy5) et analysée par cytométrie. La majeure partie des lymphocytes T CD4 a été éliminée (très peu de cellules doublement marquées CD3 et CD4, à gauche) et 98% de la population est représentée par des lymphocytes T CD8 (doublement marqués CD3 et CD8, à droite).

3. Détection des lymphocytes T CD8 spécifiques des séquences peptidiques utilisées.

Les lymphocytes T CD8 ont été stimulés par des DCM chargées en peptides MUC-1₍₁₂₋₂₀₎, MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎ ou MSLN₍₅₃₀₋₅₃₈₎ 3 fois à 10 jours d'intervalle. Les fréquences des lymphocytes T spécifiques vis-à-vis des épitopes ont été testées par double marquage CD8/IFN γ et étaient de 21%, 1% et 0,15% pour MUC-1₍₁₂₋₂₀₎, MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎ et MSLN₍₅₃₀₋₅₃₈₎ respectivement (figure 21, page 135).

Les cellules qui avaient été stimulées vis-à-vis du peptide MUC-1₍₁₂₋₂₀₎ étaient cultivées en plaques 96 puits. Les puits contenant des lymphocytes T spécifiques du peptide ont d'abord été identifiés par le test du surnageant de co-culture CD8 / T2 chargées (résultats non montrés) puis les puits ont été confirmés par la technique du marquage de l'IFN γ en intracytoplasmique.

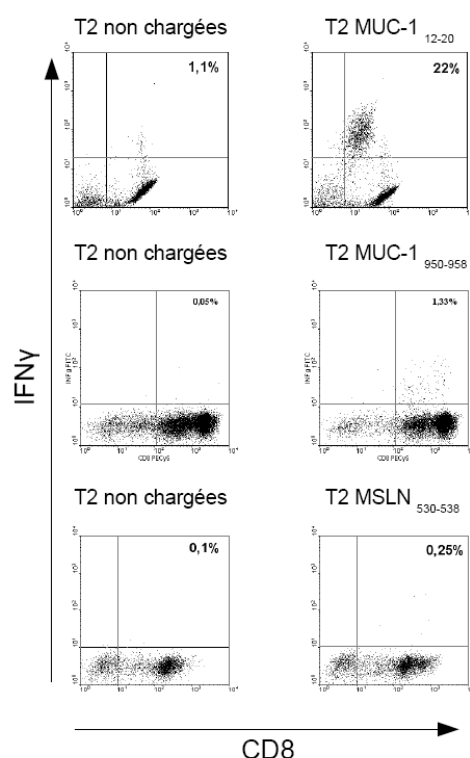


Figure 24 : Détection des lymphocytes T CD8 spécifiques des peptides de MUC-1 et MSLN.

Analyse de la sécrétion d'IFN γ par les cellules T CD8, après 3 sensibilisations, vis-à-vis des peptides MUC-1₍₁₂₋₂₀₎, MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎ et MSLN₍₅₃₀₋₅₃₈₎ présentés par la lignée T2. La fréquence de lymphocytes T CD8 spécifiques est calculée en retirant le pourcentage de cellules doublement marquées dans le puits témoin (co-cultivés avec T2 non chargées) au pourcentage de cellules doublement marquées du puits contenant les lymphocytes T et les T2 chargées. Cette fréquence est élevée dans le cas de l'épitope MUC-1₍₁₂₋₂₀₎: 21%. mais plus faible pour les peptides MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎ et MSLN₍₅₃₀₋₅₃₈₎, (1,1 et 0,15%).

4. Isolement des clones de lymphocytes T CD8 dirigés contre les épitopes de MUC-1

Après l'ensemencement des lymphocytes T CD8 par dilution limite, les puits contenant les cellules spécifiques des épitopes ont été détectés par la mesure du TNF α libéré (figure 25, page 138).

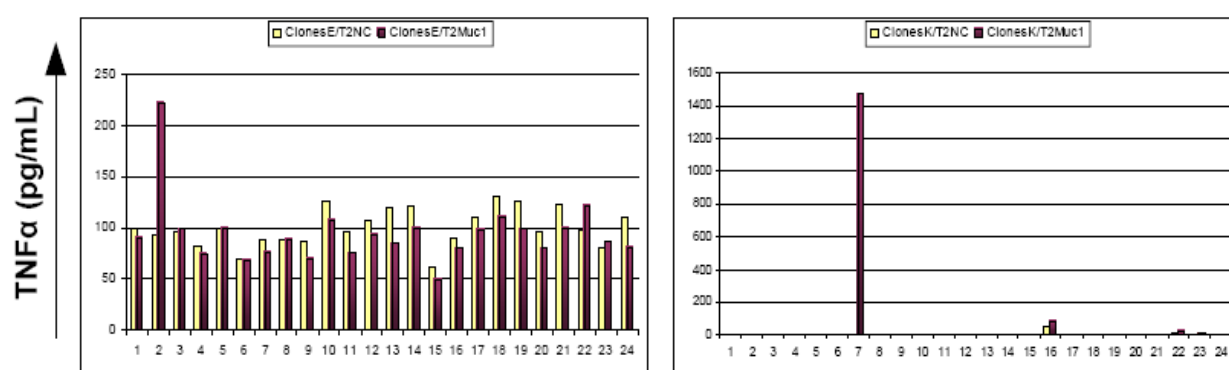


Figure 25: Dosage du TNFalpha dans les surnageants de co-culture CD8 / T2.

Les puits présentant une différence élevée entre les T2 chargées et non chargées sont susceptibles de contenir des cellules T CD8 spécifiques vis-à-vis des peptides. Ici, le puits 2 de la plaque E et le puits 7 de la plaque K sont positifs. Il s'agit de résultats obtenus lors du clonage de lymphocytes T CD8 dirigés contre l'épitope MUC-1 (950-958).

Pour confirmer que les puits contenant du TNF α contiennent des lymphocytes T CD8 spécifiques du peptide testé, un double marquage CD8/IFN γ a été réalisé (figure 26, page 138).

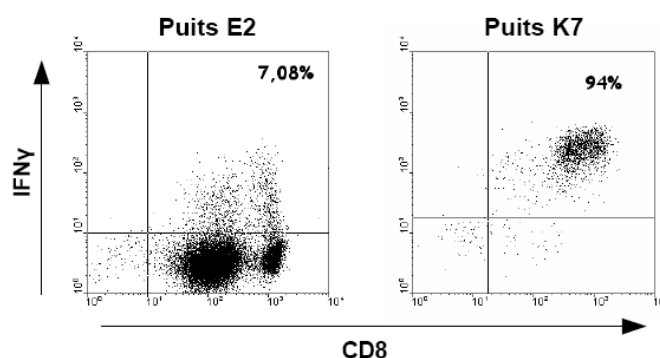


Figure 26: Confirmation des puits par analyse de la sécrétion d'IFN gamma.

Avec 94% de cellules doublement marquées CD8/IFN γ , c'est le puits K7 qui semble le plus intéressant. Le puits E2, avec seulement un peu plus de 7% de cellules doublement positives ne sera pas conservé pour la suite des expériences.

Plusieurs puits se sont révélés être positifs pour MUC-1₍₁₂₋₂₀₎ (dont le puits 8) et MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎ (dont le puits K7.2). En ce qui concerne l'épitope MSLN₍₅₃₀₋₅₃₈₎, aucun des puits ensemencé n'a donné de signal positif et aucun clone dirigé contre cet épitope n'a pu être isolé au cours de ces expériences.

5. Vérification de la clonalité des lymphocytes T CD8 des puits 8 (MUC-1₍₁₂₋₂₀₎) et K7.2 (MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎)

Afin de s'assurer que les cellules des puits 8 et K7 sont issues d'une même cellule, c'est à dire qu'ils sont bien monoclonaux, des marquages ont été réalisés sur la chaîne V β du TCR. Chaque puits a été testé avec des anticorps spécifiques de différents V β (figure 27, page 139). Ce marquage a permis de montrer que les deux clones (8 et K7.2) sont bien monoclonaux, c'est à dire issus d'une seule cellule.

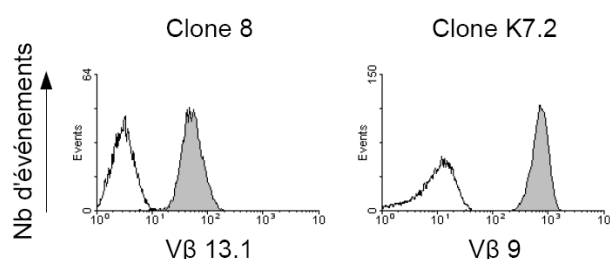


Figure 27: Marquage V beta des CD8.

Les cellules des puits 8 et K7.2 ont été marquées par des anticorps monoclonaux dirigés contre différents V β . Les cellules du puits 8 expriment le V β 13.1 et celles du puits K7.2 le V β 9. Le marquage est homogène pour chacun des deux puits, ce qui signifie que les cellules isolées sont bien clonales.

6. Mise en évidence de l'expression de MUC-1 par les cellules tumorales

MUC-1 est un antigène exprimé par de nombreux types de tumeurs. La lignée MCF-7 ayant déjà été utilisée comme cible de lymphocytes activés contre les mêmes épitopes de MUC-1 que ceux que nous avons choisi (Brossart *et al.*, 1999), elle a été utilisée comme contrôle positif pour tester notre clone. La lignée OVCAR-3, restreinte HLA-A0201 (typage réalisé par l'EFS de Nantes) et exprimant fortement MUC-1 a été utilisée également. Enfin, la lignée ADK-3, non-A2 (marquage avec l'anticorps BB7.2 négatif) a été choisie comme contrôle négatif (figure 28 et tableau 11, page 140).

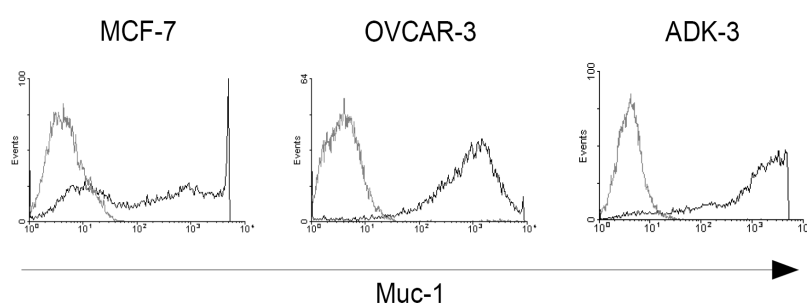


Figure 28: Expression de MUC-1 par les cellules tumorales.

Le marquage MUC-1 a été réalisé à l'aide d'un anticorps capable de reconnaître la protéine MUC-1 (indépendamment de son état de glycosylation). Le marquage réalisé avec l'isotype est représenté en gris foncé, le marquage correspondant à l'anticorps anti-MUC-1 en noir.

Lignée	Expression MUC-1	Restriction
MCF-7	++	HLA-A0201
OVCAR-3	++	HLA-A0201
ADK-3	++	HLA-non A2

Tableau 11: Expression de MUC-1 et restriction HLA des 3 lignées d'adénocarcinome.

7. Activation des clones en présence de cellules tumorales

Les clones 8 et K7.2 ont ensuite été testés sur des cellules tumorales afin de vérifier qu'ils étaient capables de s'activer (figure29, page 141). Les lignées ont été testées suite à un chargement en peptides et sans chargement. Sans chargement en peptides, les lignées ne sont pas reconnues par les clones qui ne s'activent pas (pas de production d'IFN γ). La reconnaissance a été restaurée en pré-incubant les cellules tumorales avec les épitopes contre lesquels les clones ont été isolés.

La lignée ADK3, HLA-non A2, a été utilisée comme contrôle négatif puisque les clones, restreints HLA-A0201, ne sont pas censé être capables de la reconnaître. De façon prévisible, le clone 8 ne s'est pas activé lorsqu'il a été mis en contact de cette lignée (avec ou sans chargement). En revanche, le clone K7.2 a reconnu la lignée ADK3 après que celle-ci ait été incubée avec du peptide.

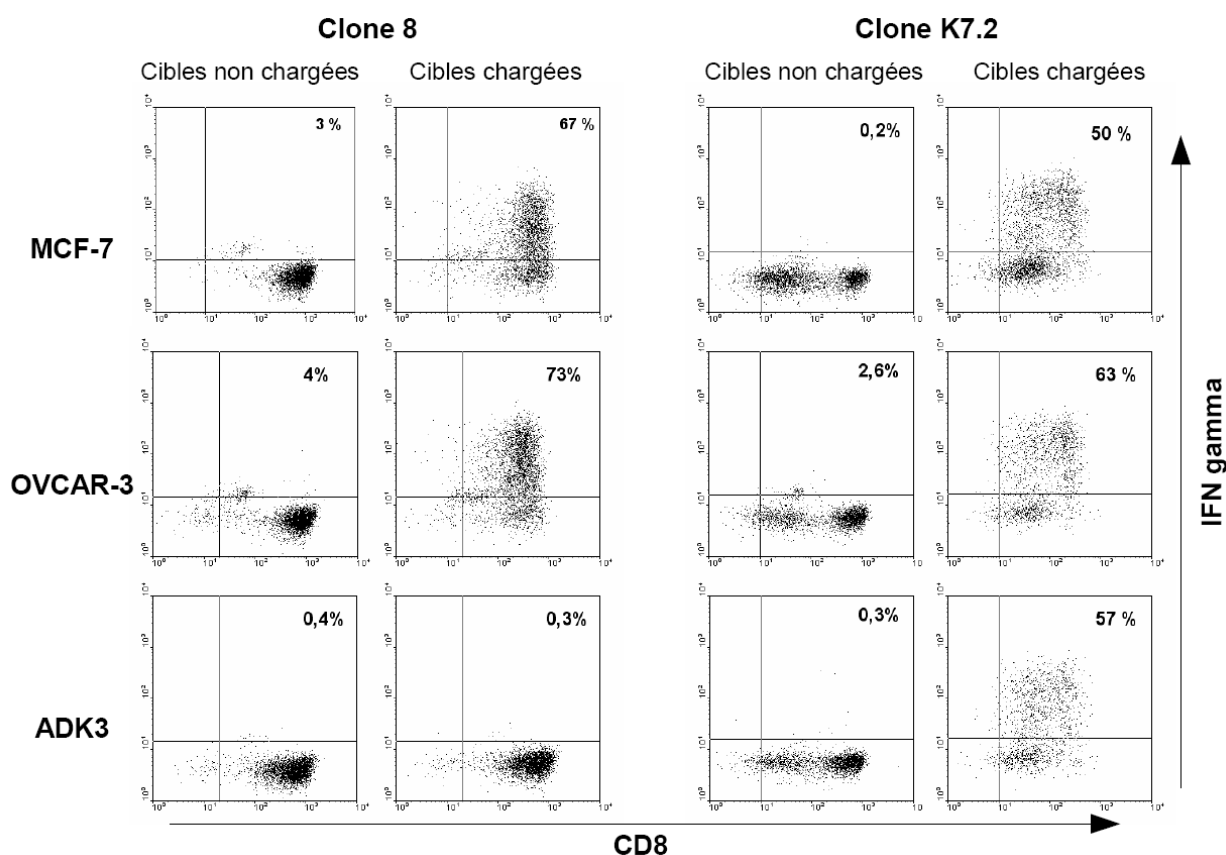


Figure 29 : Test d'activation des clones 8 et K7.2 contre les lignées tumorales.

Les deux clones dirigés contre les épitopes MUC-1₍₁₂₋₂₀₎ et MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎ ont été testés sur deux lignées de cellules tumorales restreintes HLA-A*0201 (MCF-7 et OVCAR-3) et une lignée non-A2 (ADK3). Si les cellules tumorales ne subissent aucun pré-traitement, les clones ne s'activent quasiment pas (colonnes cibles non chargées). En revanche, si les cellules tumorales sont incubées en présence du peptide contre lequel le clone est dirigé, le niveau d'activation du clone est fortement augmenté (colonne cibles chargées), et ce, pour les deux clones. La lignée ADK3, d'haplotype HLA-non-A2, n'est pas reconnue par le clone 8. Le clone K7.2, cependant, a pu la reconnaître suite à un chargement en peptides de cette lignée. Cette expérience a été réalisée une fois.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Plusieurs points restent à éclaircir concernant l'expérience d'activation des clones sur les cellules tumorales.

- **Vérifier que le clone K7.2 s'active bien au contact de la lignée ADK3, non restreinte HLA-A0201.** S'il s'avérait, après avoir refait cette expérience, que le clone K7.2 s'active effectivement sur une lignée non HLA-A0201, il serait intéressant de caractériser l'haplotype

de la lignée ADK3. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'activation de ce clone sur ADK3 :

- (1) Reconnaissance non restreinte au CMH-I d'épitopes de MUC-1 (Barnd *et al.*, 1989; Jerome *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1994). Une altération de la glycosylation de MUC-1 est fréquemment observée dans les cellules tumorales et les motifs de glycosylation ainsi générés peuvent être directement reconnus par des effecteurs du système immunitaire (DC, lymphocytes T) (Aarnoudse *et al.*, 2006). Dans notre cas, cependant, cette hypothèse n'est pas retenue car nous aurions observé une activation du clone sur la lignée ADK3 non chargée (et pas seulement sur la lignée chargée).
- (2) Reconnaissance indépendante du peptide d'une molécule HLA allogénique. Il a été démontré que des clones spécifiques de peptides restreints à un HLA particulier pouvaient reconnaître des molécules HLA allogéniques (Archbold *et al.*, 2008). Le clone K7.2 pourrait lui aussi être capable de reconnaître une molécule HLA allogénique. Mais là encore, le chargement en peptide n'aurait pas été nécessaire pour induire l'activation du clone.
- (3) Reconnaissance d'une molécule HLA allogénique en association avec un peptide. Le peptide STAPPVHNV peut se lier à d'autres molécules HLA (scores SYFPEITHI, tableau 12, page 142) et être présenté dans un contexte autre que HLA-A0201. Le clone K7.2, bien que restreint HLA-A0201, pourrait reconnaître le complexe peptide - molécule du CMH allogénique (Archbold *et al.*, 2008).

Molécule HLA	Score SYFPEITHI
HLA-A01	9
HLA-A03	5
HLA-A1101	16
HLA-A26	14
HLA-A6801	13
HLA-B0702	12
HLA-B1402	7
HLA-B1510	5
HLA-B2705	5
HLA-B270	11
HLA-B37	5
HLA-B3901	10
HLA-B3902	7
HLA-B4402	6
HLA-B4501	6
HLA-B4701	6
HLA-B4901	11
HLA-B5101	10

Tableau 12: Affinité du peptide MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎ pour différentes molécules HLA.

Les molécules ayant obtenu un score inférieur à 5 ne sont pas affichées.

- **La capacité des clones à s'activer seulement en présence des cellules tumorales chargées soulève des questions sur l'apprêtement des épitopes de MUC-1 par ces cellules.**

(1) Les épitopes sont-ils générés par le protéasome et présentés par les cellules tumorales? Nous avons vu qu'un des mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire consistait à ne plus présenter d'épitopes antigéniques à la surface des cellules. Cependant, des populations lymphocytaires spécifiques des épitopes MUC-1₍₁₂₋₂₀₎ et MUC-1₍₉₅₀₋₉₅₈₎ ont déjà démontré leur activité cytotoxique vis-à-vis de la lignée MCF-7, sans chargement préalable en peptide (Brossart *et al.*, 1999). Cette hypothèse ne peut donc pas expliquer nos résultats pour toutes les lignées.

(2) La densité de complexes pCMH présentés à la surface des cellules est-elle suffisante? En fonction de l'avidité des cellules T CD8, celles-ci ont besoin que la densité de complexes pCMH-I à la surface des cellules cibles soit plus ou moins importante, les lymphocytes de faible avidité ayant besoin d'une quantité de complexes plus importante pour s'activer (Chang *et al.*, 2004; McMahan & Slansky, 2007). Les clones ont été obtenus à partir de DC chargées avec des quantités importantes de peptides et il est possible que nous ayons isolé des cellules qui ne s'activent qu'en présence d'une forte quantité de peptides. Des expériences de dilutions de chargements de peptides sur les cellules T2 permettraient de déterminer l'avidité des clones.

Il reste encore à tester ces clones sur le modèle de cancer qui nous intéresse, à savoir, le mésothéliome. Nous avons déjà mis en évidence le fait que les cellules de mésothéliome pouvaient être lysées par des cellules T activées par des DC chargées en cellules tumorales mortes mais nos données n'ont été obtenues que sur une lignée (Ebstein *et al.*, 2004). Le fait d'avoir isolé des clones de lymphocytes T CD8 nous permet d'envisager l'étude d'un nombre plus important de lignées et d'étudier la sensibilité à la lyse médiée par les CTL de ce type de cancer.

D'autres expériences de clonage seront réalisées afin d'obtenir également un clone dirigé contre la MSLN. Plusieurs tentatives ont déjà été réalisées et il semble que le nombre de précurseurs de cellules T CD8 spécifiques de cette protéine chez des donneurs sains soit très faible. C'est ce qui expliquerait que nous n'ayons pas encore réussi à isoler un clone par la technique de dilution limite décrite précédemment. Une technique basée sur l'utilisation de multimères de pCMH-I a été développée au sein de notre laboratoire et permet d'isoler des populations lymphocytaires

faiblement représentées dans le répertoire périphérique (Neveu *et al.*, 2006). Dans la mesure où des réponses humorales ont déjà été détectées contre cet antigène, il est possible que certains patients développent aussi des réponses cellulaires (Ho *et al.*, 2005). Une autre solution consisterait alors à travailler non pas à partir de PBMCs de donneurs sains, mais plutôt de PBMCs de patients atteints d'un cancer exprimant la MSLN.

CONCLUSIONS

L'identification de marqueurs associés au mésothéliome pourrait améliorer les outils diagnostiques disponibles pour ce cancer. Le premier axe de mon travail de thèse a donc porté sur l'identification de protéines spécifiques du mésothéliome. Nos résultats expérimentaux ont démontré que des protéases sont nécessaires au relargage de formes solubles dérivées de la MSLN. Des SMRP étant détectées chez la majorité des patients souffrant de mésothéliome épithélioïde, cette (ou ces) protéase(s) sont très probablement exprimée(s) par la quasi-totalité de ces mésothéliomes épithélioïdes. La mise en évidence de l'implication de protéase(s) dans le relargage de la MSLN ouvre des perspectives pour le diagnostic du mésothéliome car elle donne des pistes pour l'identification de nouveaux marqueurs associables aux SMRP pour améliorer le diagnostic de ce cancer.

Le mésothéliome étant un cancer peu sensible aux traitements conventionnels, des stratégies d'immunothérapie active basées sur l'injection de DC chargées en antigènes tumoraux pourraient représenter une alternative thérapeutique intéressante. Pour cela, il est important d'obtenir des DC matures capables d'activer une réponse anti-tumorale efficace. Dans notre cas, apporter des signaux de danger simultanément à la phagocytose du matériel antigénique par les DC permettrait de stimuler plus efficacement une réponse immune anti-tumorale. Nous avons étudié deux types de stress (sources de signaux de danger) des cellules tumorales avant qu'elles ne soient phagocytées par les DC : choc thermique et infection virale. La seconde, apportant probablement des signaux forts via des protéines de stress (HSP), les acides nucléiques viraux ou encore les IFN de type I, a induit une activation nettement plus importante des DC.

Les protéines MUC-1 et MSLN étant des antigènes associés au mésothéliome, nous avons développé des clones de lymphocytes T CD8 dirigé contre ces antigènes. Nous disposons ainsi d'outils qui nous permettent d'envisager l'étude de la capacité de présentation de ces épitopes sur des molécules du CMH-I par un nombre important de lignées cellulaires de mésothéliome ainsi que leur sensibilité à la lyse médiée par des CTL. De plus, ils nous permettraient également d'évaluer l'efficacité de la réactivation de l'immunité anti-tumorale par les traitements d'immunothérapie envisagés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarnoudse CA, Garcia Vallejo JJ, Saeland E, van Kooyk Y. *Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells* Curr Opin Immunol **2006**,18:105-111.

Abele R, Tampé R. *Function of the transport complex tap in cellular immune recognition*. Biochim Biophys Acta **1999**,1461:405-419.

Adusumilli PS, Chan M, Chun YS, Hezel M, Chou T, Rusch VW, Fong Y. *Cisplatin-induced gadd34 upregulation potentiates oncolytic viral therapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma*. Cancer Biol Ther **2006**,5:48-53.

Adusumilli PS, Chan M, Hezel M, Yu Z, Stiles BM, Chou T, Rusch VW, Fong Y. *Radiation-induced cellular dna damage repair response enhances viral gene therapy efficacy in the treatment of malignant pleural mesothelioma*. Ann Surg Oncol **2007**,14:258-269.

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

Alataş F, Alataş O, Metintaş M, Colak O, Harmanci E, Demir S. *Diagnostic value of cea, ca 15-3, ca 19-9, cyfra 21-1, nse and tsa assay in pleural effusions*. Lung Cancer **2001**,31:9-16.

Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. *Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of cd8+ t cells* Nat Immunol **2001**,2:1010-1017.

Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. *Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and cd36, and cross-present antigens to cytotoxic t lymphocytes* J Exp Med **1998a**,188:1359-1368.

Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class i-restricted ctls* Nature **1998b**,392:86-89.

Almici C, Donnenberg AD, Rizzoli V. *Counterflow centrifugal elutriation: experimental and clinical applications*. J Hematother **1992**,1:279-288.

Amati M, Tomasetti M, Scartozzi M, Mariotti L, Alleva R, Pignotti E, Borghi B, Valentino M, Governa M, Neuzil J, Santarelli L. *Profiling tumor-associated markers for early detection of malignant mesothelioma: an epidemiologic study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **2008**,17:163-170.

Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. *Cytotoxic t cells* J Invest Dermatol **2006**,126:32-41.

Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng K. *High cd46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus*. Cancer Res **2004**,64:4919-4926.

Archbold JK, Ely LK, Kjer-Nielsen L, Burrows SR, Rossjohn J, McCluskey J, Macdonald WA. *T cell allorecognition and mhc restriction--a case of jekyll and hyde?* Mol Immunol **2008**,45:583-598.

Ascoli V, Mecucci C, Knuutila S. *Genetic susceptibility and familial malignant mesothelioma*. Lancet **2001**,357:1804.

Assudani DP, Horton RBV, Mathieu MG, McArdle SEB, Rees RC. *The role of cd4+ t cell help in cancer immunity and the formulation of novel cancer vaccines*. Cancer Immunol Immunother **2007**,56:70-80.

Ault JG, Cole RW, Jensen CG, Jensen LC, Bachert LA, Rieder CL. *Behavior of crocidolite asbestos during mitosis in living vertebrate lung epithelial cells*. Cancer Res **1995**,55:792-798.

Baas P, Boogerd W, Dalesio O, Haringhuizen A, Custers F, van Zandwijk N. *Thalidomide in patients with malignant pleural mesothelioma*. Lung Cancer **2005**,48:291-296.

Bajtay Z, Csomor E, Sandor N, Erdei A. *Expression and role of fc- and complement-receptors on human dendritic cells* Immunol Lett **2006**,104:46-52.

- Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. *Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone b cells to initiate t-independent immune responses* Immunity **2002**,17:341-352.
- Baldini EH. *External beam radiation therapy for the treatment of pleural mesothelioma.* Thorac Surg Clin **2004**,14:543-548.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. *Immunobiology of dendritic cells* Annu Rev Immunol **2000**,18:767-811.
- Barchet W, Cella M, Colonna M. *Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity* Semin Immunol **2005**,17:253-261.
- Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. *Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic t cells.* Proc Natl Acad Sci U S A **1989**,86:7159-7163.
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. *Cd91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin* Immunity **2001**,14:303-313.
- Basu S, Srivastava PK. *Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses.* Cell Stress Chaperones **2000**,5:443-451.
- Baxevas CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, Gritzapis AD, Sotiriadou R, Papamichail M. *Tumor-specific cd4+ t lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic t cells against the autologous tumor.* J Immunol **2000**,164:3902-3912.
- Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Hermine O, Tough DF, Kaveri SV. *Modulation of dendritic cell maturation and function by b lymphocytes* J Immunol **2005**,175:15-20.
- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. *Help for cytotoxic-t-cell responses is mediated by cd40 signalling.* Nature **1998**,393:478-480.
- Berken A, Abel J, Unfried K. *Beta1-integrin mediates asbestos-induced phosphorylation of akt and erk1/2 in a rat pleural mesothelial cell line.* Oncogene **2003**,22:8524-8528.
- Betts GJ, Clarke SL, Richards HE, Godkin AJ, Gallimore AM. *Regulating the immune response to tumours.* Adv Drug Deliv Rev **2006**,58:948-961.
- Beyer M, Schultze JL. *Regulatory t cells in cancer.* Blood **2006**,108:804-811.
- Bianchi C, Bianchi T. *Malignant mesothelioma: global incidence and relationship with asbestos.* Ind Health **2007**,45:379-387.
- Bielefeldt-Ohmann H, Jarnicki AG, Fitzpatrick DR. *Molecular pathobiology and immunology of malignant mesothelioma.* J Pathol **1996**,178:369-378.
- Bocchetta M, Di Resta I, Powers A, Fresco R, Tosolini A, Testa JR, Pass HI, Rizzo P, Carbone M. *Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity.* Proc Natl Acad Sci U S A **2000**,97:10214-10219.
- Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, Charrier S, Ryffel B, Cambi A, Figdor C, Vainchenker W, Galy A, Caignard A, Zitvogel L. *Nk cell activation by dendritic cells (dcs) requires the formation of a synapse leading to il-12 polarization in dcs* Blood **2004**,104:3267-3275.
- Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. *The function of gammadelta t cells in innate immunity.* Curr Opin Immunol **2006**,18:31-38.
- Boutin C, Rey F, Viallat JR. *Prevention of malignant seeding after invasive diagnostic procedures in patients with pleural mesothelioma. a randomized trial of local radiotherapy.* Chest **1995**,108:754-758.
- Brenner J, Sordillo PP, Magill GB, Golbey RB. *Malignant mesothelioma of the pleura: review of 123 patients.* Cancer **1982**,49:2431-2435.
- Brigl M, Brenner MB. *Cd1: antigen presentation and t cell function* Annu Rev Immunol **2004**,22:817-890.

- Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W. *Identification of hla-a2-restricted t-cell epitopes derived from the mucl tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies* Blood **1999**,93:4309-4317.
- Brossart P, Schneider A, Dill P, Schammann T, Grünebach F, Wirths S, Kanz L, Bühring HJ, Brugger W. *The epithelial tumor antigen mucl is expressed in hematological malignancies and is recognized by mucl-specific cytotoxic t-lymphocytes.* Cancer Res **2001**,61:6846-6850.
- Buard A, Vivo C, Monnet I, Boutin C, Pilatte Y, Jaurand MC. *Human malignant mesothelioma cell growth: activation of janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 1alpha for inhibition by interferon-gamma* Cancer Res **1998**,58:840-847.
- Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Boshell M, Gendler S, Duhig T. *A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes.* Int J Cancer **1989**,44:691-696.
- Burchell J, Wang D, Taylor-Papadimitriou J. *Detection of the tumour-associated antigens recognized by the monoclonal antibodies hmfg-1 and 2 in serum from patients with breast cancer.* Int J Cancer **1984**,34:763-768.
- Burnet F. *Cancer- a biological approach* Brit Med J **1957**,I:841-847.
- Burnet FM. *The concept of immunological surveillance* Prog Exp Tumor Res **1970**,13:1-27.
- Byrne MJ, Davidson JA, Musk AW, Dewar J, van Hazel G, Buck M, de Klerk NH, Robinson BW. *Cisplatin and gemcitabine treatment for malignant mesothelioma: a phase ii study.* J Clin Oncol **1999**,17:25-30.
- Caminschi I, Venetsanakos E, Leong CC, Garlepp MJ, Robinson BW, Scott B. *Cytokine gene therapy of mesothelioma. immune and antitumor effects of transfected interleukin-12.* Am J Respir Cell Mol Biol **1999**,21:347-356.
- Caminschi I, Ahmet F, Heger K, Brady J, Nutt SL, Vremec D, Pietersz S, Lahoud MH, Schofield L, Hansen DS, O'Keefe M, Smyth MJ, Bedoui S, Davey GM, Villadangos JA, Heath WR, Shortman K. *Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells.* J Exp Med **2007**,204(11):2579-90.
- Canevari S, Pupa SM, Ménard S. *1975-1995 revised anti-cancer serological response: biological significance and clinical implications.* Ann Oncol **1996**,7:227-232.
- Carbone M, Burck C, Rdzanek M, Rudzinski J, Cutrone R, Bocchetta M. *Different susceptibility of human mesothelial cells to polyomavirus infection and malignant transformation.* Cancer Res **2003a**,63:6125-6129.
- Carbone M, Pass HI, Miele L, Bocchetta M. *New developments about the association of sv40 with human mesothelioma.* Oncogene **2003b**,22:5173-5180.
- Carbone M, Rizzo P, Grimley PM, Procopio A, Mew DJ, Shridhar V, de Bartolomeis A, Esposito V, Giuliano MT, Steinberg SM, Levine AS, Giordano A, Pass HI. *Simian virus-40 large-t antigen binds p53 in human mesotheliomas.* Nat Med **1997**,3:908-912.
- Carmon L, El-Shami KM, Paz A, Pascolo S, Tzehoval E, Tirosh B, Koren R, Feldman M, Fridkin M, Lemonnier FA, Eisenbach L. *Novel breast-tumor-associated mucl-derived peptides: characterization in db-/- x beta2 microglobulin (beta2m) null mice transgenic for a chimeric hla-a2.1/db-beta2 microglobulin single chain.* Int J Cancer **2000**,85:391-397.
- Castagneto B, Zai S, Dongiovanni D, Muzio A, Bretti S, Numico G, Botta M, Sinaccio G. *Cisplatin and gemcitabine in malignant pleural mesothelioma: a phase ii study.* Am J Clin Oncol **2005**,28:223-226.
- Catalano A, Gianni W, Procopio A. *Experimental therapy of malignant mesothelioma: new perspectives from anti-angiogenic treatments.* Crit Rev Oncol Hematol **2004**,50:101-109.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J. *Cd34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to gm-csf+tnf alpha* J Exp Med **1996**,184:695-706.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. *Plasmacytoid monocytes*

migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type i interferon Nat Med **1999**,5:919-923.

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

Chang C, Campoli M, Ferrone S. *Hla class i antigen expression in malignant cells: why does it not always correlate with ctl-mediated lysis?* Curr Opin Immunol **2004**,16:644-650.

Chang C, Ferrone S. *Nk cell activating ligands on human malignant cells: molecular and functional defects and potential clinical relevance.* Semin Cancer Biol **2006**,16:383-392.

Chang K, Pai LH, Batra JK, Pastan I, Willingham MC. *Characterization of the antigen (cak1) recognized by monoclonal antibody k1 present on ovarian cancers and normal mesothelium.* Cancer Res **1992a**,52:181-186.

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

Chang K, Pastan I, Willingham MC. *Isolation and characterization of a monoclonal antibody, k1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium.* Int J Cancer **1992b**,50:373-381.

Chapman SJ, Cookson WOC, Musk AW, Lee YCG. *Benign asbestos pleural diseases.* Curr Opin Pulm Med **2003**,9:266-271.

Chattopadhyay S, Moran RG, Goldman ID. *Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications.* Mol Cancer Ther **2007**,6:404-417.

Chen Y, Shi H, Qin X, Mo W, Liang X, Huang Z, Yang H, Wu C. *Cd4+cd25+ regulatory t lymphocytes in malignant pleural effusion.* Am J Respir Crit Care Med **2005**,172:1434-1439.

Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee WC, Altomare DA, Nobori T, Olopade OI, Buckler AJ, Testa JR. *P16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma.* Cancer Res **1994**,54:5547-5551.

Christmas TI, Manning LS, Davis MR, Robinson BW, Garlepp MJ. *Hla antigen expression and malignant mesothelioma.* Am J Respir Cell Mol Biol **1991**,5:213-220.

Chung Y, Chang W, Kim S, Kang C. *Nkt cell ligand alpha-galactosylceramide blocks the induction of oral tolerance by triggering dendritic cell maturation.* Eur J Immunol **2004**,34:2471-2479.

Cicala C, Pompetti F, Carbone M. *Sv40 induces mesotheliomas in hamsters.* Am J Pathol **1993**,142:1524-1533.

Cioca DP, Deak E, Cioca F, Paunescu V. *Monoclonal antibodies targeted against melanoma and ovarian tumors enhance dendritic cell-mediated cross-presentation of tumor-associated antigens and efficiently cross-prime cd8+ t cells* J Immunother **2006**,29:41-52.

Clark WHJ, Elder DE, Guerry D4, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. *Model predicting survival in stage i melanoma based on tumor progression* J Natl Cancer Inst **1989**,81:1893-1904.

Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. *Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2.* Cancer Res **2007**,67:7458-7466.

Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z. *Induction of heat shock proteins in b-cell exosomes.* J Cell Sci **2005**,118:3631-3638.

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

Conti L, Casetti R, Cardone M, Varano B, Martino A, Belardelli F, Poccia F, Gessani S. *Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta t cells: role of cd86 and inflammatory cytokines.* J Immunol **2005**,174:252-260.

Creaney J, Yeoman D, Naumoff LK, Hof M, Segal A, Musk AW, De Klerk N, Horick N, Skates SJ, Robinson BWS. *Soluble mesothelin in effusions: a useful tool for the diagnosis of malignant mesothelioma.* Thorax

2007,62:569-576.

Croft M. *Co-stimulatory members of the tnfr family: keys to effective t-cell immunity?* Nat Rev Immunol **2003**,3:609-620.

Cugell DW, Kamp DW. *Asbestos and the pleura: a review.* Chest **2004**,125:1103-1117.

Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. *Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive cd4+ and cd8+ t cells* J Immunol **1999**,162:3256-3262.

Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. *Type i ifns provide a third signal to cd8 t cells to stimulate clonal expansion and differentiation* J Immunol **2005**,174:4465-4469.

Dazzi H, Hasleton PS, Thatcher N, Wilkes S, Swindell R, Chatterjee AK. *Malignant pleural mesothelioma and epidermal growth factor receptor (egf-r). relationship of egf-r with histology and survival using fixed paraffin embedded tissue and the f4, monoclonal antibody.* Br J Cancer **1990**,61:924-926.

De Libero G, Mori L. *Recognition of lipid antigens by t cells* Nat Rev Immunol **2005**,5:485-496.

De Libero G, Mori L. *Mechanisms of lipid-antigen generation and presentation to t cells* Trends Immunol **2006**,27:485-492.

De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O, Moser M. *Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo* J Exp Med **1996**,184:1413-1424.

De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. *The activation of human gene mage-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation.* Proc Natl Acad Sci U S A **1996**,93:7149-7153.

Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. *[innate immunity: structure and function of tlr.]* Med Sci (Paris) **2007**,23:67-74.

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

DeLong P, Carroll RG, Henry AC, Tanaka T, Ahmad S, Leibowitz MS, Sterman DH, June CH, Albelda SM, Vonderheide RH. *Regulatory t cells and cytokines in malignant pleural effusions secondary to mesothelioma and carcinoma.* Cancer Biol Ther **2005**,4:342-346.

Dhaene K, Wauters J, Weyn B, Timmermans JP, van Marck E. *Expression profile of telomerase subunits in human pleural mesothelioma.* J Pathol **2000**,190:80-85.

Dhodapkar KM, Krasovsky J, Williamson B, Dhodapkar MV. *Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer t cells by dendritic cells* J Exp Med **2002**,195:125-133.

Dieli F, Caccamo N, Meraviglia S, Ivanyi J, Sireci G, Bonanno CT, Ferlazzo V, La Mendola C, Salerno A. *Reciprocal stimulation of gammadelta t cells and dendritic cells during the anti-mycobacterial immune response.* Eur J Immunol **2004**,34:3227-3235.

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

Dodson RF, Atkinson MAL, Levin JL. *Asbestos fiber length as related to potential pathogenicity: a critical review.* Am J Ind Med **2003**,44:291-297.

Dogan AU, Baris YI, Dogan M, Emri S, Steele I, Elmishad AG, Carbone M. *Genetic predisposition to fiber carcinogenesis causes a mesothelioma epidemic in turkey.* Cancer Res **2006**,66:5063-5068.

Doménech N, Henderson RA, Finn OJ. *Identification of an hla-a11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin.* J Immunol **1995**,155:4766-4774.

- Dong H, Buard A, Renier A, Lévy F, Saint-Etienne L, Jaurand MC. *Role of oxygen derivatives in the cytotoxicity and dna damage produced by asbestos on rat pleural mesothelial cells in vitro.* Carcinogenesis **1994**,15:1251-1255.
- Dong H, Chen L. *B7-h1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity.* J Mol Med **2003**,81:281-287.
- Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. *Tumor-associated b7-h1 promotes t-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion.* Nat Med **2002**,8:793-800.
- Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. *Mechanisms of immune evasion by tumors.* Adv Immunol **2006**,90:51-81.
- Duffy MJ. *Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value?* Clin Chem **2006**,52:345-351.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape* Nat Immunol **2002**,3:991-998.
- Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KCF, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD. *A critical function for type i interferons in cancer immunoediting* Nat Immunol **2005**,6:722-729.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. *The three es of cancer immunoediting* Annu Rev Immunol **2004a**,22:329-360.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting* Immunity **2004b**,21:137-148.
- Eastman Q, Grosschedl R. *Regulation of lef-1/tcf transcription factors by wnt and other signals.* Curr Opin Cell Biol **1999**,11:233-240.
- Ebstein F, Sapede C, Royer P, Marcq M, Ligeza-Poisson C, Barbieux I, Cellerin L, Dabouis G, Grégoire M. *Cytotoxic t cell responses against mesothelioma by apoptotic cell-pulsed dendritic cells.* Am J Respir Crit Care Med **2004**,169:1322-1330.
- Echchakir H, Bagot M, Dorothée G, Martinvalet D, Le Gouvello S, Boumsell L, Chouaib S, Bensussan A, Mami-Chouaib F. *Cutaneous t cell lymphoma reactive cd4+ cytotoxic t lymphocyte clones display a th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis.* J Invest Dermatol **2000**,115:74-80.
- Edwards JG, McLaren J, Jones JL, Waller DA, O'Byrne KJ. *Matrix metalloproteinases 2 and 9 (gelatinases A and B) expression in malignant mesothelioma and benign pleura.* Br J Cancer **2003**,88(10):1553-9.
- Edwards JG, Abrams KR, Leverment JN, Spyt TJ, Waller DA, O'Byrne KJ. *Prognostic factors for malignant mesothelioma in 142 patients: validation of calgb and eortc prognostic scoring systems.* Thorax **2000**,55:731-735.
- Egeblad M, Werb Z. *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.* Nat Rev Cancer **2002**,2:161-174.
- Ehrlich P. *Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung* Ned Tijdschr Geneesk **1909**,5:273-290.
- El Hage F, Abouzahr-Rifai S, Meslin F, Mami-Chouaib F, Chouaib S. *[immune response and cancer]* Bull Cancer **2008**,95:57-67.
- Ellis P, Davies AM, Evans WK, Haynes AE, Lloyd NS. *The use of chemotherapy in patients with advanced malignant pleural mesothelioma: a systematic review and practice guideline.* J Thorac Oncol **2006**,1:591-601.
- Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. *Skin cancers after organ transplantation* N Engl J Med **2003**,348:1681-1691.
- Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, Roncalli M, Nosotti M, Palleschi A, Santambrogio L, Coggi G, Bosari S. *Quantitative evaluation of the apoptosis regulating genes survivin, bcl-2 and bax in inflammatory and malignant pleural lesions.* Lung Cancer **2005**,48:211-216.
- Fan D, Yano S, Shinohara H, Solorzano C, Van Arsdall M, Bucana CD, Pathak S, Kruzel E, Herbst RS, Onn A, Roach JS, Onda M, Wang Q, Pastan I, Fidler IJ. *Targeted therapy against human lung cancer in nude mice by high-affinity recombinant antimesothelin single-chain fv immunotoxin.* Mol Cancer Ther **2002**,1:595-600.
- Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, Fisher LW. *Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in*

colon, breast, prostate, and lung cancer. Clin Cancer Res **2001**,7:4060-4066.

Feng H, Zeng Y, Graner MW, Katsanis E. *Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic t cells.* Blood **2002**,100:4108-4115.

Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. *Human dendritic cells activate resting natural killer (nk) cells and are recognized via the nkp30 receptor by activated nk cells.* J Exp Med **2002**,195:343-351.

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

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

Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barratt-Boyes SM. *Muc-I epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines.* Immunol Rev **1995**,145:61-89.

Fitzpatrick DR, Bielefeldt-Ohmann H, Himbeck RP, Jarnicki AG, Marzo AL, Robinson BW. *Transforming growth factor-beta: antisense rna-mediated inhibition affects anchorage-independent growth, tumorigenicity and tumor-infiltrating t-cells in malignant mesothelioma.* Growth Factors **1994**,11:29-44.

Fitzpatrick DR, Peroni DJ, Bielefeldt-Ohmann H. *The role of growth factors and cytokines in the tumorigenesis and immunobiology of malignant mesothelioma.* Am J Respir Cell Mol Biol **1995**,12:455-460.

Fizazi K, Doubre H, Le Chevalier T, Riviere A, Viala J, Daniel C, Robert L, Barthélemy P, Fandi A, Ruffié P. *Combination of raltitrexed and oxaliplatin is an active regimen in malignant mesothelioma: results of a phase ii study.* J Clin Oncol **2003**,21:349-354.

Foddìs R, De Rienzo A, Broccoli D, Bocchetta M, Stekala E, Rizzo P, Tosolini A, Grobelny JV, Jhanwar SC, Pass HI, Testa JR, Carbone M. *Sv40 infection induces telomerase activity in human mesothelial cells.* Oncogene **2002**,21:1434-1442.

Folkman J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst **1990**,82:4-6.

Fong L, Engleman EG. *Dendritic cells in cancer immunotherapy.* Annu Rev Immunol **2000**,18:245-273.

Fonteneau JF, Larsson M, Somersan S, Sanders C, Munz C, Kwok WW, Bhardwaj N, Jotereau F. *Generation of high quantities of viral and tumor-specific human cd4+ and cd8+ t-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells* J Immunol Methods **2001**,258:111-126.

Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, Bensussan A, Le Bouteiller P. *Cutting edge: soluble hla-g1 triggers cd95/cd95 ligand-mediated apoptosis in activated cd8+ cells by interacting with cd8.* J Immunol **2000**,164:6100-6104.

Frebourg T, Lerebours G, Delpech B, Benhamou D, Bertrand P, Maingonnat C, Boutin C, Nouvet G. *Serum hyaluronate in malignant pleural mesothelioma.* Cancer **1987**,59:2104-2107.

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

Fu X, Parks WC, Heinecke JW. *Activation and silencing of matrix metalloproteinases.* Semin Cell Dev Biol **2008**,19:2-13.

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

Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. *Activation of natural killer t cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined cd4 and cd8 t cell immunity to a coadministered protein.* J Exp Med **2003**,198:267-279.

- Galfy G, Mohammed KA, Dowling PA, Nasreen N, Ward MJ, Antony VB. *Interleukin 8: an autocrine growth factor for malignant mesothelioma.* Cancer Res **1999**,59:367-371.
- Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. *Mhc class i antigens, immune surveillance, and tumor immune escape.* J Cell Physiol **2003**,195:346-355.
- Garland LL, Rankin C, Gandara DR, Rivkin SE, Scott KM, Nagle RB, Klein-Szanto AJP, Testa JR, Altomare DA, Borden EC. *Phase ii study of erlotinib in patients with malignant pleural mesothelioma: a southwest oncology group study.* J Clin Oncol **2007**,25:2406-2413.
- Garlepp MJ, Leong CC. *Biological and immunological aspects of malignant mesothelioma.* Eur Respir J **1995**,8:643-650.
- Gazdar AF, Butel JS, Carbone M. *Sv40 and human tumours: myth, association or causality?* Nat Rev Cancer **2002**,2:957-964.
- Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y. *Self- and nonself-recognition by c-type lectins on dendritic cells* Annu Rev Immunol **2004**,22:33-54.
- Germain RN. *Mhc-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for t lymphocyte activation* Cell **1994**,76:287-299.
- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. *Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells.* J Exp Med **2002**,195:327-333.
- Gilboa E. *The makings of a tumor rejection antigen.* Immunity **1999**,11:263-270.
- Gold DV, Modrak DE, Ying Z, Cardillo TM, Sharkey RM, Goldenberg DM. *New muc1 serum immunoassay differentiates pancreatic cancer from pancreatitis.* J Clin Oncol **2006**,24:252-258.
- Gordon GJ, Appasani K, Parcels JP, Mukhopadhyay NK, Jaklitsch MT, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R. *Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma.* Carcinogenesis **2002**,23:1017-1024.
- Gordon GJ, Mani M, Maulik G, Mukhopadhyay L, Yeap BY, Kindler HL, Salgia R, Sugarbaker DJ, Bueno R. *Preclinical studies of the proteasome inhibitor bortezomib in malignant pleural mesothelioma.* Cancer Chemother Pharmacol **2008**,61:549-558.
- Gordon GJ, Mani M, Mukhopadhyay L, Dong L, Edenfield HR, Glickman JN, Yeap BY, Sugarbaker DJ, Bueno R. *Expression patterns of inhibitor of apoptosis proteins in malignant pleural mesothelioma.* J Pathol **2007**,211:447-454.
- Gorter A, Meri S. *Immune evasion of tumor cells using membrane-bound complement regulatory proteins.* Immunol Today **1999**,20:576-582.
- Gourevitch MM, von Mensdorff-Pouilly S, Litvinov SV, Kenemans P, van Kamp GJ, Verstraeten AA, Hilgers J. *Polymorphic epithelial mucin (muc-1)-containing circulating immune complexes in carcinoma patients.* Br J Cancer **1995**,72:934-938.
- Govindan R, Kratzke RA, Herndon JE2, Niehans GA, Vollmer R, Watson D, Green MR, Kindler HL. *Gefitinib in patients with malignant mesothelioma: a phase ii study by the cancer and leukemia group b.* Clin Cancer Res **2005**,11:2300-2304.
- Grégoire M, Ebstein F. *[immunotherapy and malignant mesothelioma: clinical perspectives]* Bull Cancer **2007**,94:23-31.
- Grigoriu B, Scherpereel A, Devos P, Chahine B, Letourneux M, Lebailly P, Grégoire M, Porte H, Copin M, Lassalle P. *Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment.* Clin Cancer Res **2007**,13:2928-2935.
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. *Tumour-derived soluble mic ligands impair expression of nkg2d and t-cell activation.* Nature **2002**,419:734-738.
- Groothuis TAM, Neeffjes J. *The many roads to cross-presentation* J Exp Med **2005**,202:1313-1318.

- Gross-Goupil M, Ruffié P. [malignant pleural mesothelioma] *Bull Cancer* **1999**,Suppl 3:43-54.
- Guermontprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. *Er-phagosome fusion defines an mhc class i cross-presentation compartment in dendritic cells* *Nature* **2003**,425:397-402.
- Haas GGJ, D'Cruz OJ, De Bault LE. *Distribution of human leukocyte antigen-abc and -d/dr antigens in the unfixed human testis.* *Am J Reprod Immunol Microbiol* **1988**,18:47-51.
- Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer.* *Cell* **2000**,100:57-70.
- Harrison LHJ, Schwarzenberger PO, Byrne PS, Marrogi AJ, Kolls JK, McCarthy KE. *Gene-modified pa1-stk cells home to tumor sites in patients with malignant pleural mesothelioma.* *Ann Thorac Surg* **2000**,70:407-411.
- Harvey P, Clark IM, Jaurand MC, Warn RM, Edwards DR. *Hepatocyte growth factor/scatter factor enhances the invasion of mesothelioma cell lines and the expression of matrix metalloproteinases.* *Br J Cancer* **2000**,83:1147-1153.
- Hassan R, Bera T, Pastan I. *Mesothelin: a new target for immunotherapy.* *Clin Cancer Res* **2004**,10:3937-3942.
- Hassan R, Ebel W, Routhier EL, Patel R, Kline JB, Zhang J, Chao Q, Jacob S, Turchin H, Gibbs L, Phillips MD, Mudali S, Iacobuzio-Donahue C, Jaffee EM, Moreno M, Pastan I, Sass PM, Nicolaides NC, Grasso L. *Preclinical evaluation of morab-009, a chimeric antibody targeting tumor-associated mesothelin.* *Cancer Immun* **2007**,7:20.
- Hassan R, Ho M. *Mesothelin targeted cancer immunotherapy.* *Eur J Cancer* **2008**,44:46-53.
- Hassan R, Lerner MR, Benbrook D, Lightfoot SA, Brackett DJ, Wang Q, Pastan I. *Antitumor activity of ss(dsfv)pe38 and ss1(dsfv)pe38, recombinant antimesothelin immunotoxins against human gynecologic cancers grown in organotypic culture in vitro.* *Clin Cancer Res* **2002**,8:3520-3526.
- Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, Zhang J, Cox DD, Pingpank J, Alexander R, Willingham M, Pastan I, Onda M. *Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer.* *Clin Cancer Res* **2006**,12:447-453.
- Hava DL, Brigl M, van den Elzen P, Zajonc DM, Wilson IA, Brenner MB. *Cd1 assembly and the formation of cd1-antigen complexes* *Curr Opin Immunol* **2005**,17:88-94.
- Hedman M, Arnberg H, Wernlund J, Riska H, Brodin O. *Tissue polypeptide antigen (tpa), hyaluronan and ca 125 as serum markers in malignant mesothelioma.* *Anticancer Res* **2003**,23:531-536.
- Hegmans JPJJ, Hemmes A, Aerts JG, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. *Immunotherapy of murine malignant mesothelioma using tumor lysate-pulsed dendritic cells.* *Am J Respir Crit Care Med* **2005**,171:1168-1177.
- Hegmans JPJJ, Hemmes A, Hammad H, Boon L, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. *Mesothelioma environment comprises cytokines and t-regulatory cells that suppress immune responses.* *Eur Respir J* **2006**,27:1086-1095.
- Hellstrom I, Raycraft J, Kanan S, Sardesai NY, Verch T, Yang Y, Hellstrom KE. *Mesothelin variant 1 is released from tumor cells as a diagnostic marker.* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**,15:1014-1020.
- Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, Salio M, Mathew B, Ritter G, Schmidt R, Harris AL, Old L, Cerundolo V. *Nkt cells enhance cd4+ and cd8+ t cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells.* *J Immunol* **2003**,171:5140-5147.
- Heukamp LC, van der Burg SH, Drijfhout JW, Melief CJ, Taylor-Papadimitriou J, Offringa R. *Identification of three non-vntr muc1-derived hla-a*0201-restricted t-cell epitopes that induce protective anti-tumor immunity in hla-a2/k(b)-transgenic mice.* *Int J Cancer* **2001**,91:385-392.
- Hiraki A, Aoe K, Murakami T, Nakamura Y, Yamazaki K, Sueoka N, Taguchi K, Kamei T, Maeda T, Takeyama H, Kishimoto T, Nishimura M, Sugi K. *Clinical significance of the expression of tumor-associated antigen, rcas1, and its soluble protein in pleural fluid in malignant mesothelioma.* *Oncol Rep* **2005**,14:357-362.
- Hirao T, Bueno R, Chen C, Gordon GJ, Heilig E, Kelsey KT. *Alterations of the p16(ink4) locus in human malignant mesothelial tumors.* *Carcinogenesis* **2002**,23:1127-1130.

- Hirst CE, Buzza MS, Bird CH, Warren HS, Cameron PU, Zhang M, Ashton-Rickardt PG, Bird PI. *The intracellular granzyme b inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances ctl potency.* J Immunol **2003**,170:805-815.
- Hirvonen A, Pelin K, Tammilehto L, Karjalainen A, Mattson K, Linnainmaa K. *Inherited gstm1 and nat2 defects as concurrent risk modifiers in asbestos-related human malignant mesothelioma.* Cancer Res **1995**,55:2981-2983.
- Hirvonen A, Saarikoski ST, Linnainmaa K, Koskinen K, Husgafvel-Pursiainen K, Mattson K, Vainio H. *Glutathione s-transferase and n-acetyltransferase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders.* J Natl Cancer Inst **1996**,88:1853-1856.
- Ho M, Hassan R, Zhang J, Wang Q, Onda M, Bera T, Pastan I. *Humoral immune response to mesothelin in mesothelioma and ovarian cancer patients.* Clin Cancer Res **2005**,11:3814-3820.
- Hoffmann TK, Nakano K, Elder EM, Dworacki G, Finkelstein SD, Appella E, Whiteside TL, DeLeo AB. *Generation of t cells specific for the wild-type sequence p53(264-272) peptide in cancer patients: implications for immunoselection of epitope loss variants.* J Immunol **2000**,165:5938-5944.
- Hollenbeak CS, Todd MM, Billingsley EM, Harper G, Dyer A, Lengerich EJ. *Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients* Cancer **2005**,104:1962-1967.
- Hung C, Calizo R, Tsai Y, He L, Wu T. *A dna vaccine encoding a single-chain trimer of hla-a2 linked to human mesothelin peptide generates anti-tumor effects against human mesothelin-expressing tumors.* Vaccine **2007**,25:127-135.
- Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. *The central role of cd4(+) t cells in the antitumor immune response.* J Exp Med **1998**,188:2357-2368.
- Huovila AJ, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Kärkkäinen I, Ortiz RM. *Shedding light on adam metalloproteinases.* Trends Biochem Sci **2005**,30:413-422.
- IARC-1. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol 42: Silica and Some Silicates. Lyon:International Agency for Research on Cancer, **1987**.
- IARC-2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Supplement no. 7: Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1-42. Lyon:International Agency for Research on Cancer, **1987**.
- Igney FH, Krammer PH. *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.* Nat Rev Cancer **2002**,2:277-288.
- Igney FH, Krammer PH. *Tumor counterattack: fact or fiction?* Cancer Immunol Immunother **2005**,54:1127-1136.
- Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. *The roles of ifn gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting* Cytokine Growth Factor Rev **2002**,13:95-109.
- Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF. *Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers.* Proc Natl Acad Sci U S A **1997**,94:10330-10334.
- Inaba K, Inaba M. *Antigen recognition and presentation by dendritic cells* Int J Hematol **2005**,81:181-187.
- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. *Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma* Cancer **2000**,88:577-583.
- Jaffee EM, Hruban RH, Biedrzycki B, Laheru D, Schepers K, Sauter PR, Goemann M, Coleman J, Grochow L, Donehower RC, Lillemoe KD, O'Reilly S, Abrams RA, Pardoll DM, Cameron JL, Yeo CJ. *Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase i trial of safety and immune activation.* J Clin Oncol **2001**,19:145-156.
- Jäger E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, Arand M, Karbach J, Jäger D, Oesch F, Knuth A. *Immunoselection in vivo: independent loss of mhc class i and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma.* Int J Cancer **1997**,71:142-147.
- Janeway CAJ. *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self* Immunol

Today **1992**,13:11-16.

Janeway_Ch Charles_A._Jr._and_Travers_Paul1997 Janeway Charles A. Jr. and Travers Paul: *Immunobiologie.* ; 1997.

Jasani B, Cristaudo A, Emri SA, Gazdar AF, Gibbs A, Krynska B, Miller C, Mutti L, Radu C, Tognon M, Procopio A. *Association of sv40 with human tumours.* Semin Cancer Biol **2001**,11:49-61.

Jaurand M. *Mesothelioma pathogenesis, facts and expectations.* Pathol Biol (Paris) **2005**,53:41-44.

Jaurand MC. *Mechanisms of fiber-induced genotoxicity.* Environ Health Perspect **1997**,105 Suppl 5:1073-1084.

Jego G, Palucka AK, Blanck J, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. *Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type i interferon and interleukin 6* Immunity **2003**,19:225-234.

Jerome KR, Domenech N, Finn OJ. *Tumor-specific cytotoxic t cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize ebv-immortalized b cells transfected with polymorphic epithelial mucin complementary dna.* J Immunol **1993**,151:1654-1662.

Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. *Critical role of mhc class i-related chain a and b expression on ifn-alpha-stimulated dendritic cells in nk cell activation: impairment in chronic hepatitis c virus infection.* J Immunol **2003**,170:1249-1256.

Ju ST, Cui H, Panka DJ, Ettinger R, Marshak-Rothstein A. *Participation of target fas protein in apoptosis pathway induced by cd4+ th1 and cd8+ cytotoxic t cells.* Proc Natl Acad Sci U S A **1994**,91:4185-4189.

Juriansz K, Ziegler S, Garcia-Schüler H, Kraus S, Bohana-Kashtan O, Fishelson Z, Kirschfink M. *Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms.* Mol Immunol **1999**,36:929-939.

Kabawat SE, Bast RCJ, Bhan AK, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB. *Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody oc125.* Int J Gynecol Pathol **1983**,2:275-285.

Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal* Immunol Today **1999**,20:561-567.

Kalmadi SR, Rankin C, Kraut MJ, Jacobs AD, Petrylak DP, Adelstein DJ, Keohan ML, Taub RN, Borden EC. *Gemcitabine and cisplatin in unresectable malignant mesothelioma of the pleura: a phase ii study of the southwest oncology group (swog 9810).* Lung Cancer **2007**,:.

Kamp DW, Graceffa P, Pryor WA, Weitzman SA. *The role of free radicals in asbestos-induced diseases.* Free Radic Biol Med **1992**,12:293-315.

Kast WM, Melief CJ. *In vivo efficacy of virus-derived peptides and virus-specific cytotoxic t lymphocytes.* Immunol Lett **1991**,30:229-232.

Kast WM, Offringa R, Peters PJ, Voordouw AC, Meloen RH, van der Eb AJ, Melief CJ. *Eradication of adenovirus el-induced tumors by el1a-specific cytotoxic t lymphocytes.* Cell **1989**,59:603-614.

Kawai T, Akira S. *Innate immune recognition of viral infection.* Nat Immunol **2006**,7:131-137.

Kim R, Emi M, Tanabe K. *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape.* Immunology **2007**,121:1-14.

Kindler HL. *Moving beyond chemotherapy: novel cytostatic agents for malignant mesothelioma.* Lung Cancer **2004**,45 Suppl 1:S125-7.

Klarnet JP, Kern DE, Okuno K, Holt C, Lilly F, Greenberg PD. *Fbl-reactive cd8+ cytotoxic and cd4+ helper t lymphocytes recognize distinct friend murine leukemia virus-encoded antigens.* J Exp Med **1989**,169:457-467.

Kleinberg L, Flørenes VA, Skrede M, Dong HP, Nielsen S, McMaster MT, Nesland JM, Shih I, Davidson B. *Expression of hla-g in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma.* Virchows Arch **2006**,449:31-39.

- Kleinberg L, Lie AK, Flørenes VA, Nesland JM, Davidson B. *Expression of inhibitor-of-apoptosis protein family members in malignant mesothelioma*. Hum Pathol **2007**,38:986-994.
- Kotera Y, Fontenot JD, Pecher G, Metzgar RS, Finn OJ. *Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin muc-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients*. Cancer Res **1994**,54:2856-2860.
- Krammer PH. *Cd95's deadly mission in the immune system* Nature **2000**,407:789-795.
- Kroczek RA, Mages HW, Hutloff A. *Emerging paradigms of t-cell co-stimulation*. Curr Opin Immunol **2004**,16:321-327.
- Kumaki F, Kawai T, Churg A, Galateau-Sallé FB, Hasleton P, Henderson D, Roggli V, Travis WD, Cagle PT, Ferrans VJ. *Expression of telomerase reverse transcriptase (tert) in malignant mesotheliomas*. Am J Surg Pathol **2002**,26:365-370.
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of th1, th2 and nonpolarized t cells* Nat Immunol **2000**,1:311-316.
- Langerak AW, De Laat PA, Van Der Linden-Van Beurden CA, Delahaye M, Van Der Kwast TH, Hoogsteden HC, Benner R, Versnel MA. *Expression of platelet-derived growth factor (pdgf) and pdgf receptors in human malignant mesothelioma in vitro and in vivo*. J Pathol **1996**,178:151-160.
- Lanuti M, Gao GP, Force SD, Chang MY, El Kouri C, Amin KM, Hughes JV, Wilson JM, Kaiser LR, Albelda SM. *Evaluation of an ele4-deleted adenovirus expressing the herpes simplex thymidine kinase suicide gene in cancer gene therapy*. Hum Gene Ther **1999**,10:463-475.
- Le Bon A, Tough DF. *Type i interferon as a stimulus for cross-priming*. Cytokine Growth Factor Rev **2008**,19:33-40.
- Lechner JF, Tokiwa T, LaVeck M, Benedict WF, Banks-Schlegel S, Yeager HJ, Banerjee A, Harris CC. *Asbestos-associated chromosomal changes in human mesothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A **1985**,82:3884-3888.
- Lee AY, He B, You L, Dadfarmay S, Xu Z, Mazieres J, Mikami I, McCormick F, Jablons DM. *Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma*. Oncogene **2004**,23:6672-6676.
- Lee TC, Zhang Y, Aston C, Hintz R, Jagirdar J, Perle MA, Burt M, Rom WN. *Normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines express insulin-like growth factor i and associated molecules*. Cancer Res **1993**,53:2858-2864.
- Lee YC, Knox BS, Garrett JE. *Use of cytokeratin fragments 19.1 and 19.21 (cyfra 21-1) in the differentiation of malignant and benign pleural effusions*. Aust N Z J Med **1999**,29:765-769.
- Leithner K, Leithner A, Clar H, Weinhaeusel A, Radl R, Krippel P, Rehak P, Windhager R, Haas OA, Olschewski H. *Mesothelioma mortality in europe: impact of asbestos consumption and simian virus 40*. Orphanet J Rare Dis **2006**,1:44.
- Leong CC, Marley JV, Loh S, Robinson BW, Garlepp MJ. *The induction of immune responses to murine malignant mesothelioma by il-2 gene transfer*. Immunol Cell Biol **1997**,75:356-359.
- Leslie DS, Vincent MS, Spada FM, Das H, Sugita M, Morita CT, Brenner MB. *Cd1-mediated gamma/delta t cell maturation of dendritic cells*. J Exp Med **2002**,196:1575-1584.
- Li Q, Verschraegen CF, Mendoza J, Hassan R. *Cytotoxic activity of the recombinant anti-mesothelin immunotoxin, ss1(dsfv)pe38, towards tumor cell lines established from ascites of patients with peritoneal mesotheliomas*. Anticancer Res **2004**,24:1327-1335.
- Li Q, Yano S, Ogino H, Wang W, Uehara H, Nishioka Y, Sone S. *The therapeutic efficacy of anti vascular endothelial growth factor antibody, bevacizumab, and pemetrexed against orthotopically implanted human pleural mesothelioma cells in severe combined immunodeficient mice*. Clin Cancer Res **2007**,13:5918-5925.
- Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. *Dcs induce cd40-independent immunoglobulin class switching through blys and april* Nat Immunol **2002**,3:822-829.

- Liu Y. *Ipc: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors* Annu Rev Immunol **2005**,23:275-306.
- Liu YJ. *Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity* Cell **2001**,106:259-262.
- Liu Z, Ivanoff A, Klominek J. *Expression and activity of matrix metalloproteases in human malignant mesothelioma cell lines.* Int J Cancer **2001**,91:638-643.
- López-Ríos F, Illei PB, Rusch V, Ladanyi M. *Evidence against a role for sv40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive pcr results owing to presence of sv40 sequences in common laboratory plasmids.* Lancet **2004**,364:1157-1166.
- Lou Y, Liu C, Kim GJ, Liu Y, Hwu P, Wang G. *Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses* J Immunol **2007**,178:1534-1541.
- Lu B, Finn OJ. *T-cell death and cancer immune tolerance.* Cell Death Differ **2008**,15:70-79.
- MacLennan I, Vinuesa C. *Dendritic cells, baff, and april: innate players in adaptive antibody responses* Immunity **2002**,17:235-238.
- Macor P, Tedesco F. *Complement as effector system in cancer immunotherapy.* Immunol Lett **2007**,111:6-13.
- Mahnke K, Knop J, Enk AH. *Induction of tolerogenic dcs: 'you are what you eat'* Trends Immunol **2003**,24:646-651.
- Malmberg K, Ljunggren H. *Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance.* Semin Cancer Biol **2006**,16:16-31.
- Manning LS, Whitaker D, Murch AR, Garlepp MJ, Davis MR, Musk AW, Robinson BW. *Establishment and characterization of five human malignant mesothelioma cell lines derived from pleural effusions.* Int J Cancer **1991**,47:285-290.
- Marcenaro E, Della Chiesa M, Bellora F, Parolini S, Millo R, Moretta L, Moretta A. *Il-12 or il-4 prime human nk cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors.* J Immunol **2005**,174:3992-3998.
- Marzo AL, Fitzpatrick DR, Robinson BW, Scott B. *Antisense oligonucleotides specific for transforming growth factor beta2 inhibit the growth of malignant mesothelioma both in vitro and in vivo.* Cancer Res **1997**,57:3200-3207.
- Masood R, Kundra A, Zhu S, Xia G, Scalia P, Smith DL, Gill PS. *Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the vegf and vegf-c autocrine loops.* Int J Cancer **2003**,104:603-610.
- Mathy A, Baas P, Dalesio O, van Zandwijk N. *Limited efficacy of imatinib mesylate in malignant mesothelioma: a phase ii trial.* Lung Cancer **2005**,50:83-86.
- Matzinger P. *Tolerance, danger, and the extended family* Annu Rev Immunol **1994**,12:991-1045.
- Matzinger P. *The danger model: a renewed sense of self* Science **2002**,296:301-305.
- May RJ, Dao T, Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T, Zakhaleva V, Zhang RH, Maslak P, Scheinberg DA. *Peptide epitopes from the wilms' tumor 1 oncoprotein stimulate cd4+ and cd8+ t cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells.* Clin Cancer Res **2007**,13:4547-4555.
- Maziak DE, Gagliardi A, Haynes AE, Mackay JA, Evans WK. *Surgical management of malignant pleural mesothelioma: a systematic review and evidence summary.* Lung Cancer **2005**,48:157-169.
- McMahan RH, Slansky JE. *Mobilizing the low-avidity t cell repertoire to kill tumors.* Semin Cancer Biol **2007**,17:317-329.
- Medema JP, de Jong J, Peltenburg LT, Verdegaal EM, Gorter A, Bres SA, Franken KL, Hahne M, Albar JP, Melief CJ, Offringa R. *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 **2001**,98:11515-11520.

- Medzhitov R. *Recognition of microorganisms and activation of the immune response.* Nature **2007**,449:819-826.
- Medzhitov R, Janeway CAJ. *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system* Science **2002**,296:298-300.
- Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, Popescu F, Xiao Z. *Signals required for programming effector and memory development by cd8+ t cells* Immunol Rev **2006**,211:81-92.
- Metintas S, Metintas M, Ucgun I, Oner U. *Malignant mesothelioma due to environmental exposure to asbestos: follow-up of a turkish cohort living in a rural area.* Chest **2002**,122:2224-2229.
- Miéoudougé M, Rouzaud P, Salama G, Pujazon MC, Vincent C, Mauduyt MA, Reyre J, Carles P, Serre G. *Evaluation of seven tumour markers in pleural fluid for the diagnosis of malignant effusions.* Br J Cancer **1999**,81:1059-1065.
- Milazzo C, Reichardt VL, Müller MR, Grünebach F, Brossart P. *Induction of myeloma-specific cytotoxic t cells using dendritic cells transfected with tumor-derived rna.* Blood **2003**,101:977-982.
- Miralles C, Orea M, España P, Provencio M, Sánchez A, Cantos B, Cubedo R, Carcereny E, Bonilla F, Gea T. *Cancer antigen 125 associated with multiple benign and malignant pathologies.* Ann Surg Oncol **2003**,10:150-154.
- Mohr S, Rihn B. *[gene expression profiling in human mesothelioma cells using dna microarray and high-density filter array technologies]* Bull Cancer **2001**,88:305-313.
- Molldrem JJ, Lee PP, Kant S, Wieder E, Jiang W, Lu S, Wang C, Davis MM. *Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific t cells.* J Clin Invest **2003**,111:639-647.
- Montanaro F, Bray F, Gennaro V, Merler E, Tyczynski JE, Parkin DM, Strnad M, Jechov'a M, Storm HH, Aareleid T, Hakulinen T, Velten M, Lef'evre H, Danzon A, Buemi A, Daur'es J, Ménégos F, Raverdy N, Sauvage M, Ziegler H, Comber H, Paci E, Vercelli M, De Lisi V, Tumino R, Zanetti R, Berrino F, Stanta G, Langmark F, Rachtan J, Mezyk R, Blaszczyk J, Ivan P, Primic-Zakelj M, Martínez AC, Izarzugaza I, Borràs J, Garcia CM, Garau I, Sánchez NC, Aicua A, Barlow L, Torhorst J, Bouchardy C, Levi F, Fisch T, Probst N, Visser O, Quinn M, Gavin A, Brewster D, Mikov M. *Pleural mesothelioma incidence in europe: evidence of some deceleration in the increasing trends.* Cancer Causes Control **2003**,14:791-803.
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Zahorchak AF, Logar AJ, Papworth GD, Wang Z, Watkins SC, Falo LDJ, Thomson AW. *Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production* Blood **2003**,101:611-620.
- Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, Moretta A. *Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions.* Immunol Rev **2006**,214:219-228.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. *Activation of beta-catenin-tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or apc.* Science **1997**,275:1787-1790.
- Mottet C, Golshayan D. *Cd4+cd25+foxp3+ regulatory t cells: from basic research to potential therapeutic use.* Swiss Med Wkly **2007**,137:625-634.
- Mukherjee S, Haenel T, Himbeck R, Scott B, Ramshaw I, Lake RA, Harnett G, Phillips P, Morey S, Smith D, Davidson JA, Musk AW, Robinson B. *Replication-restricted vaccinia as a cytokine gene therapy vector in cancer: persistent transgene expression despite antibody generation.* Cancer Gene Ther **2000**,7:663-670.
- Muminova ZE, Strong TV, Shaw DR. *Characterization of human mesothelin transcripts in ovarian and pancreatic cancer.* BMC Cancer **2004**,4:19.
- Mutsaers SE. *The mesothelial cell.* Int J Biochem Cell Biol **2004**,36:9-16.
- Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. *The ubiquitin-proteasome system.* J Biosci **2006**,31:137-155.
- Nauta AJ, Castellano G, Xu W, Woltman AM, Borrias MC, Daha MR, van Kooten C, Roos A. *Opsonization with c1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells* J Immunol **2004**,173:3044-3050.
- Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. *Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions* Nature **2005**,434:83-88.

- Nelson DJ, Robinson BWS, Allan J, van der Most R. *Gene therapy of mesothelioma*. Expert Opin Biol Ther **2005**,5:1039-1049.
- Neragi-Miandoab S. *Multimodality approach in management of malignant pleural mesothelioma*. Eur J Cardiothorac Surg **2006**,29:14-19.
- Neri M, Filiberti R, Taioli E, Garte S, Paracchini V, Bolognesi C, Canessa PA, Fontana V, Ivaldi GP, Verna A, Bonassi S, Puntoni R. *Pleural malignant mesothelioma, genetic susceptibility and asbestos exposure*. Mutat Res **2005**,592:36-44.
- Neveu B, Echasserieau K, Hill T, Kuus-Reichel K, Houssaint E, Bonneville M, Saulquin X. *Impact of cd8-mhc class i interaction in detection and sorting efficiencies of antigen-specific t cells using mhc class i/peptide multimers: contribution of pmhc valency*. Int Immunol **2006**,18:1139-1145.
- Nguyen DM, Schrump WD, Chen GA, Tsai W, Nguyen P, Trepel JB, Schrump DS. *Abrogation of p21 expression by flavopiridol enhances depsiptide-mediated apoptosis in malignant pleural mesothelioma cells*. Clin Cancer Res **2004**,10:1813-1825.
- Nicholas TW, Read SB, Burrows FJ, Kruse CA. *Suicide gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects*. Histol Histopathol **2003**,18:495-507.
- Nishioka Y, Nishimura N, Suzuki Y, Sone S. *Human monocyte-derived and cd83(+) blood dendritic cells enhance nk cell-mediated cytotoxicity*. Eur J Immunol **2001**,31:2633-2641.
- Nowak AK, Lake RA, Kindler HL, Robinson BWS. *New approaches for mesothelioma: biologics, vaccines, gene therapy, and other novel agents*. Semin Oncol **2002**,29:82-96.
- O'Kane SL, Pound RJ, Campbell A, Chaudhuri N, Lind MJ, Cawkwell L. *Expression of bcl-2 family members in malignant pleural mesothelioma*. Acta Oncol **2006**,45:449-453.
- O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. *Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer*. Blood **2004**,104:2235-2246.
- Obasaju CK, Ye Z, Wozniak AJ, Belani CP, Keohan M, Ross HJ, Polikoff JA, Mintzer DM, Monberg MJ, Jänne PA. *Single-arm, open label study of pemetrexed plus cisplatin in chemotherapy naïve patients with malignant pleural mesothelioma: outcomes of an expanded access program*. Lung Cancer **2007**,55:187-194.
- Ohnmacht GA, Wang E, Mocellin S, Abati A, Filie A, Fetsch P, Riker AI, Kammula US, Rosenberg SA, Marincola FM. *Short-term kinetics of tumor antigen expression in response to vaccination*. J Immunol **2001**,167:1809-1820.
- Onda M, Willingham M, Nagata S, Bera TK, Beers R, Ho M, Hassan R, Kreitman RJ, Pastan I. *New monoclonal antibodies to mesothelin useful for immunohistochemistry, fluorescence-activated cell sorting, western blotting, and elisa*. Clin Cancer Res **2005**,11:5840-5846.
- Ordóñez NG. *Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesotheliomas: a critical review of old markers, new markers*. Hum Pathol **2002**,33:953-967.
- Ordóñez NG. *What are the current best immunohistochemical markers for the diagnosis of epithelioid mesothelioma? a review and update*. Hum Pathol **2007**,38:1-16.
- Paganuzzi M, Onetto M, Marroni P, Filiberti R, Tassara E, Parodi S, Felletti R. *Diagnostic value of cyfra 21-1 tumor marker and cea in pleural effusion due to mesothelioma*. Chest **2001**,119:1138-1142.
- Palucka AK, Ueno H, Fay JW, Banchereau J. *Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells*. Immunol Rev **2007**,220:129-150.
- Palucka K, Banchereau J. *Linking innate and adaptive immunity*. Nat Med **1999**,5:868-870.
- Pan LN, Lu J, Huang B. *Hdac inhibitors: a potential new category of anti-tumor agents*. Cell Mol Immunol **2007**,4:337-343.
- Parato KA, Senger D, Forsyth PAJ, Bell JC. *Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours*.

Nat Rev Cancer **2005**,5:965-976.

Pass HI, Lott D, Lonardo F, Harbut M, Liu Z, Tang N, Carbone M, Webb C, Wali A. *Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels.* N Engl J Med **2005**,353:1564-1573.

Pass HI, Stevens EJ, Oie H, Tsokos MG, Abati AD, Fetsch PA, Mew DJ, Pogrebniak HW, Matthews WJ. *Characteristics of nine newly derived mesothelioma cell lines.* Ann Thorac Surg **1995**,59:835-844.

Pass HI, Wali A, Tang N, Ivanova A, Ivanov S, Harbut M, Carbone M, Allard J. *Soluble mesothelin-related peptide level elevation in mesothelioma serum and pleural effusions.* Ann Thorac Surg **2008**,85:265-72; discussion 272.

Paulsson K, Wang P. *Chaperones and folding of mhc class i molecules in the endoplasmic reticulum.* Biochim Biophys Acta **2003**,1641:1-12.

Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. *Scavenger receptors in innate immunity* Curr Opin Immunol **2002**,14:123-128.

Pelucchi C, Malvezzi M, La Vecchia C, Levi F, Decarli A, Negri E. *The mesothelioma epidemic in western europe: an update.* Br J Cancer **2004**,90:1022-1024.

Penna G, Sozzani S, Adorini L. *Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells* J Immunol **2001**,167:1862-1866.

Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. *Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells.* Hum Immunol **2002**,63:1164-1171.

Perkins GL, Slater ED, Sanders GK, Prichard JG. *Serum tumor markers.* Am Fam Physician **2003**,68:1075-1082.

Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E. *The european mesothelioma epidemic.* Br J Cancer **1999**,79:666-672.

Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. *Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells.* J Exp Med **2002**,195:335-341.

Pichlmair A, Reis e Sousa C. *Innate recognition of viruses.* Immunity **2007**,27:370-383.

Pilatte Y, Vivo C, Renier A, Kheuang L, Greffard A, Jaurand MC. *Absence of sv40 large t-antigen expression in human mesothelioma cell lines.* Am J Respir Cell Mol Biol **2000**,23:788-793.

Plata F, Langlade-Demoyen P, Abastado JP, Berbar T, Kourilsky P. *Retrovirus antigens recognized by cytolytic t lymphocytes activate tumor rejection in vivo.* Cell **1987**,48:231-240.

Posadas EM, Simpkins F, Liotta LA, MacDonald C, Kohn EC. *Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer--realistic hope?* Ann Oncol **2005**,16:16-22.

Powell A, Creaney J, Broomfield S, Van Bruggen I, Robinson B. *Recombinant gm-csf plus autologous tumor cells as a vaccine for patients with mesothelioma.* Lung Cancer **2006**,52:189-197.

Pretlow TG2, Pretlow TP. *Centrifugal elutriation (counterstreaming centrifugation) of cells.* Cell Biophys **1979**,1:195-210.

Rabik CA, Dolan ME. *Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents.* Cancer Treat Rev **2007**,33:9-23.

Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. *Syfeithi: database for mhc ligands and peptide motifs.* Immunogenetics **1999**,50:213-219.

Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. *Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels* Nat Rev Immunol **2005**,5:617-628.

Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S, Lutz MB, Layton GT, Rainer C, Senior RM, Shipley JM, Fritsch P, Schuler G, Romani N. *Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin* J Immunol **2002**,168:4361-4371.

- Raulet DH. *Roles of the nkg2d immunoreceptor and its ligands* Nat Rev Immunol **2003**,3:781-790.
- Reis e Sousa C. *Dendritic cells in a mature age* Nat Rev Immunol **2006**,6:476-483.
- Reshing ME, Sette A, Brandt RM, Ruppert J, Wentworth PA, Hartman M, Oseroff C, Grey HM, Melief CJ, Kast WM. *Human ctl epitopes encoded by human papillomavirus type 16 e6 and e7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of hla-a*0201-binding peptides.* J Immunol **1995**,154:5934-5943.
- Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a cd4+ t-helper and a t-killer cell.* Nature **1998**,393:474-478.
- Riedl SJ, Shi Y. *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis.* Nat Rev Mol Cell Biol **2004**,5:897-907.
- Riker A, Cormier J, Panelli M, Kammula U, Wang E, Abati A, Fetsch P, Lee KH, Steinberg S, Rosenberg S, Marincola F. *Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma.* Surgery **1999**,126:112-120.
- Rippo MR, Moretti S, Vescovi S, Tomasetti M, Orecchia S, Amici G, Catalano A, Procopio A. *Flip overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells.* Oncogene **2004**,23:7753-7760.
- Rittling SR, Chambers AF. *Role of osteopontin in tumour progression.* Br J Cancer **2004**,90:1877-1881.
- Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM. *Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1* J Exp Med **1995**,181:2237-2247.
- Robinson BWS, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, Winzell P, Hellstrom KE, Hellstrom I. *Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma.* Lancet **2003**,362:1612-1616.
- Robinson BWS, Lake RA. *Advances in malignant mesothelioma.* N Engl J Med **2005**,353:1591-1603.
- Robinson BWS, Musk AW, Lake RA. *Malignant mesothelioma.* Lancet **2005**,366:397-408.
- Robinson C, Robinson BW, Lake RA. *Sera from patients with malignant mesothelioma can contain autoantibodies.* Lung Cancer **1998**,20:175-184.
- Rollins BJ. *Inflammatory chemokines in cancer growth and progression* Eur J Cancer **2006**,42:760-767.
- Roushdy-Hammady I, Siegel J, Emri S, Testa JR, Carbone M. *Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the cappadocian region of turkey.* Lancet **2001**,357:444-445.
- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. *Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines.* Science **1997**,275:1790-1792.
- Ruffié2006 : *[Multimodal Approach To The Treatment Of Malignant Pleural Mesothelioma]: September 2006; Service Oncologie, Institut Gustave Roussy, Villejuif. ; 2006.*
- Russell JH, Ley TJ. *Lymphocyte-mediated cytotoxicity.* Annu Rev Immunol **2002**,20:323-370.
- Russell SJ, Peng K. *Viruses as anticancer drugs.* Trends Pharmacol Sci **2007**,28:326-333.
- Salih HR, Rammensee H, Steinle A. *Cutting edge: down-regulation of mica on human tumors by proteolytic shedding.* J Immunol **2002**,169:4098-4102.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha* J Exp Med **1994**,179:1109-1118.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation* Eur J Immunol **1998**,28:2760-2769.
- Sandberg AA, Bridge JA. *Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. mesothelioma.* Cancer Genet Cytogenet **2001**,127:93-110.

- Sartore-Bianchi A, Gasparri F, Galvani A, Nici L, Darnowski JW, Barbone D, Fennell DA, Gaudino G, Porta C, Mutti L. *Bortezomib inhibits nuclear factor-kappaB dependent survival and has potent in vivo activity in mesothelioma.* Clin Cancer Res **2007**,13:5942-5951.
- Scanlan MJ, Simpson AJG, Old LJ. *The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary.* Cancer Immun **2004**,4:1.
- Scherpereel A. *Guidelines of the french speaking society for chest medicine for management of malignant pleural mesothelioma.* Respir Med **2007**,101:1265-1276.
- Scherpereel A, Grigoriu B, Conti M, Gey T, Grégoire M, Copin M, Devos P, Chahine B, Porte H, Lassalle P. *Soluble mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma.* Am J Respir Crit Care Med **2006**,173:1155-1160.
- Schmollinger JC, Vonderheide RH, Hoar KM, Maecker B, Schultze JL, Hodi FS, Soiffer RJ, Jung K, Kuroda MJ, Letvin NL, Greenfield EA, Mihm M, Kutok JL, Dranoff G. *Melanoma inhibitor of apoptosis protein (miap) is a target for immune-mediated tumor destruction.* Proc Natl Acad Sci U S A **2003**,100:3398-3403.
- Schneider-Schaulies S, Klagge IM, ter Meulen V. *Dendritic cells and measles virus infection.* Curr Top Microbiol Immunol **2003**,276:77-101.
- Schnorr JJ, Xanthakos S, Keikavoussi P, Kämpgen E, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. *Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression.* Proc Natl Acad Sci U S A **1997**,94:5326-5331.
- Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. *T-cell help for cytotoxic t lymphocytes is mediated by cd40-cd40l interactions.* Nature **1998**,393:480-483.
- Scholler N, Fu N, Yang Y, Ye Z, Goodman GE, Hellström KE, Hellström I. *Soluble member(s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma.* Proc Natl Acad Sci U S A **1999**,96:11531-11536.
- Schott M. *Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers* Endocr Relat Cancer **2006**,13:779-795.
- Schouwink H, Korse CM, Bonfrer JM, Hart AA, Baas P. *Prognostic value of the serum tumour markers cyfra 21-1 and tissue polypeptide antigen in malignant mesothelioma.* Lung Cancer **1999**,25:25-32.
- Schulz O, Diebold SS, Chen M, Näslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, Azuma Y, Flavell RA, Liljeström P, Reis e Sousa C. *Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells.* Nature **2005**,433:887-892.
- Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. *Prognostic significance of activated cd8(+) t cell infiltrations within esophageal carcinomas* Cancer Res **2001**,61:3932-3936.
- Schutte W, Blankenburg T, Lauerwald K, Schreiber J, Bork I, Wollscgaeger B, Treutler D, Schneider C, Bonner R. *A multicenter phase ii study of gemcitabine and oxaliplatin for malignant pleural mesothelioma.* Clin Lung Cancer **2003**,4:294-297.
- Sebastien P, Janson X, Gaudichet A, Hirsch A, Bignon J. *Asbestos retention in human respiratory tissues: comparative measurements in lung parenchyma and in parietal pleura.* IARC Sci Publ **1980**,:237-246.
- Segers K, Ramael M, Singh SK, Weyler J, Van Meerbeeck J, Vermeire P, Van Marck E. *Immunoreactivity for bcl-2 protein in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium.* Virchows Arch **1994**,424:631-634.
- Selikoff IJ, Hammond EC, Seidman H. *Latency of asbestos disease among insulation workers in the united states and canada.* Cancer **1980**,46:2736-2740.
- Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A. *Nk/idc interaction results in il-18 secretion by dcs at the synaptic cleft followed by nk cell activation and release of the dc maturation factor hmgbl.* Blood **2005**,106:609-616.
- Seregini E, Coli A, Mazzucca N. *Circulating tumour markers in breast cancer.* Eur J Nucl Med Mol Imaging **2004**,31 Suppl 1:S15-22.

- Serrano A, García A, Abril E, Garrido F, Ruiz-Cabello F. *Methylated cpg points identified within mage-1 promoter are involved in gene repression.* Int J Cancer **1996**,68:464-470.
- Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. *Eraap customizes peptides for mhc class i molecules in the endoplasmic reticulum* Nature **2002**,419:480-483.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. *Ifngamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity* Nature **2001**,410:1107-1111.
- Shi Y, Evans JE, Rock KL. *Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells* Nature **2003**,425:516-521.
- Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. *Induction of tumor immunity by removing cd25+cd4+ t cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity.* J Immunol **1999**,163:5211-5218.
- Shiomi K, Hagiwara Y, Sonoue K, Segawa T, Miyashita K, Maeda M, Izumi H, Masuda K, Hirabayashi M, Moroboshi T, Yoshiyama T, Ishida A, Natori Y, Inoue A, Kobayashi M, Sakao Y, Miyamoto H, Takahashi K, Hino O. *Sensitive and specific new enzyme-linked immunosorbent assay for n-erc/mesothelin increases its potential as a useful serum tumor marker for mesothelioma.* Clin Cancer Res **2008**,14:1431-1437.
- Siegel FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood* Science **1999**,284:1835-1837.
- Sigalotti L, Coral S, Altomonte M, Natali L, Gaudino G, Cacciotti P, Libener R, Colizzi F, Vianale G, Martini F, Tognon M, Jungbluth A, Cebon J, Maraskovsky E, Mutti L, Maio M. *Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of dna methylation and bioimmunotherapeutic implications* Br J Cancer **2002**,86:979-982.
- Slingluff CLJ, Colella TA, Thompson L, Graham DD, Skipper JC, Caldwell J, Brinckerhoff L, Kittlesen DJ, Deacon DH, Oei C, Harthun NL, Huczko EL, Hunt DF, Darrow TL, Engelhard VH. *Melanomas with concordant loss of multiple melanocytic differentiation proteins: immune escape that may be overcome by targeting unique or undefined antigens.* Cancer Immunol Immunother **2000**,48:661-672.
- Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM, Hayakawa Y. *Nkg2d function protects the host from tumor initiation* J Exp Med **2005**,202:583-588.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI. *Differential tumor surveillance by natural killer (nk) and nkt cells* J Exp Med **2000**,191:661-668.
- Snijdwint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Karuntu-Wanamarta AH, Verstraeten AA, van Zanten-Przybysz I, Hummel P, Nijman HW, Kenemans P, Hilgers J. *Cellular and humoral immune responses to muc1 mucin and tandem-repeat peptides in ovarian cancer patients and controls.* Cancer Immunol Immunother **1999**,48:47-55.
- Soini Y, Kinnula V, Kaarteenaho-Wiik R, Kurtila E, Linnainmaa K, Pääkkö P. *Apoptosis and expression of apoptosis regulating proteins bcl-2, mcl-1, bcl-x, and bax in malignant mesothelioma.* Clin Cancer Res **1999**,5:3508-3515.
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. *Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties* J Immunol **1998**,161:1083-1086.
- Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M. *Standardized generation of fully mature p70 il-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use* Cancer Immunol Immunother **2001**,50:417-427.
- Spörri R, Reis e Sousa C. *Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of cd4+ t cell populations lacking helper function.* Nat Immunol **2005**,6:163-170.
- Spugnini EP, Bosari S, Citro G, Lorenzon I, Cognetti F, Baldi A. *Human malignant mesothelioma: molecular mechanisms of pathogenesis and progression.* Int J Biochem Cell Biol **2006**,38:2000-2004.
- Srivastava P. *Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses* Annu Rev Immunol **2002**,20:395-425.
- Steele JPC, Klabatsa A. *Chemotherapy options and new advances in malignant pleural mesothelioma.* Ann Oncol

2005,16:345-351.

Steinbach D, Schramm A, Eggert A, Onda M, Dawczynski K, Rump A, Pastan I, Wittig S, Pfaffendorf N, Voigt A, Zintl F, Gruhn B. *Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia.* Clin Cancer Res **2006**,12:2434-2441.

Steinman RM. *The dendritic cell system and its role in immunogenicity* Annu Rev Immunol **1991**,9:271-296.

Steinman RM. *The control of immunity and tolerance by dendritic cell* Pathol Biol (Paris) **2003**,51:59-60.

Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. *The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells.* J Exp Med **2000**,191:411-416.

Sterman DH, Kaiser LR, Albelda SM. *Gene therapy for malignant pleural mesothelioma.* Hematol Oncol Clin North Am **1998**,12:553-568.

Sterman DH, Recio A, Carroll RG, Gillespie CT, Haas A, Vachani A, Kapoor V, Sun J, Hodinka R, Brown JL, Corbly MJ, Parr M, Ho M, Pastan I, Machuzak M, Benedict W, Zhang X, Lord EM, Litzky LA, Heitjan DF, June CH, Kaiser LR, Vonderheide RH, Albelda SM, Kanther M. *A phase I clinical trial of single-dose intrapleural ifn-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses.* Clin Cancer Res **2007**,13:4456-4466.

Sterman DH, Recio A, Vachani A, Sun J, Cheung L, DeLong P, Amin KM, Litzky LA, Wilson JM, Kaiser LR, Albelda SM. *Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy.* Clin Cancer Res **2005**,11:7444-7453.

Stewart SA, Weinberg RA. *Telomeres: cancer to human aging.* Annu Rev Cell Dev Biol **2006**,22:531-557.

Street SEA, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. *Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma* J Exp Med **2002**,196:129-134.

Sugraker DJ, Flores RM, Jaklitsch MT, Richards WG, Strauss GM, Corson JM, DeCamp MMJ, Swanson SJ, Bueno R, Lukanich JM, Baldini EH, Mentzer SJ. *Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients.* J Thorac Cardiovasc Surg **1999**,117:54-63; discussion 63-5.

Taieb J, Chaput N, Menard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, Pequignot M, Casares N, Terme M, Flament C, Opolon P, Lecluse Y, Metivier D, Tomasello E, Vivier E, Ghiringhelli F, Martin F, Klatzmann D, Poynard T, Tursz T, Raposo G, Yagita H, Ryffel B, Kroemer G, Zitvogel L. *A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance* Nat Med **2006**,12:214-219.

Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A. *Expression of mucl on myeloma cells and induction of hla-unrestricted ctl against mucl from a multiple myeloma patient.* J Immunol **1994**,153:2102-2109.

Takeda K, Akira S. *Tlr signaling pathways.* Semin Immunol **2004**,16:3-9.

Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. *Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development* J Exp Med **2002**,195:161-169.

Talanian RV, Yang X, Turbov J, Seth P, Ghayur T, Casiano CA, Orth K, Froelich CJ. *Granule-mediated killing: pathways for granzyme b-initiated apoptosis* J Exp Med **1997**,186:1323-1331.

Tarro G, Perna A, Esposito C. *Early diagnosis of lung cancer by detection of tumor liberated protein.* J Cell Physiol **2005**,203:1-5.

Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM, Plunkett T, Graham R, Correa I, Miles D, Smith M. *Mucl and the immunobiology of cancer.* J Mammary Gland Biol Neoplasia **2002**,7:209-221.

ten Berge RL, Snijdwint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Poort-Keesom RJ, Oudejans JJ, Meijer JW, Willemze R, Hilgers J, Meijer CJ. *Mucl (ema) is preferentially expressed by alk positive anaplastic large cell lymphoma, in the normally glycosylated or only partly hypoglycosylated form.* J Clin Pathol **2001**,54:933-939.

- Tewari MK, Sinnathamby G, Rajagopal D, Eisenlohr LC. *A cytosolic pathway for mhc class ii-restricted antigen processing that is proteasome and tap dependent.* Nat Immunol **2005**,6:287-294.
- Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER, Armstrong TD, Chen Y, Huang L, Laheru DA, Goggins M, Hruban RH, Jaffee EM. *Mesothelin-specific cd8(+) t cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients.* J Exp Med **2004**,200:297-306.
- Thomas 1959 Thomas L: . In *Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states*. Volume . . Edited by Lawrence. Hoeber-Harper, New York; 1959:529-532.
- Thomas WD, Hersey P. *Tnf-related apoptosis-inducing ligand (trail) induces apoptosis in fas ligand-resistant melanoma cells and mediates cd4 t cell killing of target cells.* J Immunol **1998**,161:2195-2200.
- Thylén A, Hjerpe A, Martensson G. *Hyaluronan content in pleural fluid as a prognostic factor in patients with malignant pleural mesothelioma.* Cancer **2001**,92:1224-1230.
- Touret N, Paroutis P, Terebiznik M, Harrison RE, Trombetta S, Pypaert M, Chow A, Jiang A, Shaw J, Yip C, Moore H, van der Wel N, Houben D, Peters PJ, de Chastellier C, Mellman I, Grinstein S. *Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the er to phagosome formation* Cell **2005**,123:157-170.
- Trombetta ES, Mellman I. *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo* Annu Rev Immunol **2005**,23:975-1028.
- Tsang K, Palena C, Gulley J, Arlen P, Schlom J. *A human cytotoxic t-lymphocyte epitope and its agonist epitope from the nonvariable number of tandem repeat sequence of muc-1.* Clin Cancer Res **2004**,10:2139-2149.
- Tsao AS, He D, Saigal B, Liu S, Lee JJ, Bakkannagari S, Ordonez NG, Hong WK, Wistuba I, Johnson FM. *Inhibition of c-src expression and activation in malignant pleural mesothelioma tissues leads to apoptosis, cell cycle arrest, and decreased migration and invasion.* Mol Cancer Ther **2007**,6:1962-1972.
- Turk MJ, Guevara-Patiño JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN. *Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory t cells.* J Exp Med **2004**,200:771-782.
- Turner JG, Rakhmilevich AL, Burdelya L, Neal Z, Imboden M, Sondel PM, Yu H. *Anti-cd40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of nk cells.* J Immunol **2001**,166:89-94.
- Uematsu K, Kanazawa S, You L, He B, Xu Z, Li K, Peterlin BM, McCormick F, Jablons DM. *Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of dishevelled overexpression and transcriptional activity of beta-catenin.* Cancer Res **2003**,63:4547-4551.
- Upadhyay D, Kamp DW. *Asbestos-induced pulmonary toxicity: role of dna damage and apoptosis.* Exp Biol Med (Maywood) **2003**,228:650-659.
- Utkan G, Büyükelik A, Yalçın B, Akbulut H, Demirkazık A, Dinçol D, Onur H, Gören D, Mousa U, Senler FC, İçli F. *Divided dose of cisplatin combined with gemcitabine in malignant mesothelioma.* Lung Cancer **2006**,53:367-374.
- van der Most RG, Robinson BWS, Nelson DJ. *Gene therapy for malignant mesothelioma: beyond the infant years.* Cancer Gene Ther **2006**,13:897-904.
- van Endert P, Villadangos JA. *Antigen processing and recognition.* Curr Opin Immunol **2007**,19:63-65.
- van Haarst JMW, Baas P, Manegold C, Schouwink JH, Burgers JA, de Bruin HG, Mooi WJ, van Klaveren RJ, de Jonge MJA, van Meerbeeck JP. *Multicentre phase ii study of gemcitabine and cisplatin in malignant pleural mesothelioma.* Br J Cancer **2002**,86:342-345.
- van Kaick G, Dalheimer A, Hornik S, Kaul A, Liebermann D, Lührs H, Spiethoff A, Wegener K, Wesch H. *The german thorotrast study: recent results and assessment of risks.* Radiat Res **1999**,152:S64-71.
- van Meerbeeck JP, Gaafar R, Manegold C, Van Klaveren RJ, Van Marck EA, Vincent M, Legrand C, Bottomley A, Debruyne C, Giaccone G, . *Randomized phase iii study of cisplatin with or without raltitrexed in patients with malignant pleural mesothelioma: an intergroup study of the european organisation for research and treatment of cancer lung cancer group and the national cancer institute of canada.* J Clin Oncol **2005**,23:6881-6889.

- Versnel MA, Claesson-Welsh L, Hammacher A, Bouts MJ, van der Kwast TH, Eriksson A, Willemsen R, Weima SM, Hoogsteden HC, Hagemeijer A, et al.. *Human malignant mesothelioma cell lines express pdgf beta-receptors whereas cultured normal mesothelial cells express predominantly pdgf alpha-receptors*. Oncogene **1991**,6:2005-2011.
- Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kaliński P. *Development of th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction*. J Immunol **2000**,164:4507-4512.
- Villadangos JA, Schnorrer P. *Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo*. Nat Rev Immunol **2007**,7:543-555.
- Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareno J, Zuñil M, Callol L. *Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset cd57 in patients with squamous cell lung cancer* Lung Cancer **2002**,35:23-28.
- Villena V, López-Encuentra A, Echave-Sustaeta J, Martín-Escribano P, Ortuño-de-Solo B, Estenoz-Alfaro J. *Diagnostic value of ca 549 in pleural fluid. comparison with cea, ca 15.3 and ca 72.4*. Lung Cancer **2003**,40:289-294.
- Vincent MS, Leslie DS, Gumperz JE, Xiong X, Grant EP, Brenner MB. *Cd1-dependent dendritic cell instruction*. Nat Immunol **2002**,3:1163-1168.
- Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Aricò M, Moretta L, Moretta A. *Nk-dependent dc maturation is mediated by tnfa and ifngamma released upon engagement of the nkp30 triggering receptor*. Blood **2005**,106:566-571.
- Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P. *Phase iii study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma*. J Clin Oncol **2003**,21:2636-2644.
- von Mensdorff-Pouilly S, Gourevitch MM, Kenemans P, Verstraeten AA, Litvinov SV, van Kamp GJ, Meijer S, Vermorken J, Hilgers J. *Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (muc-1) in patients with benign and malignant breast tumours*. Eur J Cancer **1996**,32A:1325-1331.
- Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Hasan M, Richard-Le Goff O, Corcuff E, Mandelboim O, Di Santo JP. *CD11c/B220+ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells*. J Exp Med **2007** 204(11):2569-78.
- Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. *Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the north western cape province*. Br J Ind Med **1960**,17:260-271.
- Waite K, Gilligan D. *The role of radiotherapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma*. Clin Oncol (R Coll Radiol) **2007**,19:182-187.
- Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"*. Blood **2005**,106:2252-2258.
- Wang NS, Huang SN, Gold P. *Absence of carcinoembryonic antigen-like material in mesothelioma: an immunohistochemical differentiation from other lung cancers* Cancer **1979**,44:937-943.
- Wang RF. *The role of mhc class ii-restricted tumor antigens and cd4+ t cells in antitumor immunity*. Trends Immunol **2001**,22:269-276.
- Wang Y, Zhao R, Chattopadhyay S, Goldman ID. *A novel folate transport activity in human mesothelioma cell lines with high affinity and specificity for the new-generation antifolate, pemetrexed*. Cancer Res **2002**,62:6434-6437.
- Watts TH. *Tnf/tnfr family members in costimulation of t cell responses* Annu Rev Immunol **2005**,23:23-68.
- Wittel UA, Goel A, Varshney GC, Batra SK. *Mucin antibodies - new tools in diagnosis and therapy of cancer*. Front Biosci **2001**,6:D1296-310.
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. *Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for*

ctl cross-priming Nat Med **2001**,7:297-303.

Wong L, Zhou J, Anderson D, Kratzke RA. *Inactivation of p16ink4a expression in malignant mesothelioma by methylation.* Lung Cancer **2002**,38:131-136.

Wu M, Yuan S, Szporn AH, Gan L, Shtilbans V, Burstein DE. *Immunocytochemical detection of xiap in body cavity effusions and washes.* Mod Pathol **2005**,18:1618-1622.

Yan S, Sameni M, Sloane BF. *Cathepsin b and human tumor progression.* Biol Chem **1998**,379:113-123.

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

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

Yu Y, Hagihara M, Ando K, Gansuud B, Matsuzawa H, Tsuchiya T, Ueda Y, Inoue H, Hotta T, Kato S. *Enhancement of human cord blood cd34+ cell-derived nk cell cytotoxicity by dendritic cells.* J Immunol **2001**,166:1590-1600.

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

Zaffaroni N, Costa A, Pennati M, De Marco C, Affini E, Madeo M, Erdas R, Cabras A, Kusamura S, Baratti D, Deraco M, Daidone MG. *Survivin is highly expressed and promotes cell survival in malignant peritoneal mesothelioma.* Cell Oncol **2007**,29:453-466.

Zamanakou M, Germentis AE, Karanikas V. *Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase.* Immunol Lett **2007**,111:69-75.

Zanella CL, Posada J, Tritton TR, Mossman BT. *Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor.* Cancer Res **1996**,56:5334-5338.

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

Zhu ZB, Makhija SK, Lu B, Wang M, Wang S, Takayama K, Siegal GP, Reynolds PN, Curiel DT. *Targeting mesothelioma using an infectivity enhanced survivin-conditionally replicative adenoviruses.* J Thorac Oncol **2006**,1:701-711.

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

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

ANNEXES

Séquences protéiques des différents variants de la MSLN

	10	20	30	40	50	60	
Variant1	MALPTAREPLL	GSCGTPALGS	LLFLLFSLGW	VQPSRTLAGE	TGQEAAPLDG	VLANPPNISS	Séquence
Variant2	MALPTAREPLL	GSCGTPALGS	LLFLLFSLGW	VQPSRTLAGE	TGQEAAPLDG	VLANPPNISS	Signal
Variant3	MALPTAREPLL	GSCGTPALGS	LLFLLFSLGW	VQPSRTLAGE	TGQEAAPLDG	VLANPPNISS	
	70	80	90	100	110	120	
Variant1	LSPRQLLGFP	CAEVSGLSTE	RVRELAVALA	QKNVKLSTEQ	LRCLAHRLSE	PPEDLDALPL	
Variant2	LSPRQLLGFP	CAEVSGLSTE	RVRELAVALA	QKNVKLSTEQ	LRCLAHRLSE	PPEDLDALPL	
Variant3	LSPRQLLGFP	CAEVSGLSTE	RVRELAVALA	QKNVKLSTEQ	LRCLAHRLSE	PPEDLDALPL	
	130	140	150	160	170	180	
Variant1	LLLLFLNPDA	FSGPQACTRF	FSRITKANVD	LLPRGAPERQ	RLLPAALACW	GVRGSLLESA	
Variant2	LLLLFLNPDA	FSGPQACTRF	FSRITKANVD	LLPRGAPERQ	RLLPAALACW	GVRGSLLESA	MPF
Variant3	LLLLFLNPDA	FSGPQACTRF	FSRITKANVD	LLPRGAPERQ	RLLPAALACW	GVRGSLLESA	
	190	200	210	220	230	240	
Variant1	DVRALGGLAC	DLPGRFVAES	AEVLLPRLVS	CPGPLDQDQQ	EAARAALQGG	GPPYGPPSTW	
Variant2	DVRALGGLAC	DLPGRFVAES	AEVLLPRLVS	CPGPLDQDQQ	EAARAALQGG	GPPYGPPSTW	
Variant3	DVRALGGLAC	DLPGRFVAES	AEVLLPRLVS	CPGPLDQDQQ	EAARAALQGG	GPPYGPPSTW	
	250	260	270	280	290	300	
Variant1	SVSTMDALRG	LLPVLGQPII	RSIPQGIVAA	WRQRSSRDPS	WRQPERTILR	PRFRREVEKT	
Variant2	SVSTMDALRG	LLPVLGQPII	RSIPQGIVAA	WRQRSSRDPS	WRQPERTILR	PRFRREVEKT	
Variant3	SVSTMDALRG	LLPVLGQPII	RSIPQGIVAA	WRQRSSRDPS	WRQPERTILR	PRFRREVEKT	
	310	320	330	340	350	360	
Variant1	ACPSGKKARE	IDESLIFYKK	WELEACVDAA	LLATQMDRVN	AIPFTYEQLD	VLKHKLDLEY	
Variant2	ACPSGKKARE	IDESLIFYKK	WELEACVDAA	LLATQMDRVN	AIPFTYEQLD	VLKHKLDLEY	
Variant3	ACPSGKKARE	IDESLIFYKK	WELEACVDAA	LLATQMDRVN	AIPFTYEQLD	VLKHKLDLEY	
	370	380	390	400	410	420	
Variant1	PQGYPESVIQ	HLGYLFLKMS	PEDIRKWNVT	SLETLKALLE	VNKGHEMS~	~~~~~PQVA	
Variant2	PQGYPESVIQ	HLGYLFLKMS	PEDIRKWNVT	SLETLKALLE	VNKGHEMS~	~~~~~PQVA	
Variant3	PQGYPESVIQ	HLGYLFLKMS	PEDIRKWNVT	SLETLKALLE	VNKGHEMS~	~~~~~PQVA	
	430	440	450	460	470	480	
Variant1	TLIDRFVKGR	GQLDKDTLDT	LTAFYPGYLC	SLSPEELSSV	PPSSIWAVRP	QDLDTCDPRQ	
Variant2	TLIDRFVKGR	GQLDKDTLDT	LTAFYPGYLC	SLSPEELSSV	PPSSIWAVRP	QDLDTCDPRQ	MSLN
Variant3	TLIDRFVKGR	GQLDKDTLDT	LTAFYPGYLC	SLSPEELSSV	PPSSIWAVRP	QDLDTCDPRQ	
	490	500	510	520	530	540	
Variant1	LDVLYPKARL	AFQNMNGSEY	FVKIQSFLGG	APTEDLKALS	QQNVSMDLAT	FMKLRTDAVL	
Variant2	LDVLYPKARL	AFQNMNGSEY	FVKIQSFLGG	APTEDLKALS	QQNVSMDLAT	FMKLRTDAVL	
Variant3	LDVLYPKARL	AFQNMNGSEY	FVKIQSFLGG	APTEDLKALS	QQNVSMDLAT	FMKLRTDAVL	
	550	560	570	580	590	600	
Variant1	PLTVAEVQKL	LGPHVEGLKA	EERHRPVRDW	ILRQRQDDLD	TLGLGLQGGI	PNGYLVLDLS	
Variant2	PLTVAEVQKL	LGPHVEGLKA	EERHRPVRDW	ILRQRQDDLD	TLGLGLQGGI	PNGYLVLDLS	
Variant3	PLTVAEVQKL	LGPHVEGLKA	EERHRPVRDW	ILRQRQDDLD	TLGLGLQGGI	PNGYLVLDLS	
	610	620	630	640	650	660	
Variant1	MQEALSGTPC	LLGPGPVLTV	LALLLASTLA	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
Variant2	MQEALSGTPC	LLGPGPVLTV	LALLLASTLA	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
Variant3	VQGGRGQAR	AGGRAGGVEV	GALSHPSLCR	GPLGDALPPR	TWTCSHRPGT	APSLHPGLRA	
Variant1	~~~~						
Variant2	~~~~						
Variant3	PLEFC						

Source: Base de données Expaty: <http://www.expasy.org/cgi-bin/get-all-varsplc.pl?Q13421>

N° d'accès: Variant1: Q13421-3; Variant2: Q13421 ; Variant3: Q13421-2.

Séquence protéique de MUC-1

10	20	30	40	50	60	Séquence signal
MTPTGTQSPFF	LLLLLTVLTV	VTGSGHASST	PGGEKETSAT	QRSSVPSSSTE	KNAVSMTSSV	
70	80	90	100	110	120	
LSSHSPGSGS	STTQQGDVTL	APATEPASGS	AATWGQDVTS	VPVTRPALGS	TTPPAHDVTS	
130	140	150	160	170	180	VNTR
APDNKPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
190	200	210	220	230	240	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
250	260	270	280	290	300	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
310	320	330	340	350	360	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
370	380	390	400	410	420	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
430	440	450	460	470	480	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
490	500	510	520	530	540	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
550	560	570	580	590	600	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
610	620	630	640	650	660	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
670	680	690	700	710	720	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
730	740	750	760	770	780	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
790	800	810	820	830	840	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
850	860	870	880	890	900	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	
910	920	930	940	950	960	
APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDTRPAPGS	TAPPAHGVTS	APDNRPALGS	TAPPVHNVTS	
970	980	990	1000	1010	1020	
ASGSASGSAS	TLVHNGTSAR	ATTPASKST	PFSIPSHSD	TPTTLASHST	KTDASSTHHS	
1030	1040	1050	1060	1070	1080	
SVPPLTSSNH	STSPQLSTGV	SFFFLSFHIS	NLQFNSSLED	PSTDYYQELQ	RDISEMFLQI	
1090	1100	1110	1120	1130	1140	
YKQGGFLGLS	NIKFRPGSVV	VQLTLAFREG	TINVHDTVETQ	FNQYKTEAAS	RYNLTISDVS	
1150	1160	1170	1180	1190	1200	
VSDVPFPFSA	QSGAGVPGWG	IALLVLVCVL	VALAIVYLIA	LAVCQCRRKN	YGQLDIFPAR	
		Domaine transmembranaire				
1210	1220	1230	1240	1250		
DTYHPMSEYP	TYHTHGRYVP	PSSTDRSPYE	KVSAGNGGSS	LSYTNPAVAA	ASANL	

Source: Base de données NCBI (N° d'accès: P15941):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/entrez/query.fcgi?db=Protein>

Les deux zones soulignées correspondent aux épitopes spécifiques des clones CTL isolés.

DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS DIAGNOSTIQUES ET D'APPROCHES THÉRAPEUTIQUES POUR LE MÉSOTHÉLIOME PLEURAL MALIN.

Le dosage de formes solubles de la mésothéline représente une approche prometteuse pour le diagnostic du mésothéliome. Nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la production de ces formes solubles sur un modèle cellulaire. En plus des mécanismes d'épissage alternatif, des protéases sont à l'origine de la présence de mésothéline soluble dans l'environnement tumoral. L'identification de ces protéases devrait permettre d'améliorer les outils diagnostiques disponibles pour ce cancer. Par la suite, nous avons montré la possibilité de réactiver la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre des cellules tumorales en chargeant des cellules dendritiques avec des corps apoptotiques de cellules de mésothéliome. Lors de l'étude d'une approche de type virothérapie, une activation des cellules dendritiques ayant phagocyté les cellules tumorales infectées ainsi qu'une augmentation de la fréquence des lymphocytes T spécifiques de la mésothéline ont été observées.

Mots-clés: mésothéliome pleural malin, mésothéline, mucine-1, immunothérapie, virothérapie

DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC MARKERS AND THERAPEUTIC APPROACHES FOR MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA.

Soluble forms of mesothelin represent a promising diagnostic approach for mesothelioma. We studied the mechanisms implicated in the production of soluble forms of mesothelin on a cellular model. Aberrant splicing events could partly explain the presence of soluble mesothelin in the tumor environment. We also showed that proteases were able to cleave membrane-bound mesothelin. Identification of the implicated proteases should improve the diagnostic tools available for this cancer. We also studied an approach of immunotherapy and showed that loading dendritic cells with apoptotic bodies of mesothelioma cells led to the reactivation of a cellular immune response against tumoral cells. Another approach of virotherapy, based on mesothelioma cells viral infection, was also able to activate an immune response. Indeed, we observed an important activation of dendritic cells loaded with infected tumoral cells, as well as an increase in mesothelin specific T lymphocytes.

Keywords: malignant pleural mesothelioma, mesothelin, mucin-1, immunotherapy, virotherapy